

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Aislamiento y caracterización de mutantes *Rhodospirillum rubrum* con alteraciones en el centro fotosintético de reacción

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rafael Picorel Castaño

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5305312749

F.V.

T 579.81

PIC

ais

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES
DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM CON ALTERACIONES
EN EL CENTRO FOTOSINTETICO DE REACCION



R.-20.208

Tesis presentada por Rafael Picorel Castaño
para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Madrid, Octubre de 1979

Esta Tesis ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioenergética Celular, Instituto de Biología Celular, C.S.I.C. (Madrid) y en la Sección de Fotosíntesis, Departamento de Bioquímica, Universidad de Montreal (Montreal).

Quiero dejar constancia de mi gratitud a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis, especialmente al Dr. Juan M. Ramírez de Verger por su dirección.

A la bacteria R. rubrum por sus
contínuas enseñanzas

I N D I C E

	<u>Página</u>
ABREVIATURAS	X
I. INTRODUCCION	1
1.1 Fotosíntesis bacteriana	2
1.2 Bacterias fotosintéticas	4
1.3 Pigmentos fotosintéticos y su distribu- ción en estructuras subcelulares	5
1.4 Antena	9
1.5 Centros de reacción	10
1.6 Cadena de transporte de electrones en fo- tosíntesis bacteriana	15
1.7 Utilización de mutantes como metodología para el estudio de la fotosíntesis bacte- riana	19
1.8 Objetivo de nuestro trabajo	20
II. MATERIALES Y METODOS	22
2.1 Materiales	23
2.1.1 Materiales biológicos	23
2.1.2 Productos químicos	24
2.1.3 Aparatos	24
2.2 Métodos	33
2.2.1 Medio de cultivo	33
2.2.2 Conservación de estirpes	33

	<u>Página</u>
2.2.3 Cultivo de las células en medio líquido	34
2.2.4 Obtención de revertientes fototróficos.....	36
2.2.5 Medidas de crecimiento bacteriano	36
2.2.6 Preparación de cromatóforos	37
2.2.7 Determinación de la bacterioclorofila	38
2.2.8 Determinación de proteína	39
2.2.9 Determinación del contenido de ATP de una suspensión bacteriana	39
2.2.10 Espectros diferenciales inducidos por reactivos químicos	41
2.2.11 Determinación precisa de la cantidad de P800 presente en una suspensión de cromatóforos	43
2.2.12 Cambios fotoquímicos	43
2.2.13 Medidas de consumo de oxígeno por suspensiones celulares	45
2.2.14 Fotorreducción de azul de tetrazolio	45
2.2.15 Fotooxidación del DCIPH ₂	46
2.2.16 Fotofosforilación catalizada por cromatóforos	46
2.2.17 Electroforesis en geles de poliacrilamida	47
2.2.18 Detección de señales EPR en cromatóforos	50
2.2.19 Purificación de centros de reacción	50
2.2.20 Medidas de cinética rápida en células enteras	53
2.2.21 Medidas de inducción de fluorescencia	54

III. RESULTADOS

3.1	Obtención de mutantes no fototrofos afectados en el centro de reacción	56
3.1.1	Espectro de los pigmentos "in vivo" e "in vitro"	56
3.1.2	Espectros diferenciales oxidado-reducido	59
3.1.3	Actividades fotoquímicas	64
3.2	Revertientes espontáneos fototróficos ...	67
3.2.1	Revertientes procedentes de la estirpe F24	67
3.2.2	Revertientes procedentes de la estirpe T102	69
3.2.3	Revertientes procedentes de las estirpes no fototrofas T90, T87 y T78 ..	69
3.2.4	Crecimiento fototrofo de los revertientes descritos	69
3.3	Propiedades generales de la estirpe F24.1	78
3.3.1	Espectro de los pigmentos "in vivo" e "in vitro"	78
3.3.2	Curvas de crecimiento fototrófico..	82
3.3.3	Fotofosforilación en células enteras	85
3.3.4	Inhibición de la respiración por efecto de la luz	85
3.4	Determinación cuantitativa y cualitativa del centro de reacción que opera en F24.1	88
3.4.1	Espectro absoluto de los pigmentos alrededor de 800 nm de una suspensión concentrada de cromatóforos ..	89

	<u>Página</u>
3.4.2 Espectro diferencial oxidado-reducido en la región de 800 nm	91
3.4.3 Espectro diferencial luz-oscuridad en presencia y ausencia de desacoplantes	91
3.4.4 Cinética de los cambios fotoquímicos a 1245 nm	96
3.4.5 Cinética de emisión de fluorescencia en cromatóforos	96
3.4.6 Espectros EPR inducidos por luz en cromatóforos	99
3.4.7 Electroforesis de cromatóforos en geles de poliacrilamida	100
3.4.8 Purificación de los centros de reacción de las cepas fototrofas S1 y F24.1	102
3.4.8.1 Espectro de los centros de reacción purificados	104
3.4.8.2 Electroforesis de centros de reacción	107
3.5 Cambios electrocrómicos inducidos por luz	107
3.5.1 Espectro de los cambios fotoquímicos de la región de los carotenos en S1 y F24.1	110
3.5.2 Cambios fotoquímicos en cromatóforos de G9	112
3.5.3 Efecto de diversas concentraciones de desacoplantes sobre el potencial de membrana	117
3.6 Procesos de óxido-reducción inducidos por luz en células enteras: caracterización por espectroscopía de destellos	119
3.6.1 Cinética de recuperación del centro de reacción	121

	<u>Página</u>
3.6.2 Cinéticas de óxido-reducción ads critas al citocromo C-420	125
3.6.2.1 Cinética de oxidación	125
3.6.2.2 Cinética de reducción	127
3.6.3 Cinética de los cambios inducidos por luz a 428 nm	127
3.6.3.1 Saturación por luz actíni- ca sobre los cambios a 428 nm	129
3.6.3.2 Cinética de los cambios subsiguientes a un primer destello	131
3.6.3.3 Cinética de los cambios a 428 nm al variar el número de destellos	131
3.6.3.4 Determinación del cambio máximo a 428 nm	134
3.6.4 Efecto de la Gramicidina D sobre las cinéticas de oxido-reducción de los citocromos	136
3.6.5 Efecto del HOQNO y Antimicina A so bre las cinéticas de los citocro- mos	136
IV. DISCUSION	145
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	160
VI. BIBLIOGRAFIA	163

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AT	Azul de tetrazolio
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
DCIP	2,6-diclorofenol indofenol
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
G	Gauss
g	Factor de Laude
H	Campo magnético
HOQNO	2-heptil-4-hidroxiquinolina-N-óxido
IR	Infrarrojo
LDAO	Lauril dimetil aminoóxido
NAD	Nicotin adenin dinucleótido
NADP	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
SDS	Dodecil sulfato sódico
T	Transmitancia
t _{1/2}	Vida media
Temed	N, N, N', N'-tetrametil etilendiamina
↑	Iluminar
↓	Apagar

I. INTRODUCCION

1.1. FOTOSINTESIS BACTERIANA

El aparato fotosintético de bacterias está constituido por un solo fotosistema, en contraste con el de plantas y algas que posee dos fotosistemas bien diferenciados, I y II. La existencia de dos fotosistemas en cloroplastos fue demostrada por los trabajos pioneros de Emerson y Arnold, 1932, con el alga Chlorella pyrenoidosa, en los cuales se detectó un efecto cooperativo cuando se iluminaba simultáneamente con dos rayos monocromáticos de 640 nm y 714 nm. Cuando se iluminaba con los dos rayos simultáneamente la actividad fotosintética era mayor que la suma de las actividades inducidas por los dos rayos por separado. Este efecto cooperativo no se ha podido detectar en bacterias fotosintéticas (Vernon et al., 1966).

La ausencia del fotosistema II en bacterias provoca que éstas tengan que utilizar como fuente de electrones compuestos más reducidos que el H_2O , como compuestos de azufre reducidos, H_2 o compuestos orgánicos simples. Por tanto, en lugar de O_2 como producto oxidado se obtiene sulfatos, protones, compuestos orgánicos diversos y CO_2 . Las características del fotosistema I de plantas se parece bastante al fotosistema de bacterias: la clorofila de sus correspondientes centros de reacción tienen un potencial redox similar (+0,44 v), las señales EPR inducidas por dicha clorofilas oxidadas son iguales ($g = 2,0026$), ambas presentan fotooxidación de citocromos endógenos bajo iluminación actínica, ambas llevan a cabo fotofosforilación cíclica, etc. Sin embargo, las plantas y algas poseen plastoquinona y fotorreducen NADP, mientras que las bacterias contienen ubiquinona y fotorreducen NAD.

Sería interesante comentar algunos aspectos evolutivos de ambos tipos de fotosíntesis. Se ha aceptado frecuente

temente que la fotosíntesis bacteriana precedió a la fotosíntesis de las algas verde-azuladas (Brock, 1973), basándose en aspectos de complejidad del aparato fotosintético. Según esta teoría, las bacterias fotosintéticas en su evolución darían lugar a las algas verde-azuladas añadiendo el fotosistema II para la fotólisis del H_2O en un grado de evolución más complejo (Cruden et al., 1970). Sin embargo, otros autores sugieren la existencia de un posible precursor ancestral común para bacterias y algas verde-azuladas con un pigmento similar a la clorofila a y dos fotosistemas (Olson, 1970). Esta teoría admite que la fotosíntesis bacteriana apareció por una simplificación de la fotosíntesis de una primitiva cianofita unicelular, al perder el fotosistema II. Hay que destacar en este sentido la gran similitud entre el aparato fotosintético de bacterias y el fotosistema I de plantas. Asimismo se ha descrito (Cohen et al., 1975) que el alga verde-azulada Oscillatoria lunnetica puede llevar a cabo ambos tipos de fotosíntesis, dependiendo de las condiciones del medio: en presencia de altas concentraciones de SH_2 , oxida este sustrato utilizando únicamente el fotosistema I; cuando las condiciones ambientales son más oxidantes, obtiene el poder reductor a partir del H_2O gracias a la entrada en funcionamiento del fotosistema II. Según la teoría del alga verde-azulada ancestral, las bacterias verdes precederían a las bacterias púrpuras. De hecho, las bacterias fotosintéticas verdes tienen un aparato fotosintético más complejo que las bacterias púrpuras, ya que el tamaño de la antena es mayor y tales pigmentos de antena se localizan en unas vesículas especiales que se asemejan en su funcionamiento a los ficobilisomas de las algas verde-azuladas. El análisis de las ferredoxinas, apoyan esta última teoría. (Hall et al., 1973; Baltscheffsky, 1974). Según estos datos la evolución iría en la dirección de Chlorobium → Rhodospirillum → Chromatium. El análisis

sis de los ácidos nucleicos ha reportado que el contenido C + G es muy parecido en Chlorobium y en algunas especies unicelulares de algas verde-azuladas que, por otra parte, difiere marcadamente de la media de las bacterias fotosintéticas. Sin embargo, nada definitivo se ha dicho acerca del origen de la fotosíntesis en general y de la bacteria en particular.

1.2. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

Las bacterias fotosintéticas se agrupan en cuatro familias con características bien diferenciadas: Clorobiáceas, Clorofexáceas, Cromatiáceas y Rodospiriláceas.

Clorobiáceas: Todas las especies de esta familia son anaeróbicas estrictas y fototróficas obligatorias. Utilizan compuestos reducidos de S como fuente de electrones. En ciertas condiciones pueden usar también el H₂. Tienen una pared celular rígida, no son móviles y se dividen por fisión binaria. Todas son Gram negativas. Un representante típico es el género Chlorobium.

Clorofexáceas: Muestran un aparato fotosintético similar al de las Clorobiáceas. Sin embargo, morfológicamente difieren marcadamente de los representantes de esta familia, ya que presentan un aspecto filamentoso y se deslizan sobre las superficies. Crecen bien en condiciones fotoorganotróficas, pero también pueden crecer quimiorganotróficamente en condiciones aeróbicas. El único representante de la familia es la especie Chlorofexus aurantiacus (Pierson et al., 1974).

Cromatiáceas: Las especies de esta familia oxidan compuestos de S reducidos como fuente de electrones. Oxidan SH_2 hasta sulfato, pasando por S que suele acumularse en el interior de la célula en forma de gránulos. Pueden asimilar compuestos carbonados simples como acetato y piruvato. Las células en general son móviles y se dividen por fisión binaria. Pueden presentarse como células aisladas o en agregados móviles. Todas son Gram negativas. Un representante típico es el género Chromatium.

Rodospiriláceas: En general son incapaces de utilizar compuestos de S, de ahí que también se les llame bacterias púrpuras no sulfurosas. Crecen en condiciones fotoorganoheterotróficas, utilizando compuestos carbonados simples como acetatos, hidroxiaácidos, cetoácidos de cadena corta, etc. En general requieren una o varias vitaminas para crecer. Pueden utilizar H_2 como fuente de electrones y muchas especies son fijadores de N_2 . En general son móviles y la forma varía ampliamente, incluso dentro de una misma especie, dependiendo de las condiciones de cultivo. Son Gram negativas. Un representante típico es el género Rhodospirillum.

1.3. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS Y SU DISTRIBUCION EN ESTRUCTURAS SUBCELULARES

Las clorofilas son los fotorreceptores indispensables para que tenga lugar la función fotosintética. Las clorofilas constituyen un pequeño grupo de moléculas que varían unas de otras en pequeñas modificaciones. Las bacterias púrpuras contienen Bacterioclorofila a y b, mientras que las bacterias verdes presentan más variedades: c, d, e, f y una pequeña proporción de a (Gloe et al., 1975). Hay que resaltar la presencia, en mayor o menor proporción, de

la bacterioclorofila a en todas las especies bacterianas analizadas hasta el momento, con la única excepción de Rp. viridis que presenta bacterioclorofila b.

La molécula está constituida esencialmente por un macrociclo central con cuatro anillos pirrólicos coordinados con un átomo de Mg central. El macrociclo está esterificado con una larga cadena lateral, el fitolgeraniol, cuya función puede estar en dar mayor estabilidad a la molécula y facilitar su inserción en la matriz lipídica de las membranas. El átomo de Mg central, con un número de coordinación de 4 está insaturado, como confirman algunos experimentos de espectroscopía del Infrarrojo (Ballsch-miter et al., 1969) y espectroscopía NMR (Katz et al., 1973). Como consecuencia, el átomo de Mg se comporta como un electrófilo y tiende a interaccionar con moléculas con grupos nucleófilos. De esta forma el número de coordinación del metal central puede variar dependiendo del disolvente en donde se encuentre la molécula de bacterioclorofila. Las propiedades electrofílicas del Mg central hacen que la molécula de bacterioclorofila interaccione con solventes nucleófilos, y en su ausencia con otras moléculas de bacterioclorofila, ya que posee grupos nucleófilos como los grupos éster $C = O$ y grupos ceto $C = O$. De esta forma se pueden obtener agregados por interacciones $C = O \dots \dots Mg$ (Katz et al., 1978). Estos estados de agregación se ven muy favorecidos en las células debido a la alta concentración que existe de estos pigmentos en las membranas fotosintéticas, puede exceder de 0,05 M (Sauer, 1975).

Los carotenos constituyen el otro grupo importante de pigmentos sintetizados por las bacterias fotosintéticas. Existe una gran variedad de estas moléculas, aunque en conjunto responden a unas características estructurales muy parecidas. Son moléculas formadas por una cadena alifática más

o menos larga, con numerosos dobles enlaces conjugados, que son la causa de su alto coeficiente de extinción en el visible (Liaaen-Jensen et al, 1972; Goodoin, 1973). Con cierta frecuencia estas cadenas alifáticas terminan en anillos hidrocarbonados, principalmente aromáticos.

La función de los carotenos en bacterias es objeto aún de especulaciones. Los trabajos pioneros de Duysens, 1952, asignaron a los carotenos una función de antena, transmitiendo la energía de excitación a los centros de reacción. Otra función asignada con frecuencia a los carotenos es la de servir de protector contra la fotooxidación irreversible de la bacterioclorofila en presencia de O_2 (Cohen-Bazire et al., 1958). Recientemente, se ha podido analizar mejor este efecto en centros de reacción purificados. Los centros de reacción aislados del mutante sin carotenos G-9 de R. rubrum se mostraron más fotosensibles que los aislados de la estirpe silvestre que poseen 1 mol de espiriloxantina por centro de reacción (Vadeboncoeur, 1973). También parece que las bacterioclorofilas del centro de reacción pueden perder energía de excitación transmitiéndola a la molécula del caroteno presente en el mismo. Así Cogdell y colaboradores (Cogdell et al., 1975) presentaron evidencias de que los carotenos desenergizan el estado P^R de la bacterioclorofila de los centros de reacción.

En las Rodospiriláceas y Cromatiáceas se observan al microscopio electrónico unas estructuras membranosas que están formadas por invaginaciones de la membrana plasmática (Remsen et al., 1968; Peters et al., 1972). Dichas estructuras se pueden aislar y purificar (cromatóforos) observándose que albergan el aparato fotosintético completo ya que mostraron el mismo espectro que las células intactas (Schachman et al., 1952). Sin embargo, en las Clorobiáceas aparecen

al microscopio electrónico unas estructuras esféricas o elipsoidales que se sitúan próximas a la membrana plasmática pero que no presentan continuidad con ella (vesículas de clorobium) (Pfennig et al., 1967; Halt et al., 1966).

El espectro de absorción de los pigmentos varía ampliamente dependiendo del entorno molecular en el que se encuentren. Un ejemplo muy característico se da en las bacterias púrpuras que "in vivo" presentan una serie de bandas en la región del IR-cercano; sin embargo, cuando se extraen los pigmentos presentan una única banda desplazada hacia longitudes de onda menores (Olson et al., 1966). El mayor número de bandas, así como su distinta situación, de los pigmentos "in vivo", se debe a interacciones pigmento-pigmento (Clayton, 1965; Katz et al., 1973), pigmento-proteína (Fenna et al., 1975) y pigmento-lípido (Fraker et al., 1971). El aislamiento de complejos lo más sencillos posibles que no pierdan las características espectrales de las membranas fotosintéticas, constituyen un método de gran utilidad para conocer algo más sobre las interacciones de los distintos componentes de las membranas fotosintéticas. En este sentido, la utilización precisa de detergentes es fundamental en este tipo de trabajos. Análisis detallado de los espectros de absorción, espectros de dicroísmo circular, espectros de fluorescencia, etc., constituyen métodos usuales en el estudio de las interacciones moleculares de los cromatóforos.

Hasta ahora nos hemos limitado a hacer un análisis muy somero de los pigmentos del aparato fotosintético. Estos cromóforos están conectados con una serie de componentes de los cromatóforos y que en conjunto constituyen lo que se denomina "unidad fotosintética". Tal unidad fotosintética consta de tres partes muy diferenciadas, tanto estructuralmente como funcionalmente: antena, centro de reacción y cadena de transportadores de cargas.

1.4. ANTENA

La mayor parte de los pigmentos fotosintéticos sirven para captar los fotones y transmitir la energía de excitación a un complejo especial denominado centro de reacción. Uno de los grandes pasos en la evolución del aparato fotosintético viene dado por el desarrollo de un conjunto de moléculas especializadas en la transmisión de energía de excitación a un centro de reacción (Borisov, 1978). Aunque los carotenos también se consideran como parte de la antena, sus pigmentos más representativos son las bacterioclorofilas. Las bandas que se observan en el infrarrojo cercano (IR-cercano) se deben en su mayor parte a la bacterioclorofila de antena, y una mínima proporción a la bacterioclorofila de los centros de reacción.

En la actualidad se conoce muy poco acerca de la estructura y aún menos de cómo funciona la antena. Mediante el uso apropiado de detergentes se han aislado fracciones de antena sin otros componentes del aparato fotosintético (Feick et al., 1978; Cogdell et al., 1978). Sauer y Austin (1978) han aislado el complejo mínimo que conserva las propiedades espectrales de la antena de los cromatóforos. El complejo aislado del mutante sin carotenos R-26 de Rhodospseudomonas sphaeroides está constituido por 2 polipéptidos, 2 bacterioclorofilas y fosfolípidos. Un complejo obtenido a partir de la estirpe silvestre presentó 2 polipéptidos, 3 bacterioclorofilas, carotenos y fosfolípidos. Con la bacteria Rhodospseudomonas capsulata también se han conseguido resultados satisfactorios (Feick et al., 1978); sin embargo las membranas de R. rubrum son más sensibles al tratamiento con detergentes, lo que provoca una destrucción de las fracciones cuando se intentan obtener complejos de bajo peso molecular. El complejo mínimo que se ha aislado de esta bacteria es de 400 K daltons (Sauer et al., 1978). Todos los polipéptidos asociados a la antena son de bajo peso molecular. Se cree

que la antena está constituida por una serie de agregados, favorecidos por las interacciones moleculares anteriormente descritas, aunque se desconoce su tamaño y su distribución en la membrana.

Los mecanismos bajo los cuales tiene lugar la migración de energía en la antena se desconocen. Modelos teóricos han sido elaborados para intentar explicar estos mecanismos: la migración tipo Förster supone que la excitación está siempre localizada sobre una molécula definida; el mecanismo tipo excitón, prevee que la excitación se deslocaliza sobre un conjunto de moléculas; el mecanismo tipo exciton localizado, supone que la energía de excitación se localiza sobre un grupo limitado de moléculas, sería un caso intermedio entre los dos anteriores. No obstante, ninguno de los modelos explica satisfactoriamente las características observadas de la antena. Para llegar a idear un modelo de migración de energía sería necesario un conocimiento profundo de la ordenación estructural de las distintas moléculas que constituyen la antena. Las distancias intermoleculares parece que tienen una importancia capital, para que la migración tenga lugar. Dicha migración debe ser muy rápida ya que mediante un fluorímetro de fase se ha detectado inducción de fluorescencia con una vida media ($t_{1/2}$) de varios picosegundos (Barsky et al., 1974).

1.5. CENTROS DE REACCION

Los trabajos pioneros de Duysens, 1954, demostraron la existencia de una pequeña proporción de bacterioclorofila que sufría cambios espectrales reversibles por efecto de la luz actínica. Unos años más tarde, mediante tratamiento con diversos oxidantes químicos, se pudieron diferen

ciar claramente dos tipos distintos de bacterioclorofila. En presencia de los reactivos químicos, la mayor parte de la bacterioclorofila se oxidaba irreversiblemente, mientras que una pequeña proporción, entre un 2-3% del total, era más resistente al efecto de los oxidantes (Loach et al., 1963). Estos pigmentos resistentes al tratamiento presentaron un espectro característico, con máximos en el IR-cercano a 865 nm y 760 nm, en Rodospiriláceas con bacterioclorofila a. Estos resultados apuntaban hacia la idea de que en el aparato fotosintético bacteriano existían unos pigmentos situados en un entorno especializado que los protegía del efecto de los tratamientos químicos; a tales complejos se les denominó centros de reacción.

El aislamiento de un mutante no fototrófico de Rp. sphaeroides (Sistrom et al., 1964) que contenía bacterioclorofila normal y que fue incapaz de realizar reacciones fotoquímicas, confirmaba la esencialidad de los centros de reacción para un crecimiento fototrófico.

En estas circunstancias se hacía inminente el aislamiento del complejo causante de los fenómenos observados. Los primeros intentos se hicieron con mutantes que carecían de carotenos, utilizando el detergente Triton X-100. Se obtuvieron fracciones parcialmente purificadas de los mutantes G-9 de R. rubrum (Gingras et al., 1969) y R-26 de Rp. sphaeroides (Reed et al., 1968), pero fue necesario poner nuevos métodos a punto hasta llegar a obtener centros de reacción prácticamente puros. En estos métodos la elección conveniente del tipo de detergente como la concentración óptima son los pasos esenciales para poder llegar a fracciones con un alto grado de pureza. Se han aislado centros de reacción muy puros de Rp. sphaeroides (Jolchine et al., 1974); Rp. sphaeroides R-26 (Feher, 1971); R. rubrum (Noel et al., 1972);

R. rubrum G-9 (Okamura et al., 1974); Ch. vinosum (Lin et al., 1975). Otras fracciones menos puras se han obtenido de Rp. capsulata sin carotenos (Nieth et al., 1975); Rp. gelatinosa (Clayton et al., 1975); Ch. limicola (Olson et al., 1973).

Pocos campos de la fotosíntesis han tenido un desarrollo tan espectacular en los últimos años, como el estudio de los centros de reacción. Su aislamiento ha permitido obtener una amplia información sobre su composición y propiedades físico-químicas. Los centros de reacción son unos complejos de proteína-pigmentos, constituidos por 3 polipéptidos, Rp. gelatinosa sólo posee 2 cadenas polipeptídicas, (Clayton et al., 1978; Okamura et al., 1974; Noel et al., 1972; Nieth et al., 1975), 4 moléculas de bacterioclorofila a y 2 moléculas de bacteriofeofitina (Straley et al., 1973; van der Rest et al., 1974), 1 mol de carotenos por centro de reacción, alrededor de 1 mol de quinonas (Q) y de Fe por centro de reacción y una pequeña proporción de pteridinas. El análisis de los pigmentos (Straley et al., 1974) ha permitido concluir que la bacterioclorofila de centro de reacción es químicamente idéntica al resto de la bacterioclorofila a bacteriana. En todos los centros de reacción se ha encontrado bacterioclorofila a excepto en Rp. viridis que presenta bacterioclorofila b.

Los centros de reacción muestran un espectro de absorción característico: en su estado reducido muestran bandas de absorción a 865 (P870), 802 (P800), 600 y 390 nm adscritas a bacterioclorofila; las bandas existentes a 755 y 540 se adscriben a la bacteriofeofitina; alrededor de 500 nm aparecen unas bandas pequeñas que se deben al caroteno. En estado oxidado se decolora casi totalmente la banda del P870; el P800 se desplaza hacia longitudes de onda menores y se decoloran parcialmente las bandas de 600 y

390 nm. así como ligeros desplazamientos de las bandas de la bacteriofeofitina y de los carotenos. El espectro a bajas temperaturas presenta alteraciones: se observa un desplazamiento de la banda de 865 nm hacia longitudes de onda mayores y la banda a 540 nm se resuelve claramente en dos, a 532 y 544 nm (Clayton et al., 1976). Mediante análisis de los espectros de dicroísmo, Vermeaglio y Clayton (1976) han concluido que el P870 presenta dos bandas, una a 865 y otra a 810 nm; cuando se oxida aparece una decoloración a 865 nm y a 810 nm, apareciendo al mismo tiempo una banda positiva centrada a 790 nm lo que provoca aparentemente un desplazamiento de la banda del P800.

A pesar de la simplicidad, en cuanto a composición, de los centros de reacción, aún se pueden obtener fracciones más pequeñas con actividad fotoquímica. Es interesante definir el tamaño mínimo del centro de reacción desde un punto de vista funcional. En este sentido, Okamura y colaboradores (1974) han separado, mediante gradiente de sacarosa en presencia de LDAO y SDS, una fracción con las dos subunidades peptídicas de menor peso molecular (b y c) de los centros de reacción aislados de Rp. sphaeroides R-26. Dicha fracción contenía todos los pigmentos y conservó totalmente la actividad fotoquímica de los centros de reacción completos, aunque perdieron prácticamente la totalidad del Fe. A la vista de estos resultados, los autores concluyeron que la subunidad a no interviene en la fotoquímica primaria, y que el complejo restante constituye la partícula mínima, aislada hasta ahora, que conserva las propiedades fotoquímicas de los centros de reacción. Cuando se ha intentado separar las subunidades b y c el complejo se desnaturaliza y se pierden todas las propiedades fotoquímicas.

La obtención de centros de reacción puros ha hecho posible el análisis de los mecanismos que subyacen en el

proceso de la separación de cargas, mediante el cual el donador primario (P870) se oxida y el aceptor primario (posiblemente un complejo Q-Fe) se reduce. A este proceso se le ha denominado acto fotoquímico primario. Se han detectado varios estados transitorios posteriores a la oxidación del donador primario y antes de que se reduzca el aceptor primario. El estado P^F (Parson et al., 1975; Rockley et al., 1975) ha sido detectado como intermediario en la fotoquímica primaria. Aparece como consecuencia de la oxidación del donador primario la reducción de la bacteriofeofitina presente en los centros de reacción. Este estado P^F lleva consigo una decoloración a 865, 600, 540 y 760 nm que corresponden a las bandas de absorción del donador primario y de la bacteriofeofitina. Recientemente se ha descrito que el P800 también actúa como un intermediario en la separación de cargas en los centros de reacción (Shuvalov et al., 1978).

Para terminar este apartado sobre los centros de reacción, sería interesante hacer algunos comentarios sobre el aceptor primario. Para asignar la función de aceptor primario a un determinado compuesto, es preciso definir previamente qué se entiende por aceptor primario. Según Bolton, (1978), aceptor primario se considera a aquel compuesto que acepta electrones procedentes del donador primario después de un tiempo aproximado de unos 100 ns. Con esta premisa se excluyen como aceptores primarios los estados tripletes de la bacterioclorofila (Wraight et al., 1974), el estado P^F (Rockley et al., 1975) o la formación de un anión radical que absorbe a 800 nm (Shuvalov et al., 1978). Según esto los candidatos más probables como aceptor primario serían el Fe, la UQ o el complejo UQ-Fe, si se tiene en cuenta su relación equimolecular con el donador primario en los centros de reacción. Algunos experimentos demuestran que el Fe no funciona como aceptor primario: los complejos mínimos

con las subunidades b y c mantienen todas las propiedades fotoquímicas, a pesar de su bajo contenido en Fe; la sustitución del Fe por Mg no afectó los niveles de fotooxidación del P870 (Feher et al., 1974); preparaciones de centro de reacción con menos del 90% de Fe no afectó a los niveles de fotooxidación del P870 en R. rubrum (Loach et al., 1972); espectros Mossbauer indican que el Fe^{2+} no cambia de valencia cuando se reducen los centros de reacción de Rp. sphaeroides con ditionito sódico (Feher et al., 1974).

Existen fuertes evidencias para adscribir la función de aceptor primario a la UQ, al menos en algunas bacterias. Okamura y colaboradores (1975) han encontrado dos tipos de UQ en centros de reacción de Rp. sphaeroides R-26, diferenciados en su afinidad a los centros. Cuando extrajeron la que se unía más debilmente, no se modificó la actividad fotoquímica del P870, sin embargo cuando se removió toda la UQ, desapareció paralelamente la actividad fotoquímica. Al añadir la UQ extraída apareció de nuevo la actividad. Esto sugiere fuertemente que la UQ es esencial para que pueda ocurrir la separación de cargas en los centros de reacción de Rp. sphaeroides. En Ch. vinosum no se afectó la actividad fotoquímica cuando se removió completamente la UQ, pero fue necesario extraer toda la menaquinona para que cesara la actividad (Okamura et al., 1976). Dichos autores propusieron en esta bacteria que la menaquinona actúa como aceptor primario. Análisis de otros centros de reacción apoyan la idea de que un compuesto del tipo de los quinonas puede actuar como aceptor primario en bacterias.

1.6. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN FOTOSINTESIS BACTERIANA

Los fotones son absorbidos por la antena que cana

6472135035

liza la energía de excitación hasta los centros de reacción, en donde tiene lugar la separación de cargas, apareciendo un compuesto fuertemente oxidante (el P870⁺) y un radical fuertemente reductor (la semiquinona). Esta situación es el origen de una serie de procesos de recombinación de cargas en la que están involucrados transportadores redox de la membrana de los cromatóforos. En estas reacciones sucesivas tiene lugar una disminución neta de energía libre que es aprovechada entre otras cosas, para sintetizar ATP, una forma de energía química aprovechable por la célula. El electrón, a través de las reacciones redox que tienen lugar en la membrana, vuelve otra vez al donador primario de donde partió, completándose así el ciclo. Componentes conocidos de este sistema de transporte cíclico son: quinonas, citocromos, ferredoxinas, compuestos con flavinas, etc.

Quinonas: Este tipo de compuestos son muy abundantes en bacterias fotosintéticas. Existen varios tipos de quinonas en bacterias, pero la más abundante es la ubiquinona-10. Aparte de la UQ envuelta probablemente en la fotoquímica primaria (apartado anterior), existe un conjunto de UQ consideradas como transportadores que se mueven a través de la membrana. Estas moléculas pueden recibir electrones del aceptor primario, tomando el papel de aceptores secundarios. La asignación de aceptores secundarios se deriva fundamentalmente de experimentos utilizando dos destellos separados convenientemente: en un primer pulso, ocurre la reducción del aceptor primario; si damos otro pulso suficientemente próximo, de tal manera que el donador ya se haya reducido y el aceptor primario aún continúe reducido, no se observa actividad fotoquímica alguna (Parson, 1969). Una separación gradual de los pulsos nos da una idea de la velocidad con que el aceptor primario reduce a los aceptores secundarios.

Por otra parte, Case y colaboradores (1970) encontraron que la actividad fotoquímica detectada en un segundo destello era variable de unas preparaciones de subcromatóforos a otras. Dicha actividad estaba relacionada con la cantidad de UQ presente en las preparaciones. Por otra parte, cromatóforos de R. rubrum a los que se les ha extraído la UQ son incapaces de fosforilar (Yamamoto et al., 1970) o de reducir citocromo C₂ exógeno (Higuti et al., 1975). Asimismo, la O-fenantrolina, un conocido inhibidor de la UQ, bloquea las reacciones que habían sido reconstituidas al añadir la UQ que se había extraído previamente (Halsey et al., 1974).

Todos estos resultados demuestran que las quinonas actúan como transportadores redox en las membranas fotosintéticas.

Citocromos: Estas proteínas hemínicas constituyen un grupo de transportadores redox por excelencia en todos los sistemas biológicos y son muy abundantes en bacterias fotosintéticas, aunque describiremos someramente sólo aquellos citocromos que están mejor caracterizados y que intervienen en los procesos fotosintéticos.

En algunas especies de Rodospiriláceas se ha caracterizado bastante bien un citocromo de tipo C, el cit C₂, que actúa como donador directo de electrones para el P870⁺ (Dutton et al., 1975; Jackson et al., 1973; Evans et al., 1974). Esta proteína tiene un potencial medio (Em) de unos 300 mv a pH 7.0. Este compuesto es móvil y se encuentra principalmente en el espacio periplásmico en las células intactas. En condiciones de baja temperatura, este citocromo no sufre fotooxidación (Kihara et al., 1969), lo que hace suponer que las distancias entre este citocromo y el donador primario son relativamente grandes. Los cambios de absorción de este citocromo

puéden analizarse a 550-551 nm (banda α) y alrededor de 420 nm (banda γ).

En las Cromatiáceas y algunas Rodospiriláceas se han detectado dos clases de citocromos de tipo C: uno de bajo potencial, el C553 ($E_m \approx 0$ mv), y otro de alto potencial, el C555 ($E_m \approx 300$ mv). Ambos citocromos pueden servir de donadores para el centro de reacción oxidado después de un destello (Parson, 1969). Estos citocromos se encuentran fuertemente unidos a la membrana y se obtienen en su totalidad en las preparaciones de cromatóforos; esta afinidad hace que a bajas temperaturas sufran fotooxidaciones (Chance et al., 1960).

Se han caracterizado medianamente algunos citocromos de tipo b. El mejor estudiado es el cit b50, que se cree tiene una importancia capital en el flujo cíclico de electrones. Sus cambios de absorción se pueden analizar a 560 nm (banda α), de ahí que en la literatura también se le denomine cit b560. Varios trabajos demuestran que este citocromo sufre variaciones redox en el orden de ms después de un destello (Prince et al., 1975; Petty et al., 1976). Su oxidación después de un pulso corto parece estar acoplada con la reducción de los citocromos de tipo C. La transferencia de cargas entre los cit b y c se inhibe por los compuestos Antimicina A y HOQNO (Izawa et al., 1972; Slater, 1973), que inhiben asimismo la fotofosforilación. Por otra parte, con la adición de ATP a una suspensión de cromatóforos de R. rubrum (Baltscheffsky, 1967) se puede invertir la reacción entre los cit b50 y C_2 . Estos datos apoyan la idea de que entre ambos citocromos existe un sitio de fosforilación.

Ferredoxinas (Fd): Varios tipos de Fds se han aislado de membranas fotosintéticas bacterianas (Prince et al.,

1975; Yock et al., 1975). Algunas de ellas se han caracterizado por su señales EPR: una con un $g = 1,9$, similar a la descubierta por Rieske y colaboradores (1964) en mitocondrias; otra con un $g = 1,94$; se ha detectado también una proteína férrica de alto potencial (Hi PIP) con propiedades similares a la descubierta por Ingledew y Ohnishi (1975) en mitocondrias. La funcionalidad de estas proteínas permanece desconocida. No se han encontrado señales adscritas a Fds, en espectroscopía de destellos, sin embargo se ha observado la oxidación de la Fd con $g = 1,90$ después de varios minutos de iluminación (Prince et al., 1975).

Flavinas: Las flavinas también son constituyentes del aparato fotosintético de bacterias. Sin embargo se desconoce de que compuestos forman parte como grupos prostéticos y su función en las reacciones fotoquímicas.

Con estos comentarios acerca de los transportadores redox, hemos completado una descripción somera del aparato fotosintético de bacterias. En esta descripción hemos dado especial atención a las bacterias púrpuras, ya que son las mejor caracterizadas y un representante típico de las Rodospiriláceas, R. rubrum, es el material de trabajo de esta Tesis.

1.7. UTILIZACION DE MUTANTES COMO METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LA FOTOSINTESIS BACTERIANA

La mayor parte de los trabajos que se han hecho sobre fotosíntesis han consistido en caracterizar una serie de reacciones y en ocasiones aislar el compuesto o los compuestos que los provocan, en la estirpe silvestre. Otra metodología para analizar la esencialidad de un compuesto,

consiste en extraerlo, analizar la reacción que desaparece, añadir de nuevo el compuesto extraído y ver que la actividad se recupera. Esta metodología tiene varios inconvenientes, ya que con frecuencia se extraen otros cofactores al mismo tiempo y, además durante la extracción se puede dañar seriamente la integridad de la membrana, con lo cual se puede llegar a conclusiones erróneas.

El método de aislar mutantes deficientes en alguna de las propiedades del aparato fotosintético ha sido poco usual en las investigaciones sobre fotosíntesis. No obstante algunos ejemplos se han descrito en la literatura en organismos con dos fotosistemas (Levine, 1969; Bishop, 1973; Delaney et al., 1976) y en bacterias (ver revisión hecha recientemente por Saunders, 1978). El estudio de mutantes de bacterias fotosintéticas tiene el inconveniente de que no existe un buen análisis genético en estos microorganismos lo que imposibilita el análisis de la mutación o mutaciones que operan en los mutantes que se obtienen. Sin embargo, esto no es inconveniente para asignar una función esencial a una actividad que desaparece paralelamente a la falta de crecimiento bajo condiciones fototróficas.

1.8. OBJETIVO DE NUESTRO TRABAJO

El trabajo que se presentará en esta memoria está dentro de la línea que se sigue en nuestro laboratorio desde hace varios años: aislar mutantes no fototróficos que carecen de una actividad característica del aparato fotosintético de la estirpe silvestre y obtener revertientes espontáneos para recuperar su capacidad de crecer a expensas de la energía luminosa. Con los mutantes no fototróficos se pretende poder determinar algunas de las actividades esenciales

en fotosíntesis, y si es posible, adscribir la falta de actividad a la ausencia o modificación de algún componente de la membrana. Con los revertientes, se pretende analizar cómo afecta la reversión sobre la estructura y función de algunos componentes de las membranas fotosintéticas y sobre las propiedades fisiológicas en su conjunto, en condiciones fototróficas.

Hemos elegido R. rubrum como material de trabajo, debido a las posibilidades que ofrece dicha bacteria: se conocen muchas de las actividades del aparato fotosintético, lo que, facilita nuestro tipo de análisis, y se puede cultivar en condiciones respiratorias o fototróficas utilizando los mismos sustratos. Sin este crecimiento ambivalente sería muy difícil llevar a cabo el tipo de análisis que nosotros pretendemos. En condiciones respiratorias, esta bacteria sintetiza todo el aparato fotosintético cuando las tensiones de O_2 en el medio son pequeñas, ya que el O_2 reprime la formación de los cromatóforos, tanto en presencia como en ausencia de luz (Cohen-Bazire et al., 1975).

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS

El material objeto de nuestro estudio ha sido la bacteria Rhodospirillum rubrum (von Esmarch, 1887) es tirpe S-1, cedida por el Prof. Dr. D.I. Arnon (Universidad de California, Berkeley). Su forma característica es la de espirilo móvil, gracias a sus flagelos polares, aunque puede variar ampliamente así como su tamaño dependiendo de las condiciones de cultivo. El espectro de los pigmentos (Olson et al., 1966) así como el aspecto al microscopio óptico han sido los controles usados para asegurarnos de que se trataba de la bacteria en cuestión y de que los cultivos no estaban contaminados con otros microorganismos. El espectro de los pigmentos posee en el infrarrojo cercano dos máximos característicos, uno a 878 nm y otro mucho menor a 803 nm.

La bacteria R. rubrum tiene su habitat natural en aguas estancadas con materia orgánica en descomposición. Ocupa estratos inferiores a las algas, con poca aireación y escasa iluminación. En el laboratorio se puede cultivar en condiciones respiratorias o fotosintéticas, en ambos casos puede utilizar los mismos sustratos: ceto e hidroxiaácidos, ácidos grasos de cadena corta, etc. Este crecimiento ambivalente hace de esta bacteria un organismo muy apropiado para usos de investigación, especialmente si se desea trabajar con mutantes no fototróficos ya que los cultivos aeróbicos sintetizan el aparato fotosintético completo cuando la tensión de O_2 en el medio de cultivo es deficiente.

También se han usado los mutantes no fototróficos, F24, T102, T91, T83 y T78, así como algunos revertientes

fototróficos de dichos mutantes, todos ellos obtenidos en nuestro laboratorio. Además se utilizó el mutante sin ca rotenos G9 cedido por el Prof. G. Gingras (Universidad de Montréal, Canadá).

2.1.2. PRODUCTOS QUIMICOS

Los reactivos utilizados a lo largo de la reali zación de este trabajo fueron de grado analítico.

La mayoría de los reactivos químicos comercia- les se obtuvieron de E. Merck (Darmstard, Alemania) y Fisher Scientific Company (Lawn, New Jersey) exceptuando los enzimas, los nucleótidos, los abdómenes de luciérna- ga, el Triton X-100, el DCIP, el HQNO, la Gramicidina D, la Antimicina A, el TCS, el FCCP, la alúmina, la δ -biotina, el ac. L-glutámico, el Ficoll y la DEAE-Celulosa de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri); el Extracto de levadura y el Agar, de Difco Laboratories (Detroit, Michi- gan); la DEAE-Sephadex de Pharmacia (Upsala, Suecia); el ac. nicotínico de ICN Pharmaceuticals, Inc (Cleveland, Ohio); el argon N-50 y N₂ purísimo de la Sociedad Española de Oxígeno y el LDAO de Milmaster Onyx International (Fairfield, New Jersey).

Todos los productos se disolvieron en H₂O desti- lada excepto HQNO, Antimicina A, Gramicidina D, TCS y FCCP para los que se empleó metanol.

2.1.3. APARATOS

a) Cámaras frías: Todas las manipulaciones para las que se necesitaban temperaturas bajas se llevaron a ca bo en una cámara fría regulada entre 2-4°C. Los productos, disoluciones y cultivos sólidos en agar inclinado se con-

servaron en un frigorífico regulado a 4°C, provisto de un pequeño congelador. La colección de estirpes se guardó en un frigorífico KOSKA mantenido a -20°C.

b) Agitadores: Los cultivos en la oscuridad se desarrollaron generalmente sobre una plataforma de agitación modelo G-10 de New Brunswick Scientific Co., Inc. (New Brunswick, New Jersey) regulado a 180 r.p.m., que se encontraba en una cámara regulada a 30°C mediante un sistema de calentamiento y refrigeración. Otras veces se utilizaron agitadores modelo G-25 de la misma marca que el anterior pero con regulación de temperatura propia. En algunas ocasiones se manejó un baño de agua con plataforma giratoria modelo Aquatherm de New Brunswick Scientific Co., Inc. (New Brunswick, New Jersey) termostatzado a 30°C y regulado a 200 r.p.m.

c) Espectrofotómetros: Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi modelo 356 (Tokio, Japon) equipado con un registrador Perkin-Elmer modelo 56 (Norwalk, Connecticut) y en un Cary modelo 14R.

El Hitachi va equipado con dos monocromadores en los que puede fijarse igual o distinta longitud de onda. Ambas se pueden utilizar como referencia o como medida. Este aparato consta de dos cámaras de cubetas, una muy cerca del fotomultiplicador y la otra más distante. La posición más cercana es apta para hacer medidas de muestras turbias ya que el ángulo sólido de medida es muy grande. También en esta posición puede utilizarse la forma de operación "DUAL"; es decir, los dos rayos, referencia y medida de distinta λ , van a la misma cubeta, con lo cual se eliminan problemas de difusión de luz así como cambios

inespecíficos que puedan aparecer al iluminar la muestra de ensayo. Se pueden adaptar diversos fotomultiplicadores, los usados a lo largo de la realización de este trabajo, fueron los modelos R377 (visible) y R473 (infrarrojo) de Hamamatsu Co., Ltd., que permiten en conjunto hacer medidas entre 300-1200 nm con buena sensibilidad. Delante del fotomultiplicador se puede colocar un soporte para los filtros utilizados como protectores de la luz actínica. El tiempo medio de respuesta del aparato es de 0,1 seg. y la sensibilidad máxima de 10^{-4} unidades de absorción. Los monocromadores, que pueden seleccionar longitudes de onda comprendidas entre 280 y 1224 nm, poseen un sistema automático de barrido que permite trazar espectros directamente. La fuente de luz de medida está formada por dos lámparas, una de deuterio y otra de ioduro de tungsteno, que se utilizan para medir en el ultravioleta y visible e infrarrojo respectivamente. Para inducir cambios de absorción, el espectrofotómetro Hitachi va equipado de una fuente lateral de luz actínica que consta de una lámpara DWY (General Electric, Cleveland, Ohio) de 650 W de haluro de tungsteno que emite en el ultravioleta, visible e infrarrojo cercano, de un espejo y de una lente. El sistema de luz actínica posee adicionalmente un obturador para controlar el tiempo de iluminación, de un autotransformador para regular la intensidad de la luz así como de un soporte para situar los filtros que se utilicen para seleccionar convenientemente la luz actínica. No obstante, en nuestras medidas de cambios fotoquímicos hemos utilizado con más frecuencia otro sistema de luz actínica cuyo rayo procedía de un proyector de diapositivas. El espectrofotómetro va refrigerado con agua para evitar el excesivo calentamiento.

El espectrofotómetro Cary modelo 14R posee un solo monocromador, es decir, sólo se podía elegir una longitud

de onda cuyo rayo se dirigía a ambas cubetas, muestra y referencia. La cámara de cubetas está bastante alejada del fotomultiplicador con lo cual las interferencias por luminiscencia eran menores que en el caso del Hitachi, aunque las interferencias por dispersión de la luz eran mayores. El monocromador era movido automáticamente con velocidad variable, permitiendo registrar espectros directamente entre 200 y 1500 nm. La sensibilidad máxima del aparato era de 10^{-3} unidades de absorción. El sistema de iluminación actínica lateral consta de una lámpara Sylvania de 650 W de haluro tungsteno, una lente convergente, un autotransformador para regular la intensidad de la luz, una placa metálica que impedía o facilitaba el paso de la luz actínica dependiendo de su posición y una cavidad para soporte de los filtros que se podía llenar de agua para evitar el calentamiento de los filtros que absorbía los rayos infrarrojos. Además, el Cary posee el denominado "Mode IR2" formado por una fuente de luz actínica infrarroja muy intensa que se utiliza para inducir cambios fotoquímicos que se saturan difícilmente. El rayo actínico era de la misma dirección que el rayo de medida. En todos los demás sistemas de luz actínica expuestos anteriormente, el rayo de luz actínica fué perpendicular al rayo de medida.

Aparte de estos espectrofotómetros complejos se utilizaron otros más simples: un Gilford Micro-Sample, modelo 300 N (Oberlin, Ohio), un Bausch and Lomb, modelo Spectronic 340 y un Bausch and Lomb, modelo Spectronic 710 (Rochester, New York).

Para la realización de algunos espectros se acopló al espectrofotómetro Hitachi un pequeño ordenador Tracor Northern, modelo NS-570 que permite hacer algunas operaciones con los espectros.

d) Filtros Ópticos: Para las medidas espectrofotométricas se emplearon filtros de color e interferenciales que servían para seleccionar el rayo actínico o para proteger al fotomultiplicador. Se utilizaron una serie de filtros tipo PIL 1 de Schott Mainz con una transmisión máxima alrededor del 40% y una banda mitad de unos 14 nm. Se usaron también filtros de color de Balzers y de Baird Atomic que seleccionaban una zona del espectro o absorbían completamente los rayos visibles o infrarrojos. Asimismo se emplearon filtros neutros con diversos grados de transmisión para controlar la intensidad de la iluminación actínica.

e) Electrodo de oxígeno: Para medir las tensiones de O_2 en una solución se usó un sistema formado por un electrodo polarográfico Clark modelo TXI 5331, una unidad de polarización y amplificación modelo 53 y un baño termostatzable con cuatro cubetas, modelo 5301. Todo el equipo es de la marca Yellow Springs Instrument Co. (Yellow Springs, Ohio). Al aparato se le conectó un registrador Radiometer Copenhagen modelo Servograph REA 112 (Copenhague, Dinamarca).

f) pHmetros: A lo largo de este trabajo se utilizaron dos tipos de pHmetros, un Radiometer Copenhagen con un electrodo combinado modelo GK2321C de la misma marca y un Metrohm Herisau modelo pH-Meter E39613 conectado a un electrodo Metrohm AG9100 Herisau. Al pHmetro Radiometer Copenhagen se le acopló un titulador automático modelo Titrator 11 que regula el flujo de la solución neutralizante mediante una válvula magnética modelo MNV1, ambos de la misma marca que el pHmetro.

g) Termostatos: Para ensayos en los que era preciso regular finamente la temperatura se usó un termostato Lauda modelo K2 RD (Lauda Tauber, Alemania) que regula variaciones de $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$ gracias a un sistema de calefacción y refrigeración simultáneo. Para requerimientos menos precisos se utilizaron termostatos Gricel (Barcelona, España).

h) Centrífugas: Normalmente las centrifugaciones se llevaron a cabo en una Sorvall Superspeed RC2-B (Norwalk, Connecticut) refrigerada a 4°C . Las centrifugaciones a temperatura ambiente se hicieron en una Wifug modelo X-1 (Estocolmo, Suecia). Para ultracentrifugaciones se utilizaron las Beckman modelo L y modelo L2-6513 (Palo Alto, California) así como la Sorvall modelo OTD-65 (Norwalk, Connecticut).

i) Agitadores magnéticos: En los ensayos de fosforilación en células enteras se utilizó un agitador magnético Radiometer Copenhagen, modelo 22 (Copenhague, Dinamarca). A pesar de que el motor tenía velocidad constante se consiguieron velocidades de agitación diversas, gracias a las posibilidades de combinaciones en la transmisión del movimiento entre un juego de poleas múltiples. Para agitaciones rutinarias se operó con agitadores Metrohm modelo E349 (Suiza).

j) Material de cultivo y lámparas: El material de vidrio para cultivos fué en general de la marca Pyrex (París, Francia) y Sovirel (Levallois-Perret, Francia) con resistencia suficiente para ser esterilizables. Para cultivos en la oscuridad se utilizaron erlenmeyer de 100 ml con tapón de CAP-0-Test (Suiza), 250 ml, 1 l y 2 l. Los cultivos fotosintéticos se efectuaron en tubos cilíndri-

cos (33 x 2,5 mm) con tapón de rosca que cierran herméticamente y botellas cilíndricas de 10 y 12 l de capacidad. La iluminación de los cultivos fototróficos se consiguió mediante una batería de lámparas incandescentes Osram (Madrid, España) y Laes (Madrid, España), ambas de 100 W.

k) Proyectores: Para la iluminación actínica en el espectrofotómetro Hitachi se utilizó un proyector de diapositivas equipado con una lámpara halógena de 24 V y 150 W. En los ensayos de fosforilación en cromatóforos e inhibición de la respiración por luz, ésta se suministró con el mismo proyector de diapositivas sin filtro infrarrojo.

l) Radiómetro: La intensidad de luz se midió con un radiómetro YS1 modelo 56A de Yellow Springs Instruments Co. (Yellow Springs, Ohio) cuya respuesta se mantiene lineal desde 300 a 2700 nm.

ll) Morteros: En general las células se trituraron en morteros manuales de dimensiones variable dependiendo de la masa celular empleada. En algunas ocasiones se empleó un mortero automático marca Retsch modelo RMO (Haan, Alemania) con un cronómetro para controlar el tiempo de trituración y un sistema capaz de variar la presión del vástago sobre el mortero.

m) Aparato de electroforesis: La migración de proteínas de cromatóforos y centros de reacción se desarrolló en un aparato marca Canalco diseñado para 12 tubos, con las cubetas inferior y superior de forma circular apoyadas sobre un trípode e independientes una de la otra pudiéndose girar al momento de operar con los tubos. La cubeta superior se cerraba con una tapadera perfectamente adaptada a la misma, en donde iba uno de los electrodos que hacía conexión mediante un vástago con el tampón de

electroforé^sis. Los electrodos se conectaron a una fuente de alimentación también de la marca Canalco que posee tres canales independientes a donde pueden conectarse si multáneamente tres cubetas diferentes. Dicha fuente mantenía constante la intensidad de corriente.

n) Aparato para medir luminiscencia: Cuando se añade ATP a una solución de luciferina-luciferasa, la mezcla se hace fluorescente. Para determinar dicha fluorescencia se disponía de una cámara de madera oscura con un soporte para mantener la cubeta de ensayo, enfrente de la cual va una ventana conectada con un fotomultiplicador marca EMI Electronics modelo 9559B (Hayes, Inglaterra), de tal manera que el ángulo sólido es máximo. Entre el soporte de la cubeta y el fotomultiplicador hay un obturador fotográfico que se abre al cerrarse la cámara de madera permitiendo en este momento que la luz llegue al fotomultiplicador. El cátodo de dicho fotomultiplicador va conectado a una fuente de alta tensión marca Keithley Instruments modelo 244 (Cleveland, Ohio) con una tensión de 800 V. El ánodo va conectado a un amplificador marca Keithley Instruments modelo 427 (Cleveland, Ohio) que proporciona una ganancia de 10^7 voltios/amperio. El sistema se completaba con un registrador marca Radiometer Copenhagen modelo Servograph REA 112 (Copenhagen, Dinamarca) conectado al amplificador.

ñ) Espectrofotómetro EPR: Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) se llevaron a cabo en un Bruker Spectrospin, modelo B-ER-418_S, que trabajaba em la banda X. El tiempo medio de respuesta del aparato era de 0,2 s. La cámara de resonancia estaba adaptada para inducir reacciones fotoquímicas ya que poseía una rejilla lateral que dejaba pasar la luz. Existía un juego

de cavidades de formas rectangulares y cilíndricas, con distinta capacidad, en donde se colocaba la muestra. La señal aparecía en una pantalla según se iba haciendo el barrido del campo. El espectrofotómetro iba refrigerado por agua. Se acopló al aparato un ordenador Nicol, No 1180 con un programa LAB II , que permitía operar con los espectros.

o) Aparatos utilizados en los experimentos de espectroscopía de destello: La muestra se colocaba en cubetas de 1 x 1 cm, que se introducían en una estructura metálica de color negro, con varias ventanas laterales aptas para iluminar la muestra. La luz actínica procedía de una lámpara Strobflash de General Electric; la duración del destello era de 2-3 μ s. La luz de medida procedía de una lámpara de tungsteno de 650 W. Dicha luz de medida se seleccionaba mediante un monocromador Bausch and Lomb. La alimentación de la lámpara se suministraba con una fuente de alimentación Kepco que mantenía el voltaje constante. Las señales se detectaban con un fotomultiplicador 9558. Dichas señales se podían promediar y operar con ellas en un promediador Biomation, modelo 102. Las señales aparecían en la pantalla de un osciloscopio Tektronix 543B. El obturador fotográfico usado era de la marca Ealing modelo 22-8411, accionado eléctricamente, con el cual se podía seleccionar el tiempo que la luz de medida llegaba a la muestra y por tanto al fotomultiplicador. En algunos experimentos se pasaban las cinéticas de la pantalla del osciloscopio a un registrador X-Y Hewler Packar, N° 7044A, con lo cual se podían analizar mejor las señales. En ciertas ocasiones se utilizó un Dye Laser Candela, N° SLL66, como fuente de luz actínica. El tiempo medio de respuesta del conjunto de todos los aparatos conectados era de unas 10 μ s.

2.2. METODOS

2.2.1. MEDIO DE CULTIVO

Tanto en condiciones respiratorias como fototróficas se usó el medio descrito por Lascelles, 1956, enriquecido con 0,2% de Extracto de levadura. La composición del medio es la siguiente:

Acido L-glutámico	3,3 g
Acido DL-málico	2,7 g
PO ₄ H ₂ K	0,5 g
PO ₄ HK ₂	0,5 g
PO ₄ H(NH ₄) ₂	0,8 g
SO ₄ Mg 7H ₂ O	0,2 g
Cl ₂ Ca	40 mg
Acido nicotínico	1 mg
Clorhidrato de tiamina	1 mg
Biotina	1 mg
Extracto de levadura	2 g
Agua destilada	1 litro

El pH se ajustó a 6,8 con NaOH 5N. Se esterilizó en un autoclave automático de Giralt, S.A. (Gerona, España) a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Para el medio sólido se añadió a la solución anterior 1,5% de agar.

2.2.2. CONSERVACION DE ESTIRPES

La colección de estirpes se guardó a -20°C en medio de cultivo y glicerina esteril (20% v/v), en volúmenes de 5 ml en cada tubo. En estas condiciones las bacterias conservan su viabilidad al menos durante 2 años. Uno de estos tubos se descongelaba y se hacía una siembra

en placa Petri para crecimiento en manto en la oscuridad a 30°C. De aquí se sembraba en agar inclinado que tras su crecimiento en la oscuridad se guardaban en frigorífico a 2-4°C. A partir de estos tubos se preparaban diariamente los preinóculos. Cada semana se hacía una réplica de cada agar inclinado para mantener una buena viabilidad. Cada tres meses aproximadamente se descongelaba uno de los tubos del congelador y se repetía el proceso. Las estirpes se comprobaban registrando el espectro de los pigmentos y cuantificando los niveles de P800.

Cada año aproximadamente se hacía una renovación de la colección mantenida en el congelador. Para ello se hacía un cultivo de cada estirpe en medio sólido y a partir de éste se preparaba otro en medio líquido. Cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial, se tomaban 4 ml del mismo y se añadía 1 ml de glicerina estéril por tubo. Entonces se homogenizaba y se procedía a congelarlos a -20°C.

2.2.3. CULTIVO DE LAS CELULAS EN MEDIO LIQUIDO

Las células utilizadas en los experimentos procedían de cultivos en medio líquido que, según las características del experimento, se crecían en condiciones respiratorias o fotosintéticas.

Para cultivos respiratorios se siguió el siguiente proceso: a partir de un cultivo en agar inclinado se preparó un preinóculo en medio líquido. Cuando el cultivo estaba al final de la fase exponencial, se distribuía en erlenmeyers de 1 l de capacidad llenos hasta 850 ml y tapados con tapón de algodón. Se dejaba crecer toda la noche y a la mañana siguiente se recogían las cé

lulas al final de la fase exponencial, con una D.O. 660 nm = 1,25 y un contenido aproximado de bacterioclorofila de 1,5 nmoles/mg peso seco. A estas condiciones de cultivo las denominaremos condiciones semiaeróbicas.

Para cultivos líquidos en la luz, primero se preparó un preinóculo en la oscuridad, el cual una vez pigmentado se repartía en tubos cilíndricos de 2,5 x 35,5 cm completándolos con medio fresco. Los tubos cilíndricos, con tapón de rosca se colocaron en un baño termostatzado a 30°C aproximadamente. La iluminación se llevó a cabo mediante una batería de luces de 100 W colocadas a unos 12 cm de las paredes del baño. Se dejaron crecer hasta que los cultivos alcanzaron aproximadamente 2 unidades de absorción medido a 660 nm y una concentración de bacterioclorofila de unos 4 nmoles/mg de peso seco.

Para purificar centros de reacción las bacterias se cultivaron en botellas de 10-12 l con una barra imantada en el fondo para remover la suspensión ya que este microorganismo tiende a sedimentar. En unos casos las botellas se metieron en un baño termostatzado a 30°C y en otros casos se dejaron en una cámara termostatzada por aire a 15°C (en estas condiciones el cultivo se mantenía a 30-33°C gracias al calentamiento provocado por la batería de luces). La iluminación se llevó a cabo con 3 focos de 150 W ó 5 focos de 100 W. Los cultivos fototróficos en botellas se crecieron durante 4 días.

En cualquier caso, una vez crecidos los cultivos las células se recogieron a 4°C en centrifugas Sorvall modelos RC2-B y RC-2 a 10.000 x g durante 10 min. Las células destinadas a obtener cromatóforos simplemente, se lavaron una vez con tampón Tricina 50 mM pH 8.0 y se trituraron con alúmina. Las células que se iban a utilizar para

preparar cromatóforos para purificar centros de reacción, tras lavarlas una vez con tampón fosfato 50 mM pH 7,0 se resuspendieron en una mezcla 1:1 de tampón fosfato y glicerina. El volumen de resuspensión era igual al peso húmedo en g de la masa celular.

2.2.4. OBTENCION DE REVERTIENTES FOTOTROFICOS

Un inóculo pigmentado de los mutantes no fotosintéticos se diluyó con medio fresco y se puso a crecer en la luz. Al cabo de un tiempo, que osciló entre 3-7 días dependiendo de las estirpes, los cultivos comenzaron a aumentar de turbidez. Tras dos pases más en la luz, para enriquecer la población de mutantes revertientes fototróficos, se plaquearon en medio sólido y se pusieron a crecer en la oscuridad a 30°C. Aproximadamente 5 días después las colonias habían crecido suficientemente y se procedió al aislamiento al azar de algunas de ellas que se crecieron en tubos de agar inclinado en la oscuridad a 30°C. A continuación, de cada una de las colonias aisladas se prepararon cultivos líquidos en la luz y se registraron los espectros de absorción de los pigmentos en la región del infrarrojo cercano en células enteras resuspendidas en medio fresco y Ficoll (50% v/v) para reducir la dispersión de la luz. Cada colonia aislada se cultivó también en la oscuridad y se guardaron en 20% de glicerol a -20°C para su conservación.

2.2.5. MEDIDAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

La masa celular de un cultivo se estimó viendo la turbidez del mismo en un colorímetro Klett Mfg. Co., In. (New Jersey) modelo 800-3, provisto de un filtro de

cristal rojo nº 68 con un máximo amplio de trasmisión a 680 nm, para estar seguro de que sólo estamos midiendo turbidez. La gráfica de calibrado entre turbidez y masa celular dió una relación de 100 unidades Klett equivalen a $2 \cdot 10^8$ células. ml^{-1} . Para seguir el crecimiento de un cultivo en la oscuridad se utilizaron erlenmeyer de rama lateral que acoplaba perfectamente en la ventana del colorímetro. Para hacer las curvas de crecimiento en condiciones fotosintéticas se usaron tubos herméticamente cerrados con tapón de rosca que acoplaban perfectamente en el aparato de medida.

Otro método utilizado para tener una estimación relativa de la densidad de una suspensión bacteriana consistía en medir la absorción a 660 nm en el espectrofotómetro Gilford ya descrito. Era necesario hacer una curva de calibración con diluciones convenientes resultando ser lineal el aparato entre 0,019 y 0,8 unidades de absorción.

2.2.6. PREPARACION DE CROMATOFOROS

Las bacterias se trituraron con alúmina a razón de 2,5 g/g de peso húmedo de células. En el modo manual se empleó un tiempo de unos 5 minutos para 3-5 g de peso húmedo de células, mientras que en el modo automático se empleó 1 minuto para la misma masa de células. Para obtener centros de reacción purificados se trituraban unos 30 g de peso húmedo de células en un mortero de mayores dimensiones, accionando manualmente durante 25 minutos.

El triturado se extraía con tampón Tricina 50 mM pH 8.0 y se centrifugaba durante 5 min a $2.500 \times g$ en una Sorvall RC2-B refrigerada a 4°C , para sedimentar la alúmina. El sobrenadante se volvía a centrifugar a $27.000 \times g$ durante 15 min en las mismas condiciones anteriores, con

lo cual se conseguía sedimentar las células enteras, la alúmina restante, restos grandes de membrana, paredes celulares, etc. Se recogió el sobrenadante que se sometía a una doble ultracentrifugación a 80.000 x g durante 30-40 min a 4°C en ultracentrífuga Beckman descritas en la sección 2.1.3. apartado h). Se desechaba el sobrenadante poco pigmentado y el sedimento se resuspendía en tampón Tricina 50 mM pH 8.0 y glicerina (50% v/v) ($A_{880 \text{ nm}}^1 \text{ cm} = 20$), que se repartía en tubos y se guardaba a -20°C y en la oscuridad hasta su utilización que no excedía de un mes y medio. A esta mezcla nos referiremos a lo largo de la memoria como solución de cromatóforos. En estas condiciones los cromatóforos conservaban bien todas las propiedades analizadas a lo largo de esta memoria, al menos durante el tiempo descrito.

Cuando los cromatóforos se iban a destinar para extraer los centros de reacción, se utilizó tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0 en lugar de Tricina, las ultracentrifugaciones se efectuaron a 105.000 x g durante 75 min para obtener el máximo rendimiento de membranas pigmentadas y los cromatóforos obtenidos se utilizaron inmediatamente o se guardaron durante un día a 4°C.

2.2.7. DETERMINACION DE LA BACTERIOCLOROFILA

El contenido de bacterioclorofila de una suspensión de cromatóforos se llevó a cabo en los espectrofotómetros Hitachi o Cary 14R, utilizando un coeficiente de extinción (E) de $153 \text{ nm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 878 nm (Clayton, 1966).

El contenido de bacterioclorofila de una suspensión de células intactas se realizó en el espectrofotóme-

tro Hitachi en posición "DUAL" utilizando 879 nm como λ de medida y 930 nm como λ de referencia, o en el Cary considerando como cero la absorción a 930 nm y midiendo la absorción a 879 nm. Las suspensiones se diluían en todos los casos hasta 0,25 unidades de absorción a 660 nm determinado en el Gilford. El coeficiente de extinción empleado para los cálculos era de $173 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Giménez Gallego, 1977).

2.2.8. DETERMINACION DE PROTEINA

Para todas las determinaciones de concentración de proteína se siguió el método de Lowry et al., (1951), usando una solución de albúmina de suero bovino como patrón.

2.2.9. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ATP DE UNA SUSPENSION BACTERIANA

Las células cultivadas para este fin se centrifugaron $2.000 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente. Se resuspendieron en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 conteniendo 17 mM de β -hidroxibutirato sódico, a razón de 0,9 mg peso seco/ml de suspensión. La mezcla se repartía en tubos de ensayo Kimax de 15 x 1,6 cm, se cubría con 4 ml de aceite de parafina previamente gaseado con Argon durante 30 min a 30°C y se dejaba reposar en la oscuridad durante 30 min en un baño termostaticado a 30°C procurando que el agua sobrepasase el nivel del aceite de parafina para evitar corrientes de convección de la parafina líquida.

En el fondo de cada tubo se colocó una barra imantada de 11 x 5 mm que se accionaba mediante el agita-

dor magnético descrito en la sección 2.1.3., apartado i). En este experimento se trataba de obtener varios tipos de información: a) niveles de ATP al cabo del tiempo de incubación, b) niveles de ATP en células respirando en oscuridad, para lo cual se aireaba la suspensión durante 30 s con una aguja hipodérmica conectada a una bomba de aire y c) niveles de ATP en células haciendo fotosíntesis, para lo cual se iluminaba la suspensión durante 30 s con dos lámparas reflectoras de 100 W colocadas a am bos lados del tubo a una distancia de 20 cm entre sí. Las suspensiones se agitaban previamente durante 15 s, se hacía el tratamiento correspondiente que se finalizaba añadiendo 2 ml de ClO_4H 6M y se continuaba agitando durante 15 s más para conseguir una distribución homogénea del reactivo. Las mezclas ácidas se mantenían 10 min a temperatura ambiente, a continuación se metían en hielo durante algún tiempo y se centrifugaba la fase acuosa a $17.000 \times g$ durante 10 min a 4°C para remover el material insoluble.

Los sobrenadantes se neutralizaron con mucha agitación a $\text{pH } 7.4 \pm 0.02$ con una solución de trietanolamina 1 M y KOH 2 M. Las mezclas neutralizadas se dejaban reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se decantaba el sobrenadante quedando en el fondo un precipitado blanco de ClO_4K . Los sobrenadantes se dejaban en hielo hasta la valoración del ATP de las soluciones.

La valoración de ATP se llevó a cabo por el método de la luciferina-luciferasa. El enzima se extrajo de abdómenes secos de luciérnaga, para lo cual se maceraron en un homogenizador de vidrio y en frío 4 mg de abdómenes por cada ml de una solución de $\text{AsO}_4\text{H}_2\text{Na}$ previamente neutralizada a $\text{pH } 7.4$ con SO_4H_2 . El extracto se centrifugó a $35.000 \times g$ durante 15 min a 4°C , aprovechándose el sobrenadante

que se guardó en frío hasta su uso.

La luminiscencia se midió mediante el sistema de aparatos descrito en la sección 2.1.3., apartado n). La mezcla de ensayo contenía: tricina 40 mM pH 7.4, 2.3 ml; SO_4Mg 0,10 M, 0.2 ml; extracto, 50 μl ; ATP 12.5 μM , 5 μl ; luciferina-luciferasa, 0.5ml. En cada ensayo la señal producida por la muestra problema se comparaba con la producida por una cantidad conocida de ATP (Welsch y Smith, 1969; W.P. Hempfling, 1970; del Campo et al., 1975). Con el fin de comprobar la fiabilidad del método se llevó a cabo un calibrado para determinar la conservación del ATP extraído a lo largo de todo el proceso. Para ello se repitió todo el proceso pero sin células, poniendo en su lugar cantidades conocidas de ATP. La recuperación fué próxima al 100%. También era necesario conocer los límites entre los que era lineal la dependencia entre el ATP y la intensidad de corriente que aparecía en el ánodo del fotomultiplicador como consecuencia de la luz emitida por la mezcla de reacción al añadir luciferina-luciferasa. Para ello se repitió todo el proceso pero sin células, añadiendo ATP al preparar la cubeta para el ensayo de luminiscencia. En la Tabla III se representan las corrientes de ánodo correspondientes a diferentes cantidades de ATP. El coeficiente de correlación es 1.0 (Giménez-Gallego, 1977).

2.2.10. ESPECTROS DIFERENCIALES INDUCIDOS POR REACTIVOS QUIMICOS

Se colocaron las dos cubetas del espectrofotómetro, referencia y muestra, a igual concentración de bacterioclorofila (10 μM). Se añadieron 10 μl de una solución de ferricianuro potásico 1M en la cubeta muestra (3.33 mM final), se esperó aproximadamente 1 minuto y se

T A B L A I

INCREMENTO DE LAS CORRIENTES DE ANODO DEL FOTOMULTIPLICADOR CORRESPONDIENTES A DIVERSAS CANTIDADES DE ATP

ATP (nmoles)	Δ de la corriente de ánodo (μ A)
0,00	0,06
0,25	0,31
0,50	0,51
2,25	2,51
5,00	5,30
10,00	10,80
25,00	20,40

La ecuación que relaciona el incremento (Δ) con el ATP presente en la cubeta (x) es: $\Delta = 1.058x + 0,021$.

corrió el espectro entre 920-750 nm. A continuación se añadió a la misma cubeta muestra ascorbato sódico en polvo en exceso para reducir al ferricianuro disuelto y toda la bacterioclorofila que había sido anteriormente oxidada. De nuevo se registró el espectro y se calculó la diferencia cada 5 nm entre el espectro oxidado y reducido.

2.2.11. DETERMINACION PRECISA DE LA CANTIDAD DE P800 PRESENTE EN UNA SUSPENSION DE CROMATOFOROS

Se prepararon dos cubetas (1 x 1 cm) con 2 ml de una suspensión de cromatóforos con 3 unidades de absorción a 880 nm. A una de las cubetas (muestra) se añadieron 10 μ l de una solución 0,5M de ferricianuro/ferrocianuro = 50. Se esperó 5 minutos y se registró el espectro frente a cromatóforos sin tratar entre 850-730 nm. A los 10 minutos se añadieron 10 μ l de ascorbato sódico 1,48M a la cubeta muestra e igual volumen de agua destilada a la referencia. En el minuto 15 se corrió de nuevo el espectro que se restó del anterior mediante un pequeño ordenador Tracor Northern, Modelo NS-570.

2.2.12. CAMBIOS FOTOQUIMICOS

Los cambios de absorción óptica inducidos por luz en cromatóforos a 1245 nm se analizaron en el espectrofotómetro Cary. La luz actínica se seleccionó con un filtro azul de banda ancha refrigerado por agua para evitar el excesivo calentamiento al absorber los rayos infrarrojos. El fotomultiplicador se protegió con el filtro 1000,7 de Baird-Atomic que transmitía muy bien en la longitud de onda analizada. La concentración de bacterioclo-

rofila era de 20 unidades de absorción a 880 nm en cubeta de 1 cm. Se comprobó que estábamos saturando en luz aunque la solución era bastante densa.

El análisis de los cambios fotoquímicos en la región del infrarrojo cercano en cromatóforos se llevó a cabo en el espectrofotómetro Hitachi utilizando como fuente de luz actínica el proyector descrito en la sección de aparatos, equipado con un filtro IR total para absorber los rayos infrarrojos y evitar el calentamiento del filtro utilizado para seleccionar dicha luz actínica, el filtro K-3. Se comprobó que estábamos saturando en luz actínica para estos cambios. La modificación del sistema de iluminación se debió a la alta fluorescencia que presentaban los cromatóforos de F24 y F24.1, lo que provocaba fuertes interferencias en las medidas de variación de absorción inducidas por la luz actínica del espectrofotómetro. Mediante el nuevo sistema de iluminación las cubetas podían colocarse en la cámara más alejada del fotomultiplicador con lo cual las interferencias con la luz de fluorescencia eran despreciables. El fotomultiplicador se protegía con diversos filtros interferenciales Schott dependiendo de la longitud de onda de medida, que coincidía con el máximo de transmisión del filtro utilizado, a saber: 912; 904; 894; 877; 869; 862; 851; 842; 831; 819; 812; 801; 788; 764; 751 nm. Los cromatóforos se diluyeron en Tricina 50 mM pH 8.0 hasta una concentración de bacterioclorofila de 5 μ M.

Los espectros de los cambios inducidos por luz en la región entre 440-650 nm en cromatóforos se hicieron en el espectrofotómetro Cary. La luz actínica se filtró a través de un filtro 870 Baird-Atomic y se protegió el fotomultiplicador con el filtro azul de banda ancha Schott BG 18. Se comprobó que se saturaba en luz para los cambios analizados.

La mezcla de reacción era: Tricina 50 mM pH 8.0

0,73 ml; succinato Na 50 mM, 0.033 ml; Cl_2Mg 150 mM, 0.033 ml; cromatóforos, 0.2 ml. La concentración de bacterioclorofila era de 4 unidades de absorción medida a 880 nm en cubeta de 1 cm. El efecto de desacoplantes sobre los cambios electrocrómicos inducidos por luz se llevó a cabo en el espectrofotómetro Hitachi utilizando el modo DUAL midiendo los cambios a 518-502 nm. Los cromatóforos se suspendieron en los mismos reactivos que para los espectros aunque en este caso la concentración de bacterioclorofila era de 2,0 unidades de absorción. La luz actínica se seleccionó con el filtro BIR. 888 de Balzers.

2.2.13. MEDIDAS DE CONSUMO DE OXIGENO POR SUSPENSIONES CELULARES

Se determinó la velocidad de consumo de O_2 en suspensiones celulares midiendo polarográficamente el contenido del mismo en la suspensión, utilizando el electrodo de oxígeno descrito en la sección 2.1.3. apartado c). Las células se resuspendieron en medio fresco a razón de 0,17 mg peso seco/ml y se mantenían a 30°C gracias al termostato Lauda. La luz actínica procedía de un proyector de diapositivas cuya luz filtraba a través del filtro IR-total y de 10 cm de agua para absorber los rayos infrarrojos. La intensidad de luz que llegaba a las muestras era de $68 W.m^{-2}$.

2.2.14. FOTORREDUCCION DE AZUL DE TETRAZOLIO

La velocidad de reducción de azul de tetrazolio en cromatóforos se determinó registrando la variación de absorción a 590 nm en el espectrofotómetro Hitachi. La luz actínica se filtró a través del filtro BIR 888 llegando a

la cubeta una intensidad de 78 W.m^{-2} . Previamente se comprobó que la longitud de onda medida era un punto isosbésico ya que no se encontró ningún cambio adicional al iluminar la cubeta con todos los reactivos excepto el azul de tetrazolio. La mezcla de reacción estaba constituida por tricina 50 mM pH 7.5, 2.1 ml; ascorbato Na 50 mM, 0.1 ml; DCIP 3mM, 0.2 ml; azul de tetrazolio 2 mM, 0.2 ml; glucosa 375 mM, 0.1 ml; glucosa-oxidasa 10 mg/ml, 0.1 ml; cromatóforos 0.2 ml; se cubrió la mezcla con 1 ml de vaselina gaseada previamente con Argon para evitar la difusión de aire hacia la mezcla de reacción. La concentración de bacterioclorofila era de $5.6 \mu\text{M}$. Se usó un $E = 28 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2.2.15. FOTOOXIDACION DE DCIPH₂

La cinética de oxidación del DCIPH₂ en cromatóforos se registró en el espectrofotómetro Hitachi midiendo el cambio inducido por la luz a 586 nm. El DCIPH₂ es incoloro y el DCIP azul. La oxidación, provocada químicamente o por luz, puede observarse registrando el cambio de absorción a 586 nm que resultó ser un punto isosbésico para dicho cambio. La luz actínica se filtró a través del filtro BIR-888 llegando a la cubeta una intensidad de 78 W.m^{-2} . La mezcla de reacción está compuesta de Tricina 50 mM pH 8.0, 2.57 ml; cianuro potásico 30 mM, 0.1 ml; ascorbato sódico mM, 0.1 ml; DCIP 3 mM, 0.03 ml para $30 \mu\text{M}$ en la mezcla final ó 0.2 ml para $200 \mu\text{M}$ en la mezcla final; cromatóforos 0.2 ml. La concentración de bacterioclorofila fué de $5.6 \mu\text{M}$. Se usó un $E = 30 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

2.2.16. FOTOFOSFORILACION CATALIZADA POR CROMATOFOROS

La fotofosforilación se llevó a cabo en tubos de ensayo Kimax de 11 cm de diámetro interno. La ilumina-

ción actínica se suministraba con un proyector de diapositivas equipado con el filtro IR-total. La luz que llegaba a la mezcla de reacción era de 60 W.m^{-2} . La mezcla de reacción en 3 ml de volumen contenía: Tricina pH 8.0, 32.5 mM; ADP, 0.5 mM; PO_4HK_2 , 5 mM; Cl_2Mg , 5 mM; glucosa, 25 mM; bacterioclorofila, $1 \mu\text{M}$. Para las reacciones anaeróbicas se añadían 14 unidades de glucosa-oxidasa (E.C.I. I.3.4.; Sigma Chemical Co. No G-6125) y se cubría la mezcla con 2 ml de aceite de parafina. Las mezclas de reacción se incubaron 3 min en la oscuridad a 25°C en un baño de paredes transparentes. Los tubos se iluminaban durante 3 min y se paraba la reacción añadiendo 1.5 ml de ClO_4H 3M. Tras permanecer 10 min a 0°C se tomaban 2 ml de muestra que se añadían a 5 ml de $\text{AsO}_4\text{H}_2\text{Na}$, 0.5M neutralizado a pH 7.4 con SO_4H_2 . La mezcla resultante se neutralizaba a $\text{pH } 7.4 \pm 0.02$ con KOH 2M. El proceso se continuaba como se indica en la sección 2.2.10.

2.2.17. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis se llevó a cabo con el sistema fosfato-urea-SDS. El proceso consta de varias partes fundamentales: preparación de soluciones, preparación de los geles y muestras de análisis, montaje del aparato, desarrollo de la electroforesis, tinción y desteñido de los geles.

La solución A, denominada tampón de geles y electrodos, estaba formada por: fosfato sódico 100 mM pH 7.0; Urea 1M; SDS 0,2%; H_2O destilada hasta 2 l. La solución C, que ha de prepararse el mismo día de hacer la electroforesis, constaba de: acrilamida 5 g; tetrametilen bis-acrilamida 0.17 g; H_2O destilada hasta 25 ml. La concentración de acrilamida era por tanto de 20% y la relación bis-acrilamida/acrilamida de 1/29. La solución denominada tampón de

incubación estaba formada de: fosfato sódico 10 mM pH 7.0; SDS 8%; β -mercaptoetanol 2%; Urea 0.5 M; sacarosa 20%. En el momento oportuno se preparaba la mezcla polimerizante: 15 ml de la solución A; 15.5 ml de la solución C; 1.5 ml de persulfato amónico 0.5% y 35 μ l de Temed, quedando los reactivos a unas concentraciones finales de: acrilamida 10%; SDS 0.1%; Urea 0.5M; fosfato sódico 50 mM; persulfato 0.025%; Temed 0.1%.

Los tubos (10.5 x 0.6 cm) se hervían con agua destilada en presencia de una pequeña cantidad de SDS. Se pasaron una vez por agua destilada y se secaron en una estufa a 60°C. Una vez secos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en una plataforma metálica con 12 huecos, especialmente diseñada para tal fin. Se tapaba el fondo de los tubos con papel de parafina, se añadían 3 gotas de sacarosa al 40% y se rellenaban con la mezcla polimerizante hasta 0.5 cm del extremo superior que se ocupaba con agua destilada, puesta con mucho cuidado para no distorsionar la superficie de la mezcla polimerizante. Con ello se trataba de conseguir una interfase completamente plana, condición esencial para obtener una buena electroforesis. La mezcla se dejaba polimerizar durante 60 min a temperatura ambiente. Los cromatóforos se diluyeron en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 hasta 4 mg proteína/ml y los centros de reacción como máximo hasta 1 mg proteína/ml; se mezclaban iguales volúmenes de muestra proteica y tampón de incubación y se dejaba reaccionar durante 15 min a 40°C para conseguir una desnaturalización completa de las proteínas. Se dejaban enfriar a temperatura ambiente durante 5 min y se añadía una gota de azul de bromofenol al 0.05%.

Tras la polimerización de los geles se procedía al montaje del aparato. El tampón de electrodos se diluía

1/2 y se añadían 2 l a la cubeta inferior, se montaban los tubos sobre la cubeta superior y se rellenaba con los otros 2 l de tampón. Se procuraba que no quedasen burbujas de aire en la interfase de los geles y el tampón de la cubeta inferior para no interrumpir el paso de corriente a través de los tubos. Se colocaron las muestras proteicas (30 μ l en cada tubo) sobre el lecho de los geles, muy cuidadosamente para conseguir una capa compacta y evitar la difusión a través del líquido. Se cerraba la cubeta superior y se conectaban los electrodos a la fuente de alimentación graduada a razón de 2 mA/gel durante 30 min para conseguir un frente nítido y después a razón de 4 mA/gel hasta finalizar la electroforesis que se conseguía cuando la banda azul del bromofenol llegaba al extremo inferior. Es conveniente hacer preelectroforesis en ausencia de muestra para eliminar impurezas de los reactivos comerciales y restos de la polimerización que pueden interferir en la marcha electroforética.

Tras desconectar la fuente de alimentación, los geles se sacaron de los tubos mediante una aguja hipodérmica conectada a una jeringa con la que se introducía agua entre las paredes del tubo y el gel consiguiendo la separación. A continuación se teñían y se fijaban en una solución acuosa de isopropanol 25% (v/v) + ac. acético 10% (v/v) + azul brillante de coomassie 0.05 g/100 ml durante toda la noche. A la mañana siguiente se cambiaba la solución por una de ácido acético al 10% (v/v) e isopropanol al 10% (v/v) durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación se destiñeron los geles a temperatura ambiente en una solución de ácido acético al 10% (v/v) que se renovaba temporalmente.

Una vez que el fondo de los geles se encontraba completamente incoloro se procedía a fotografiarlos o hacer el barrido en un espectrofotómetro especialmente adap

tado para ello.

2.2.18. DETECCION DE SEÑALES EPR EN CROMATOFOROS

Los cromatóforos de las distintas estirpes, con una $A_{880\text{nm}}^{1\text{cm}} = 60$, se introdujeron en la cavidad rectangular, con una capacidad de 300 μl , del aparato ya descrito. La iluminación actínica se suministraba con un proyector de diapositivas cuya luz pasaba a través de una rejilla que poseía la cámara de resonancia del espectrofotómetro. La luz que llegaba a la muestra era saturante pues colocando un filtro IR-total que absorbe los rayos infrarrojos, no se registró disminución de la señal. En los experimentos con el compuesto oxidante ferricianuro potásico se añadía a una concentración final de 20 mM, el tiempo empleado para registrar un espectro era siempre el mismo. La frecuencia de la microonda y el poder de la misma eran 9,7 GHz y 40 mW respectivamente, mientras que la corriente que pasaba por el diodo era de 180 μA . La frecuencia del campo magnético y la modulación del campo eran de 100 KHz y 3.2 Gpp respectivamente. El aparato funcionaba con una ganancia de 1.25×10^4 dB. Los espectros se registraron en un intervalo de 100 G entre 3276-3376 G, empleando 100 s en cada barrido. Ordenateur Nicolet, No 1180 avec un programme LAB II.

2.2.19. PURIFICACION DE CENTROS DE REACCION

El primer paso del proceso consistía en la solubilización de los centros mediante el detergente LDAO. Una suspensión de cromatóforos en tampón fosfato sódico 50 mM pH 8.0, a una absorción de 75 unidades a 880 nm en cubeta de 1 cm, se diluía con el mismo volumen de tampón frío, al cual se le había añadido el detergente, quedando a una con

centración final del 0.5%. Con mayores concentraciones de detergente el rendimiento de la solubilización era mayor aunque la fracción estaba más impurificada. La solución se dejaba en presencia del detergente durante 1 h a 4°C y en la oscuridad. A continuación se diluía 2,5 veces con tampón frío y se centrifugaba 2 h a 105.000 x g en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante, de color pardo, se recogía cuidadosamente para no remover el sedimento. A esta fracción la denominaremos S₀. En ella se deben observar las características espectrales del centro de reacción; en caso contrario el detergente no ha actuado correctamente.

El paso siguiente consiste en dos precipitaciones sucesivas con SO₄(NH₄)₂. A la fracción S₀ se le añadía lentamente y con agitación suave la sal triturada hasta 35% de saturación. Se dejaba en reposo 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaba a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se pasaba a través de un filtro de papel Albert n^o 242 en donde quedaba retenida la bacterioclorofila de antena contaminante. El filtrado se llevó en idénticas condiciones a las de antes hasta el 45% de saturación de sulfato amónico y se dejaba reposar otros 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugaba de nuevo a 10.000 x g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante resultante se pasaba a través de un filtro de papel Albert en donde quedaba retenida una fracción de color pardo que eran los centros de reacción. Dicha fracción se resuspendía en un volumen mínimo de tampón Tris-ClH 10 mM pH 8.0 y se dializaba toda la noche contra 4 l del mismo tampón a 4°C. El dializado se centrifugaba a 20.000 x g durante 10 min a 4°C para sedimentar los precipitados y obtener un sobrenadante sin turbidez, que constituía la preparación de P870 purificado.

Normalmente, con el proceso anteriormente expues-

to no era suficiente para obtener centros de reacción electroforéticamente puros, siendo necesario continuar el proceso mediante dos cromatografías de afinidad sucesivas sobre DEAE-Celulosa. Se equilibraba la columna (8 x 1,9 cm) con tampón Tris-ClH 10 mM pH 8.0 con Triton X-100 0.1 g/100 ml. Se pasaba la suspensión de centros de reacción, que quedaban retenidos por la resina formando una franja muy concentrada de color pardo-rojizo. A continuación se pasaban 100 ml de Tris-ClH 10 mM pH 8.0 con Triton X-100 0.1g/100 ml y ClNa 0.020 M con lo cual se eluía entre otras cosas la feofitina contaminante, de color verdoso. Seguidamente se pasaban a través de la columna 100 ml de tampón Tris-ClH 10 mM pH 8.0 con Triton X-100 0.1g/100 ml y ClNa 0.125 M con lo que se eluía el P870 en una fracción coloreada. El volumen de elución aproximado era de 25 ml. La fracción pigmentada se dializaba contra 4 l de tampón Tris-ClH 10 mM pH 8.0 durante toda la noche y en frío, o se dializaba en una columna Sephadex G-25. Con el Sephadex G-25 el proceso era más rápido, consiguiendo una menor feofitización de los centros por efecto del detergente. Se puede volver a repetir la cromatografía con lo cual se suele conseguir un 90-95% de pureza, comprobación que se hacía con una electroforesis sobre geles de poliacrilamida.

Para purificar los centros de la estirpe mutante fototrófica F24.1 era necesario hacer varias modificaciones al método descrito pues el sulfato amónico desnaturizaba los centros provocando su total feofitinización. Los cromatóforos en presencia del detergente se diluían 3 veces con tampón fosfato sódico 60 mM pH 7.5. Para soslayar el paso de las precipitaciones con $\text{SO}_4(\text{HN}_4)_2$ la fracción S_0 se mezclaba con 2-3 g de la resina DEAE-Sephadex humedecida previamente con tampón Tris-ClH 10 mM pH 7.5 y

se dejaba en reposo durante 10 min en frío en la oscuridad. Al cabo del tiempo se filtraba a través de un filtro de papel Albet quedando en el filtro la resina con un color pardo.

Dicha resina se resuspendía en 100 ml de tampón Tris-ClH con Triton X-100 0.1 g/100 ml y ClNa 0.1 M, se dejaba otros 10 min en reposo. La suspensión se filtraba de nuevo a través del mismo tipo de filtro. En el filtrado aparecía la feofitina contaminante de color verdoso. La resina se resuspendía en un volumen mínimo de tampón Tris-ClH 10 mM pH 7.5 con Triton X-100 0.1g/100ml y ClNa 1 M. La suspensión se filtraba de nuevo en idénticas condiciones y se cogía el filtrado que era la fracción coloreada. El filtrado se sometía a diálisis y se seguía el mismo proceso que para la cepa silvestre exceptuando que se utilizaba tampón Tris-ClH 10 mM pH 7.5.

Todos los pasos de los procesos aquí descritos deben hacerse en oscuridad o luz muy tenue.

2.2.20. MEDIDAS DE CINÉTICA RÁPIDA EN CELULAS ENTERAS

Cultivos fototróficos se recogieron en fase exponencial y se resuspendieron en medio de cultivo fresco quedando a $A_{880-930 \text{ nm}} = 1,2$ en cubeta de 1 cm de paso de luz. La suspensión se gaseaba con N_2 purísimo durante 30 min a temperatura ambiente, al igual que un volumen conveniente de aceite de parafina para su uso posterior. Paralelamente se preparaba Ficoll 50 g/100 ml al cual se le hacía el vacío. Al cabo del tiempo se preparaba la cubeta de ensayo, 1 x 1 cm, mezclando 2 ml de la suspensión bacteriana y 1 ml de Ficoll quedando por tanto a una $A_{880-930 \text{ nm}} = 8.0$. La mezcla se gaseaba nuevamente con N_2 durante 5 min para conseguir una buena anaerobiosis y una suspensión homogé-

nea. Sobre ella se colocaba 1 ml de aceite de parafina gaseada para evitar la difusión de aire hacia la fase acuosa. La cubeta se dejaba en reposo 15 min antes de comenzar las medidas de los cambios fotoquímicos. Todo el proceso se hacía en oscuridad o luz muy tenue. En general se midieron variaciones de transmisión; los aparatos se calibraron de tal forma que 100% de transmitancia correspondía a 10 v. Gracias al promediador ya descrito, se podía acumular una señal todas las veces que fuesen necesarias hasta obtener una buena relación señal/ruido. También se podía amplificar la señal las veces que fuesen convenientes. El registro aparecía en una pantalla que se fotografiaba con una Tektronix Camera, modelo C-12. A partir de dichas fotografías se han obtenido las gráficas que se exponen en la sección de RESULTADOS.

2.2.21. MEDIDAS DE INDUCCION DE FLUORESCENCIA

La luz procedente de una lámpara de Xenon se filtraba a través de una capa de agua y de un filtro 9-54 Corning. Entre el sistema de iluminación y la muestra a analizar se colocaba un obturador accionado eléctricamente. La señal se detectaba mediante un fotomultiplicador Hamamatsu R663 que se protegía con un filtro RG-8 Schott. La señal aparecía en la pantalla de un osciloscopio Tektronix, modelo 543B, de donde se tomaban las fotografías mediante una Tektronix Oscilloscope Camera, modelo C-12.

III. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. OBTENCION DE MUTANTES NO FOTOTROFICOS AFECTADOS EN EL CENTRO DE REACCION

Mediante mutagénesis con nitrosoguanidina y posterior selección con penicilina (del Valle-Tascón, 1975) se obtuvieron varias estirpes mutantes no fototróficas a partir de las silvestres R. rubrum S1 y R. rubrum S1-T. A dichos mutantes les hemos denominado F24, T102, T90, T83 y T78. Debido a la imposibilidad de crecer fototróficamente fue necesario cultivarlos en condiciones semiaeróbicas que, como ya se expuso en la INTRODUCCION, permiten la síntesis del aparato fotosintético.

3.1.1. ESPECTRO DE LOS PIGMENTOS "IN VIVO" E "IN VITRO"

Los espectros de los pigmentos "in vivo" presentan algunas modificaciones notables en el IR cercano respecto a las estirpes silvestres (Fig. 1 y 2). Sólo se representan dos espectros ya que el S1-T y los demás mutantes mostraron espectros similares a S1 y F24 respectivamente. El máximo, que en S1 está centrado alrededor de 878 nm, se desplaza 2 nm hacia longitudes de onda mayores en los espectros de los mutantes, y la banda centrada a 803 nm desaparece. La banda a 803 nm, adscrita al centro de reacción, es fácilmente detectable en cromatóforos o células enteras, ya que no hay otros pigmentos mayoritarios que absorban en esta zona del espectro. (Aagaard et al., 1972).

Los pigmentos de los mutantes extraídos con acetona/metanol (7/2) mostraron espectros similares al de

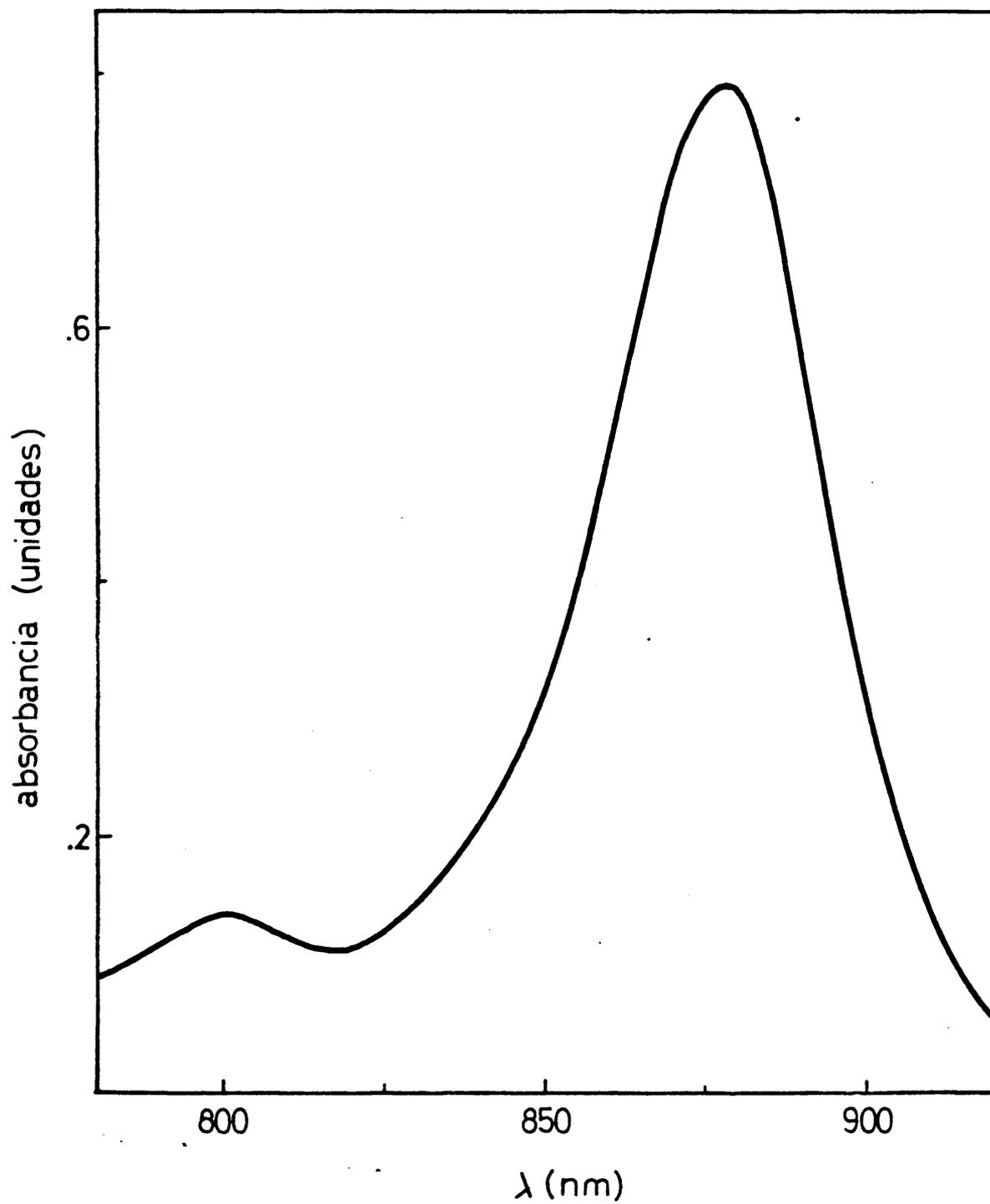


Fig. 1.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe silvestre S1.

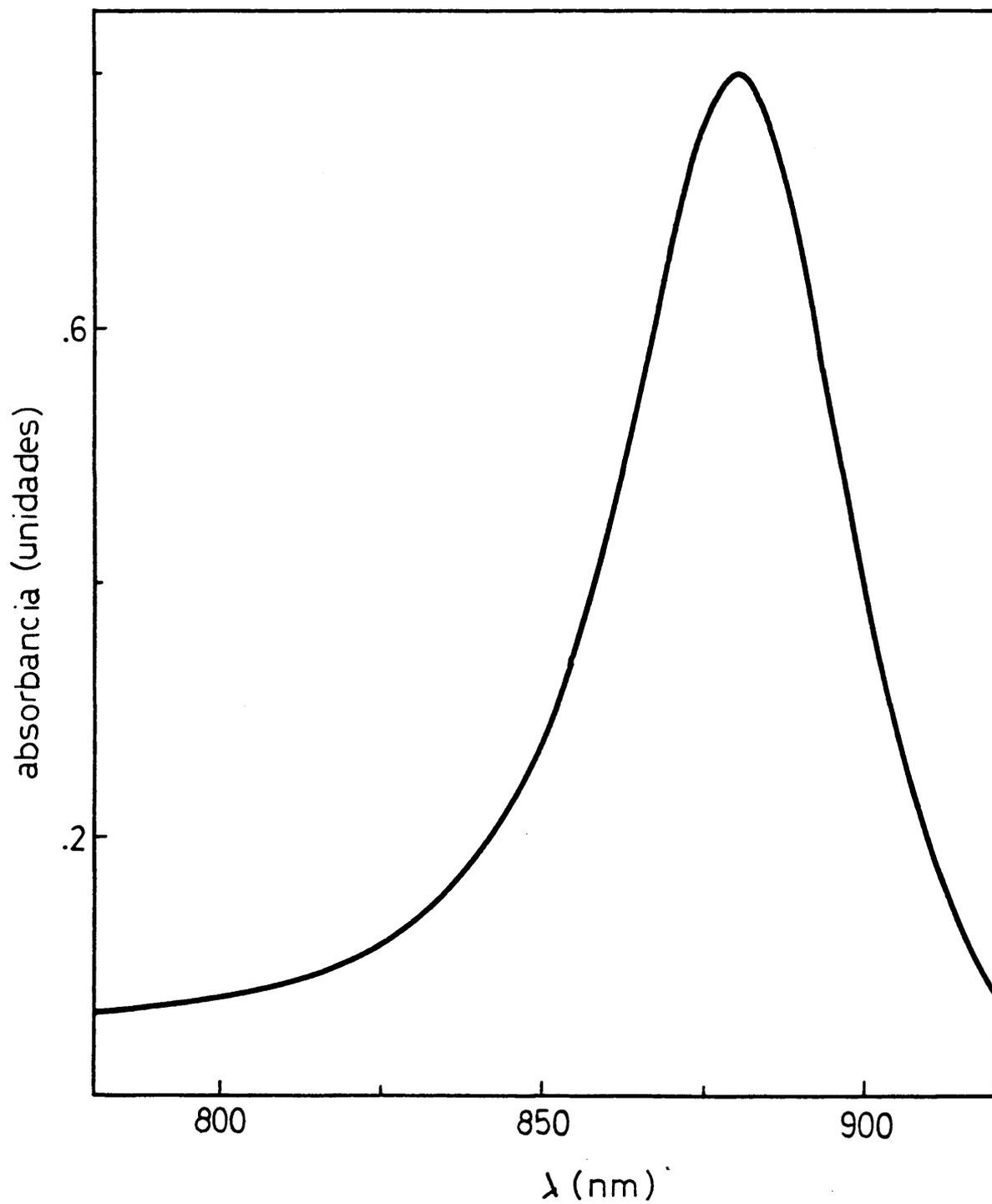


Fig. 2.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe no fototrófica F24.

la estirpe silvestre en el IR cercano y visible (Fig. 3-4) (sólo se representa el espectro de uno de los mutantes ya que todos los demás dieron espectros parecidos). Las bandas centradas alrededor de 770, 600 y 390 nm se atribuyen a la bacterioclorofila y las tres bandas centrales se adscriben a los carotenos. Todo parece indicar que los pigmentos de las estirpes mutantes tienen una composición química normal.

3.1.2. ESPECTROS DIFERENCIALES OXIDADO-REDUCIDO

Estos espectros se han llevado a cabo oxidando los cromatóforos con un oxidante químico, el ferricianuro potásico, y reduciendo a continuación con un reductor químico, el ascorbato sódico. La diferencia entre ambos espectros nos da la bacterioclorofila que es capaz de oxidarse y reducirse reversiblemente en estas condiciones (Fig. 5-6) (sólo se representan los espectros del S1 y F24 ya que el T dió igual espectro al S1 y los demás mutantes dieron resultados comparables al F24). Cuando se oxidan químicamente los cromatóforos de la estirpe silvestre tiene lugar una decoloración centrada alrededor de 870 nm y un desplazamiento hacia el azul de la banda de 803 nm. Estos procesos reversibles se han atribuido exclusivamente a la bacterioclorofila de centros de reacción. Sin embargo, la bacterioclorofila de antena también puede sufrir procesos de óxido-reducción reversibles en condiciones fuertemente oxidantes, como se desprende de la decoloración centrada a 880 nm en cromatóforos del mutante no fototrófico. Experimentos en curso en nuestro laboratorio tratan de caracterizar los cambios reversibles adscritos a la bacterioclorofila de antena. No obstante, el hecho más interesante para el desarrollo de esta memoria es la ausencia de desplazamiento en la región de 800 nm, lo

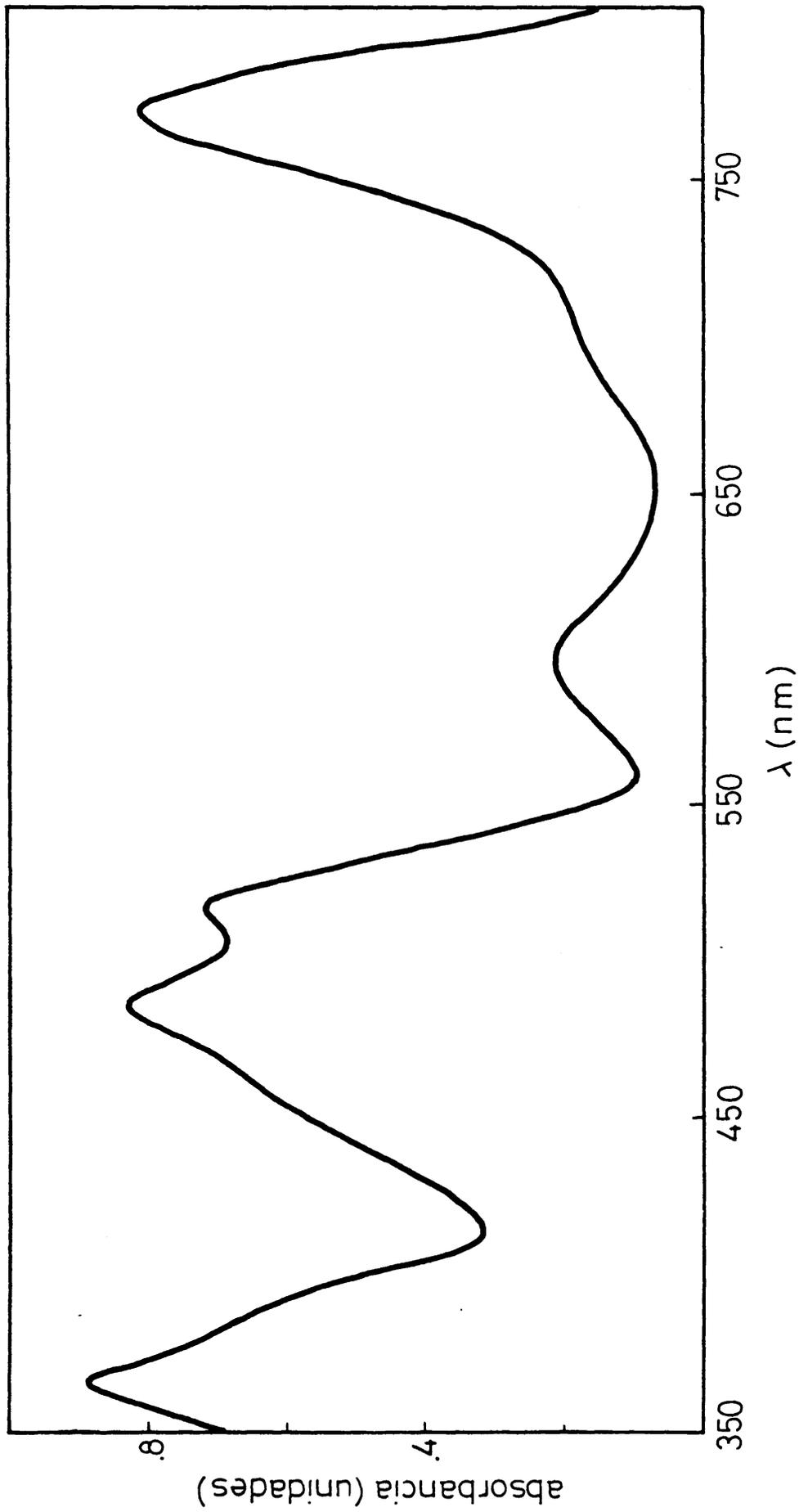


Fig. 3.- Espectro de absorción en el visible de los pigmentos de la estirpe silvestre S1 crecida en la oscuridad extraídos con acetona/metanol (7/2).

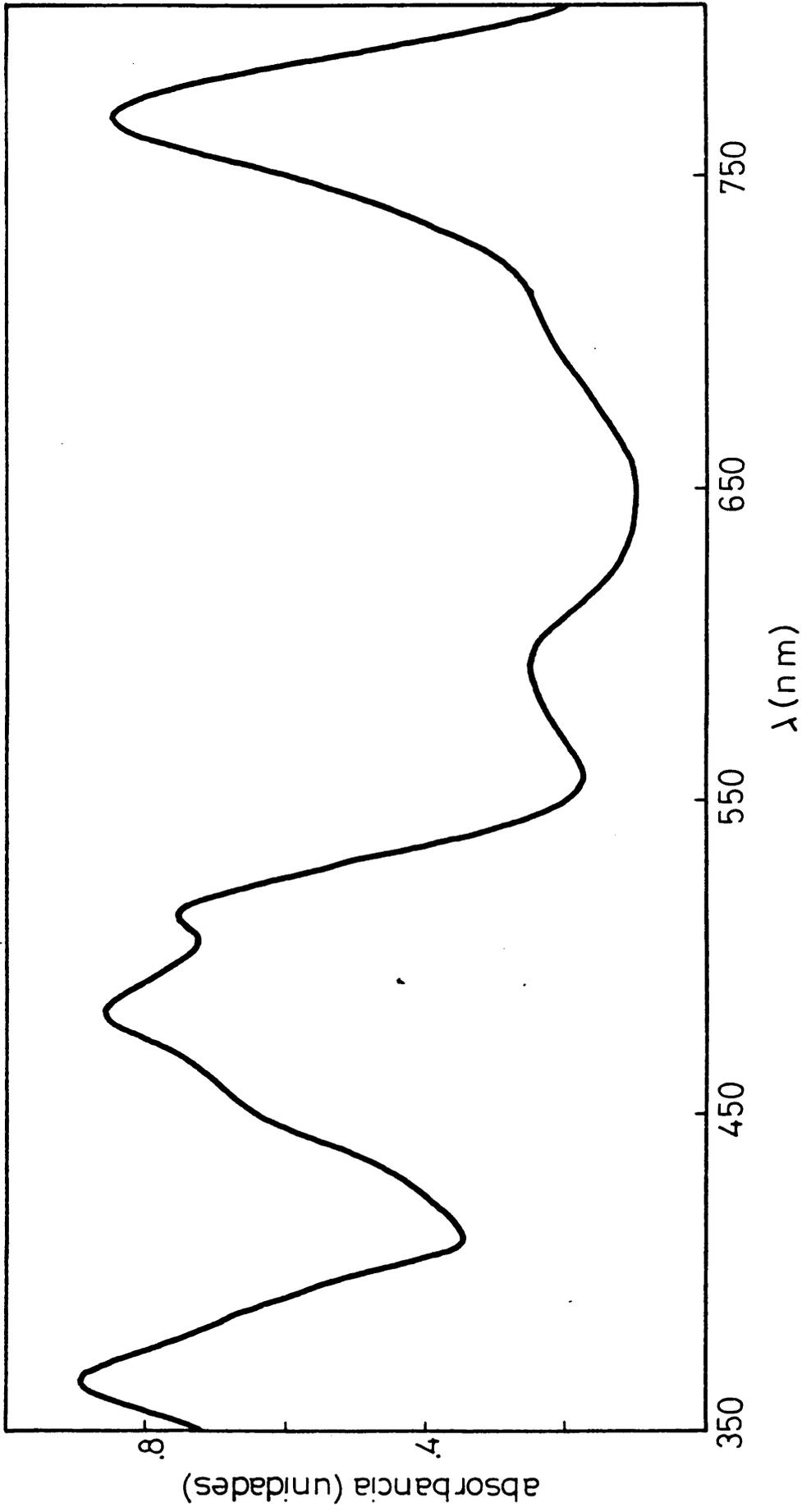


Fig. 4.- Espectro de absorción en el visible de los pigmentos de la estirpe F24 extraídos con acetona/metanol (7/2).

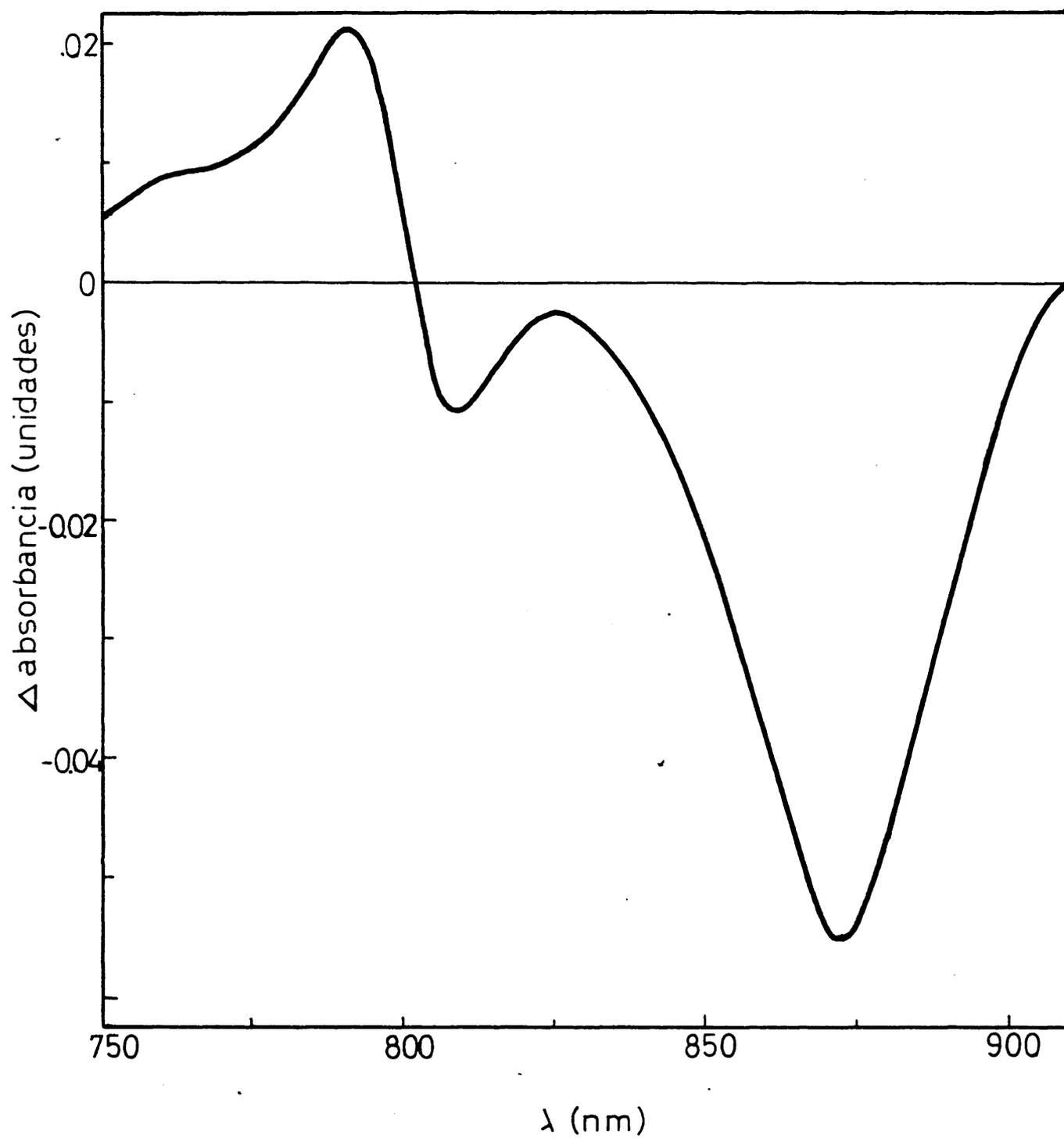


Fig. 5.- Espectro diferencial de absorción (oxidado-reducido) de cromatóforos de la estirpe silvestre S1.

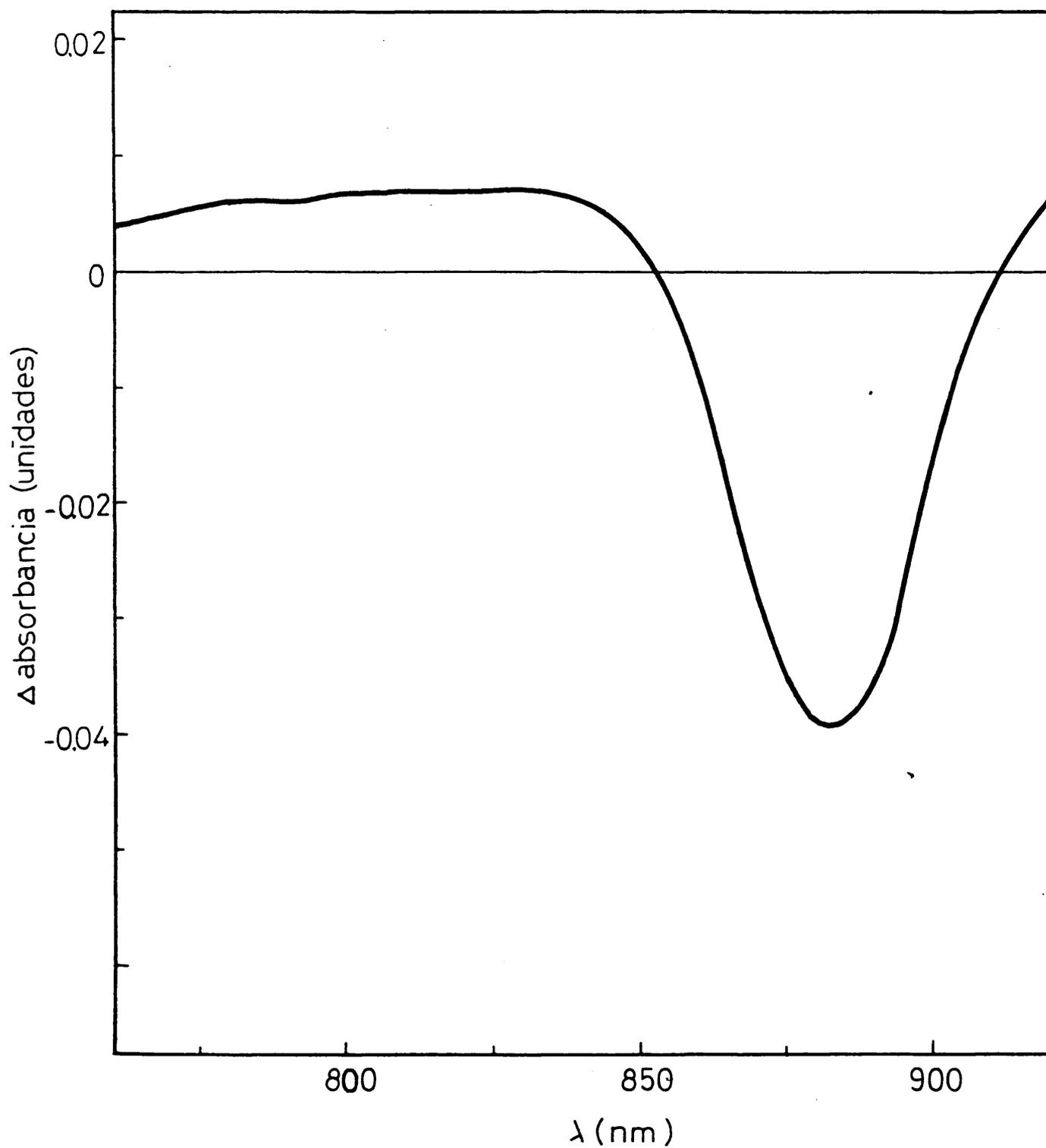


Fig. 6.- Espectro diferencial de absorción (oxidado-reducido de cromatóforos de la estirpe no fototrófica F24.

cual nos hace suponer que estos mutantes son deficientes totales del centro de reacción.

3.1.3. ACTIVIDADES FOTOQUIMICAS

Para llegar a un mejor conocimiento de las propiedades de estos mutantes no fototróficos, se midieron algunas actividades fotoquímicas comparándolas con las encontradas en la estirpe silvestre.

Fotofosforilación: Cuando se iluminan cromatóforos de la estirpe silvestre de R. rubrum fosforilan ADP. Esta actividad se incrementa cuando a la mezcla fosforilante se le añaden donadores exógenos de electrones como el par DCIP + ascorbato. En la Tabla II se muestran las actividades fosforilantes de las estirpes silvestres y mutantes.

Fotorreducción de azul de tetrazolio: El azul de tetrazolio es un compuesto de bajo potencial que puede aceptar electrones procedentes de los aceptores secundarios que existen en los cromatóforos. Este compuesto compete con el oxígeno (actividad fotooxidasa) por los electrones, de ahí la necesidad de mantener anaeróbica la mezcla de ensayo. La velocidad de reducción de azul de tetrazolio, en condiciones saturantes de reductores exógenos, nos da una idea indirecta de la cantidad de electrones que circulan por los centros de reacción. (Tabla III).

Fotooxidación del DCIP: Cuando se ilumina una suspensión de cromatóforos en presencia del par DCIP + ascorbato tiene lugar una oxidación del DCIPH₂ catalizado por la bacterioclorofila del centro de reacción por efecto de la luz actínica. El DCIP es nuevamente reducido por

TABLA II

ACTIVIDADES FOSFORILANTES DE CROMATOFOROS
DE LAS ESTIRPES SILVESTRES Y MUTANTES

estirpe	nmol ATP/nmol Bcl/h
S1	549.6
F24	15.7
T	782.8
T102	43.2
T90	2.2
T83	0.00
T78	0.00

TABLA III

ACTIVIDADES DE FOTORREDUCCION DE AZUL DE TETRA -
ZOLIO (AT) DE CROMATOFOROS DE LAS ESTIRPES SILVESTRE Y MUTANTES

estirpe	n moles AT/h mol Bcl/h
S1	35.7
F24	1.2
T	39.5
T102	6.6
T 90	0.0
T83	0.6
T 78	0.6

el ascorbato, creándose un equilibrio dinámico mientras haya donador exógeno de electrones. Como puede observarse en la Tabla IV, las cepas mutantes no presentaron ninguna actividad de fotooxidación de DCIPH₂, o ésta fue muy escasa.

De los datos expuestos en este apartado se puede concluir que los flujos cíclico y no cíclico de electrones inducidos por la luz en el aparato fotosintético de las cepas mutantes son nulos o muy escasos. Estos resultados, junto con la ausencia de P800 en los espectros absolutos y diferenciales nos permite afirmar que las estirpes no fototróficas descritas carecen del centro de reacción.

3.2. REVERTIENTES ESPONTANEOS FOTOTROFICOS

A partir de los mutantes no fototróficos se obtuvieron revertientes espontáneos, por recuperar su capacidad de crecer en la luz. Mediante el método descrito anteriormente se aislaron varias estirpes fototróficas de cada uno de los mutantes. Con ello se pretendía investigar cómo afectaba la reversión sobre los centros de reacción y en último término, sobre las propiedades fisiológicas de la bacteria R. rubrum. Esto nos permitiría conocer algo más sobre la estructura y función de los centros de reacción.

3.2.1. REVERTIENTES PROCEDENTES DE LA ESTIRPE F24

Se aislaron 5 revertientes a partir de otras tantas colonias diferentes. A dichos revertientes les denominaremos F24.1, F24.2, F24.3, F24.4 y F24.5. Se prepararon cultivos fototróficos y se determinaron los espectros de los pigmentos en el IR-cercano. Las cuatro prime-

TABLA IV

RELACION ENTRE DCIP OXIDADO Y REDUCIDO EN ESTADO ESTACIONARIO EN CROMATOFOROS DE LAS ESTIRPES S1 Y MUTANTES

estirpe	$\frac{\text{DCIP}}{\text{DCIPH}_2} \times 10^3$
S1	0.25
F 24	0.015
T	0.23
T102	0.036
T90	0.016
T83	0.013
T78	0.023

ras estirpes dieron espectros prácticamente idénticos, con un P800 muy disminuido y la banda principal desplazada 2 nm hacia λ mayores con respecto a la estirpe parental F24. (Fig. 7) (sólo se representa el espectro de la F24.1). La estirpe F24.5, por el contrario, presenta un espectro que se asemeja totalmente al de la estirpe silvestre. (Fig. 8).

3.2.2. REVERTIENTES PROCEDENTES DE LA ESTIRPE T102

Se aislaron 5 colonias fotosintéticas a partir de la estirpe mutante no fototrófica T102: T102.2; T102.3; T102.4; T102.5 y T102.6. Se cultivaron en condiciones fototróficas y se registraron los espectros representados en las Fig. 9-13. Como muestran dichas figuras se obtuvieron revertientes con fenotipos diferentes, observándose distintos niveles de P800, respecto a R. rubrum S1-T, desde un 10-15% en el T102.2 hasta un 100% en el T102.6.

3.2.3. REVERTIENTES PROCEDENTES DE LAS ESTIRPES NO FOTOTRÓFICAS T90, T87 y T78

Todos los revertientes fototróficos espontáneos obtenidos a partir de estas estirpes mutantes recuperaron el fenotipo normal con un P800 muy similar al de la estirpe silvestre. En la Fig. 14 se muestra un ejemplo de ellos, el T90-1.

3.2.4. CRECIMIENTO FOTOTROFO DE LOS REVERTIENTES DESCRITOS

A la vista de los distintos fenotipos aparecidos en los espectros de los revertientes, se midieron las velocidades de crecimiento en la luz de la mayor parte de

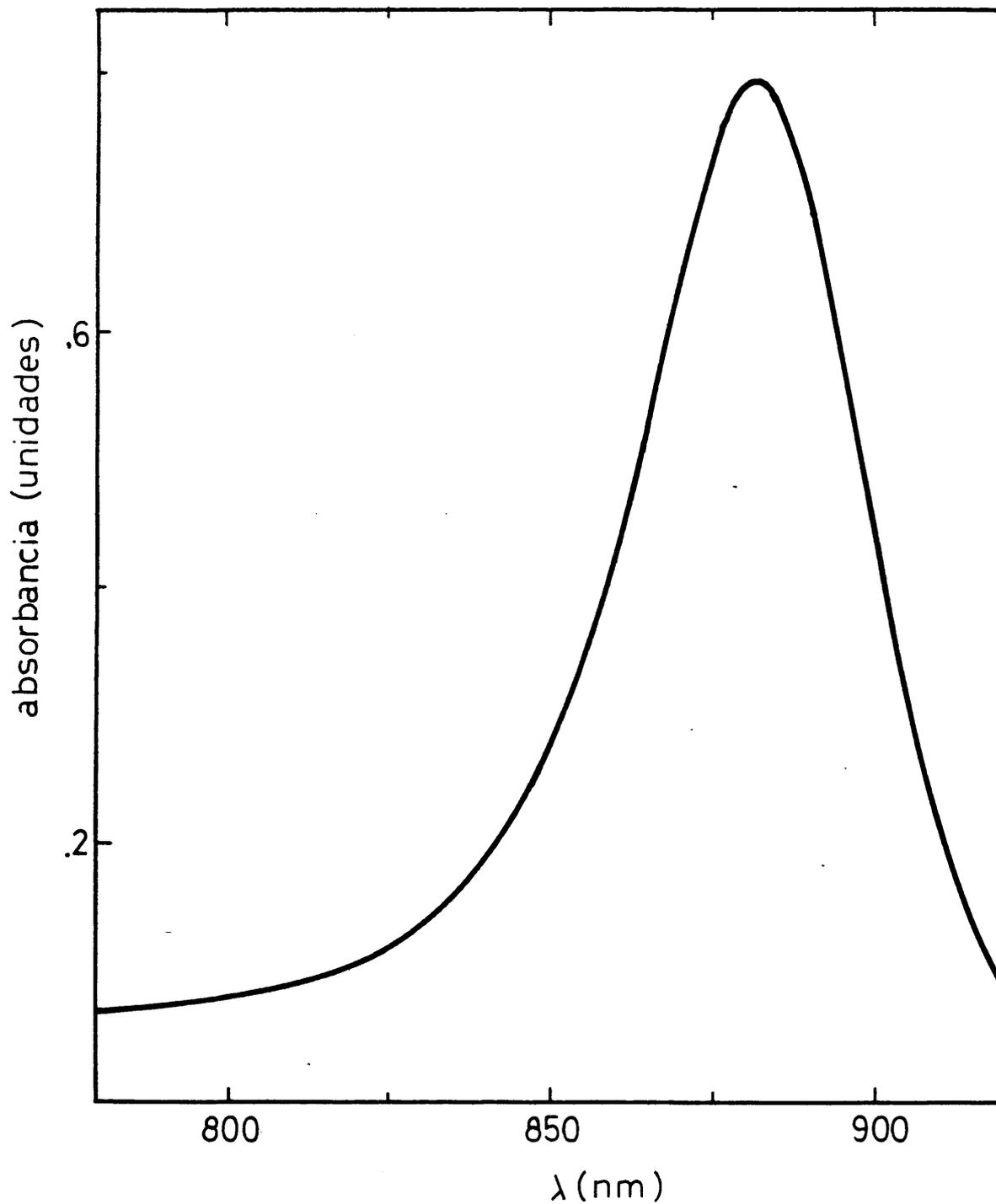


Fig. 7.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente F24.1 crecida en la luz.

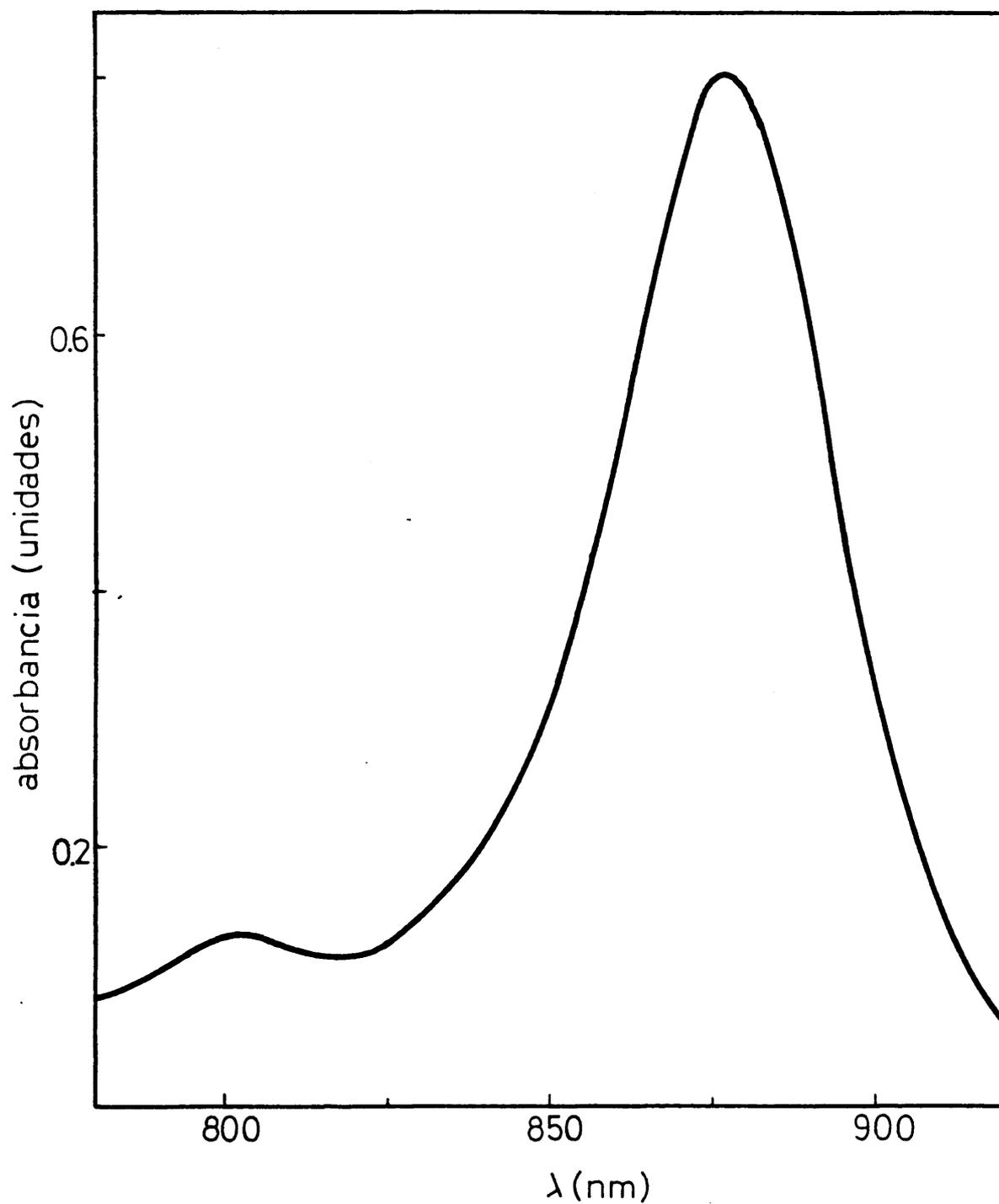


Fig. 8.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente F24.5 crecida en la luz.

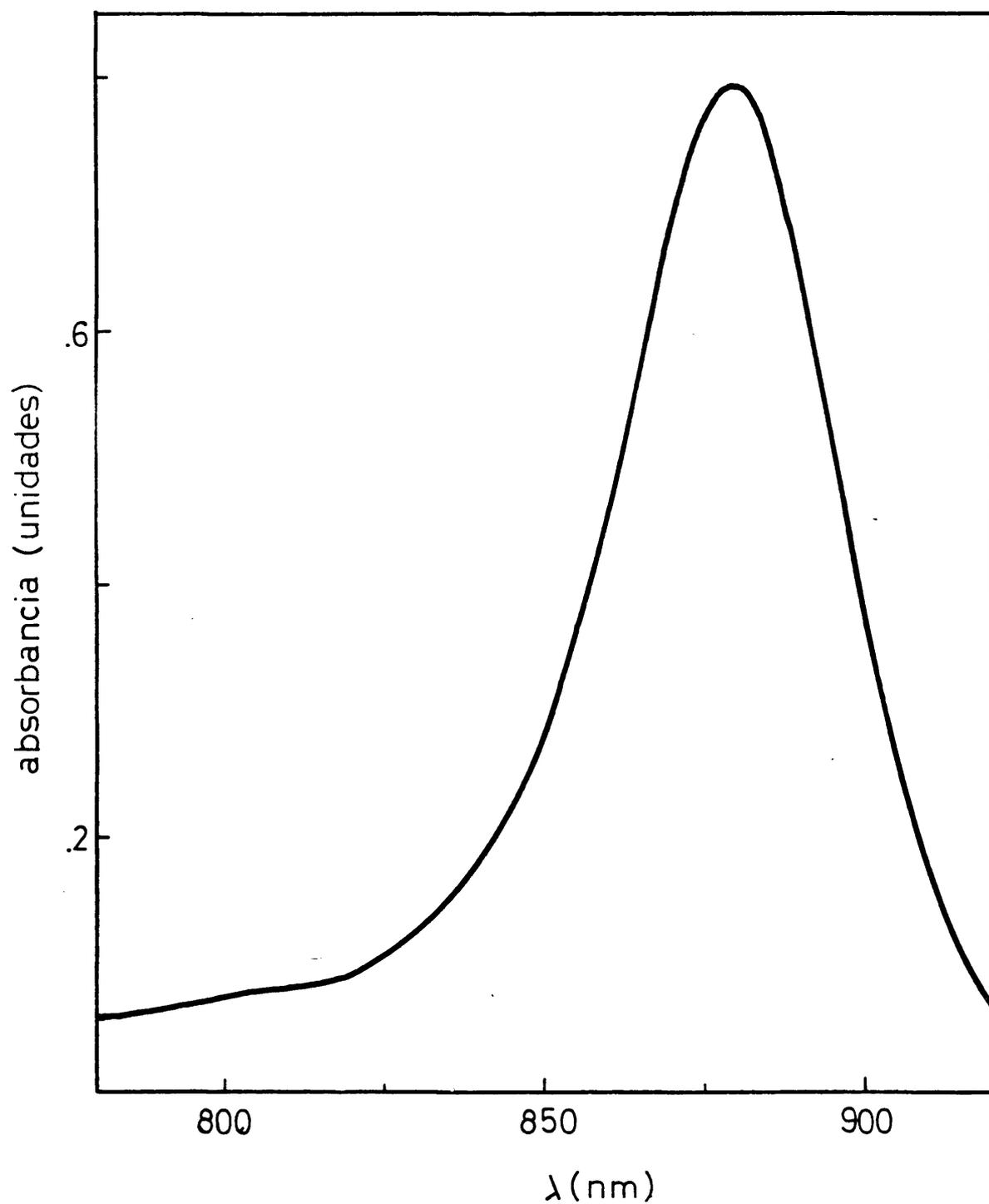


Fig. 9.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T102.2 crecida en condiciones fototróficas.

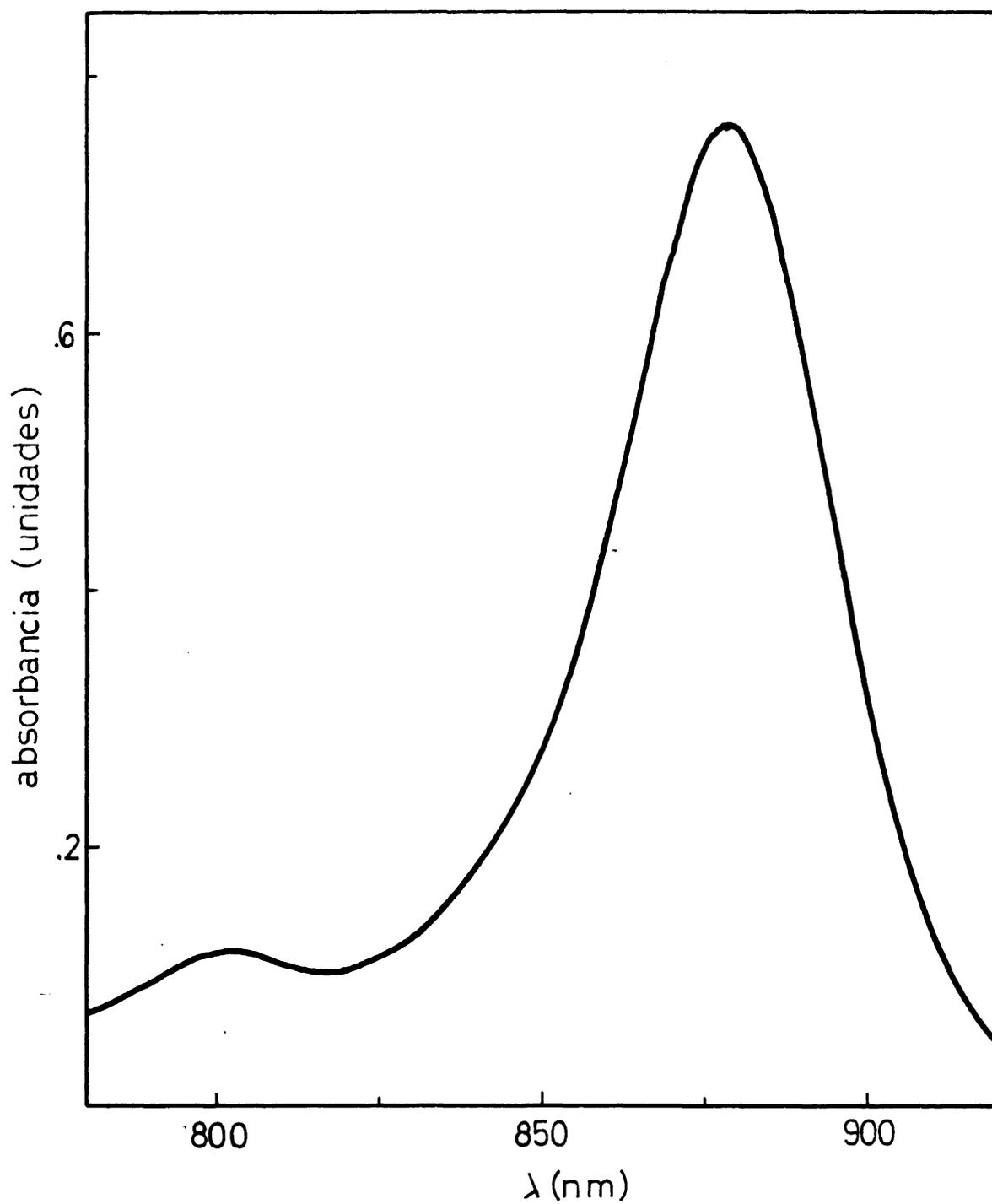


Fig. 10.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T102.3 crecida en la luz.

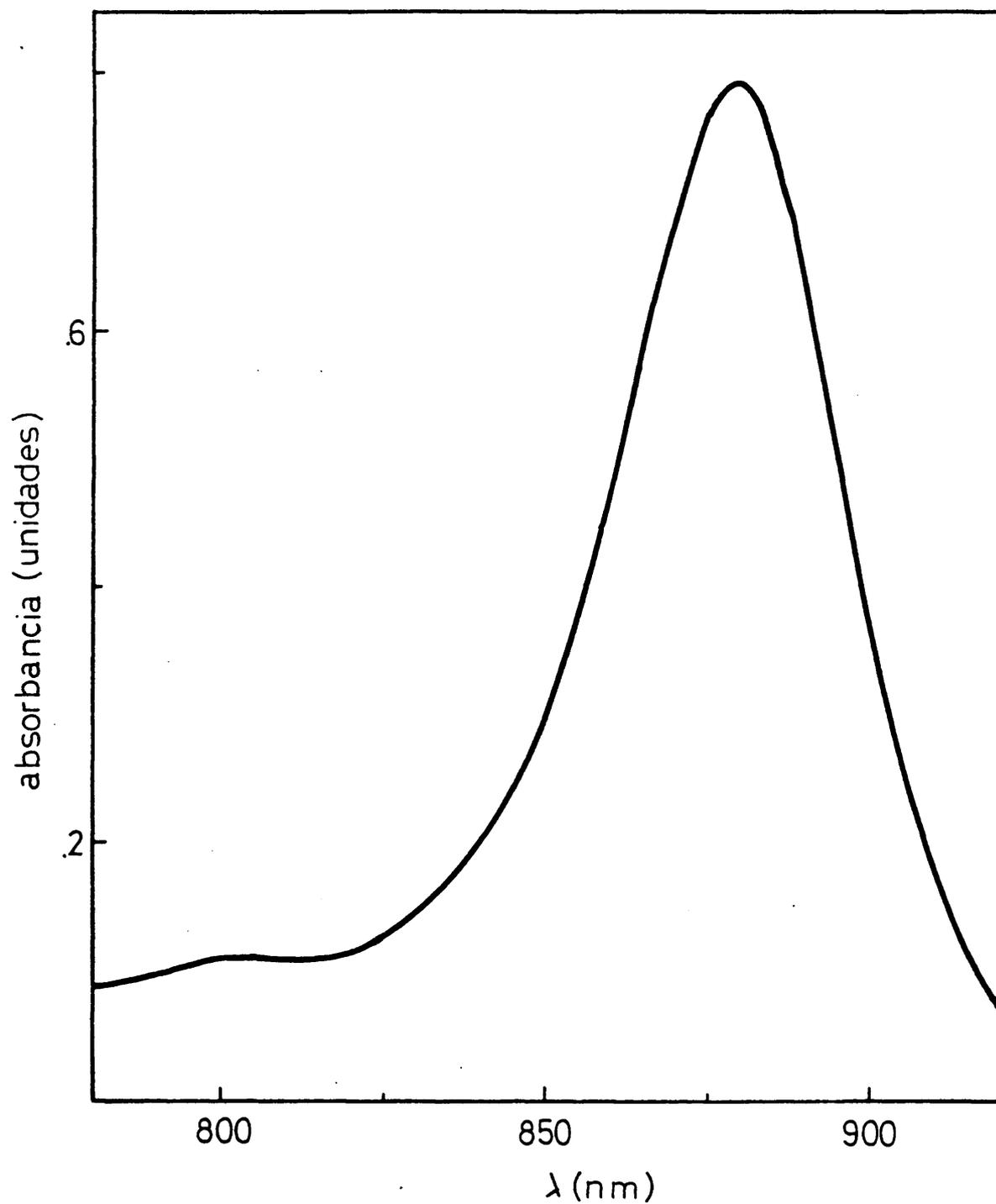


Fig. 11.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T102.4 crecida en la luz.

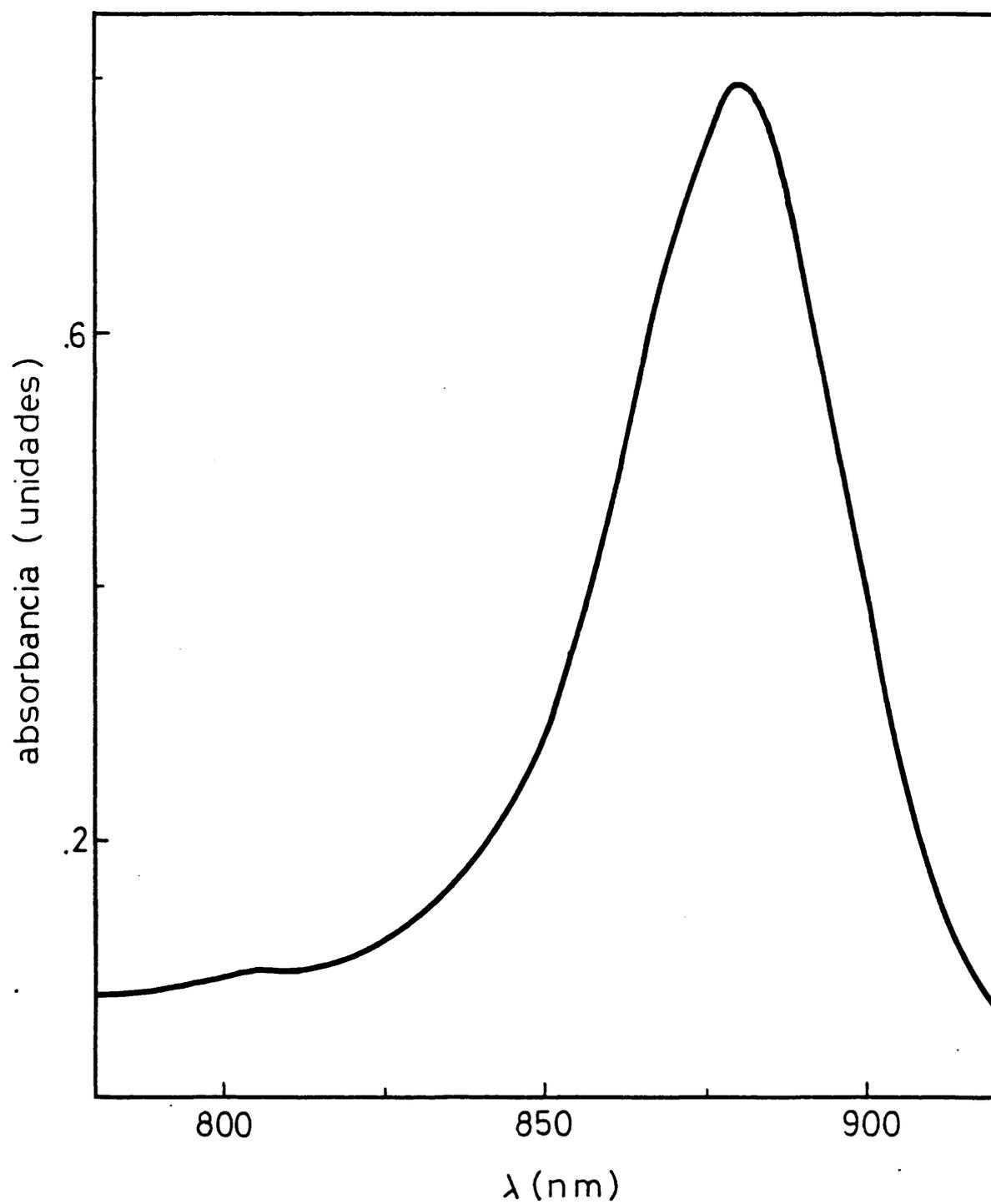


Fig. 12.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T102.5 crecida en condiciones fototróficas.

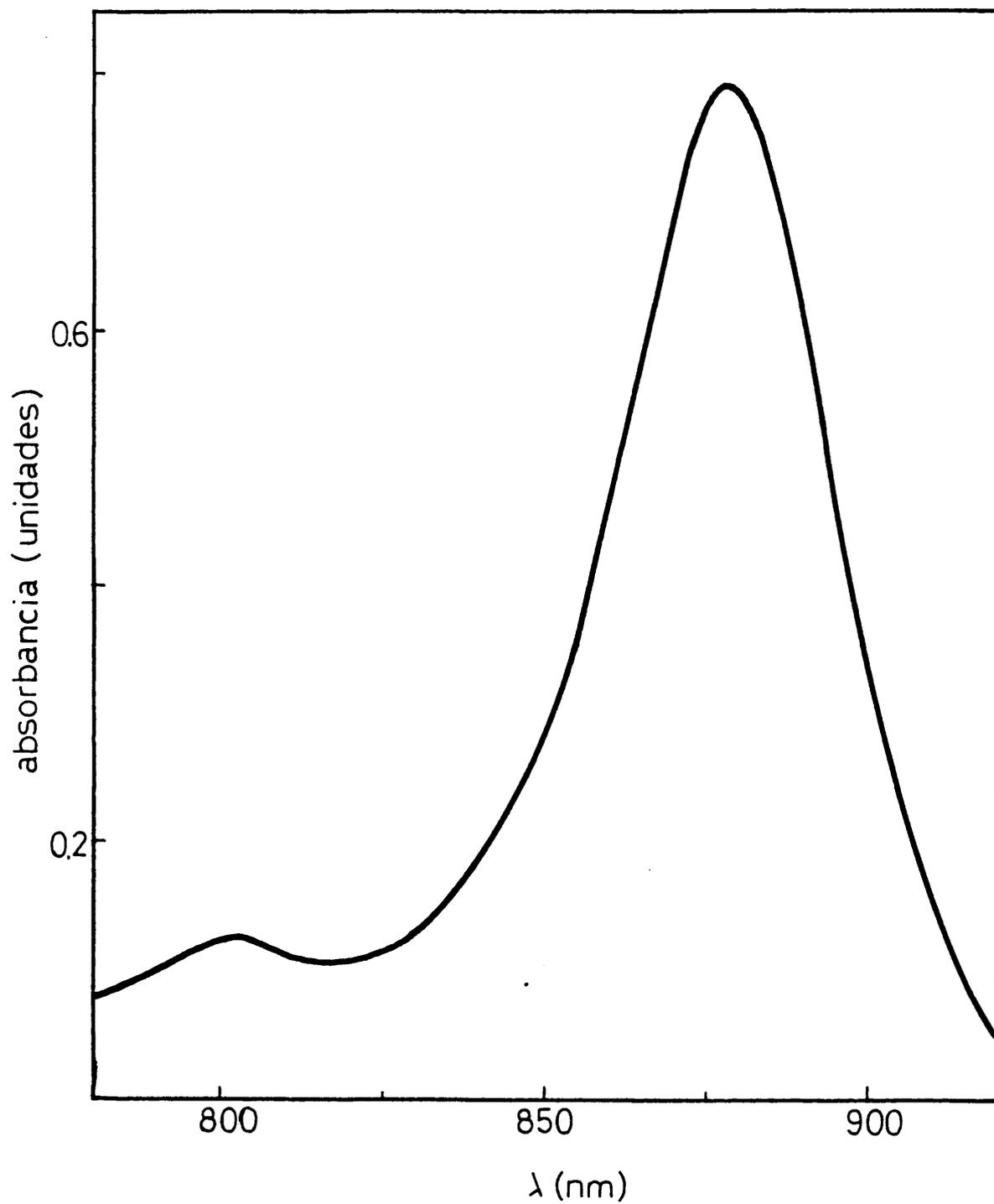


Fig. 13.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T102.6 crecida en condiciones fototróficas.

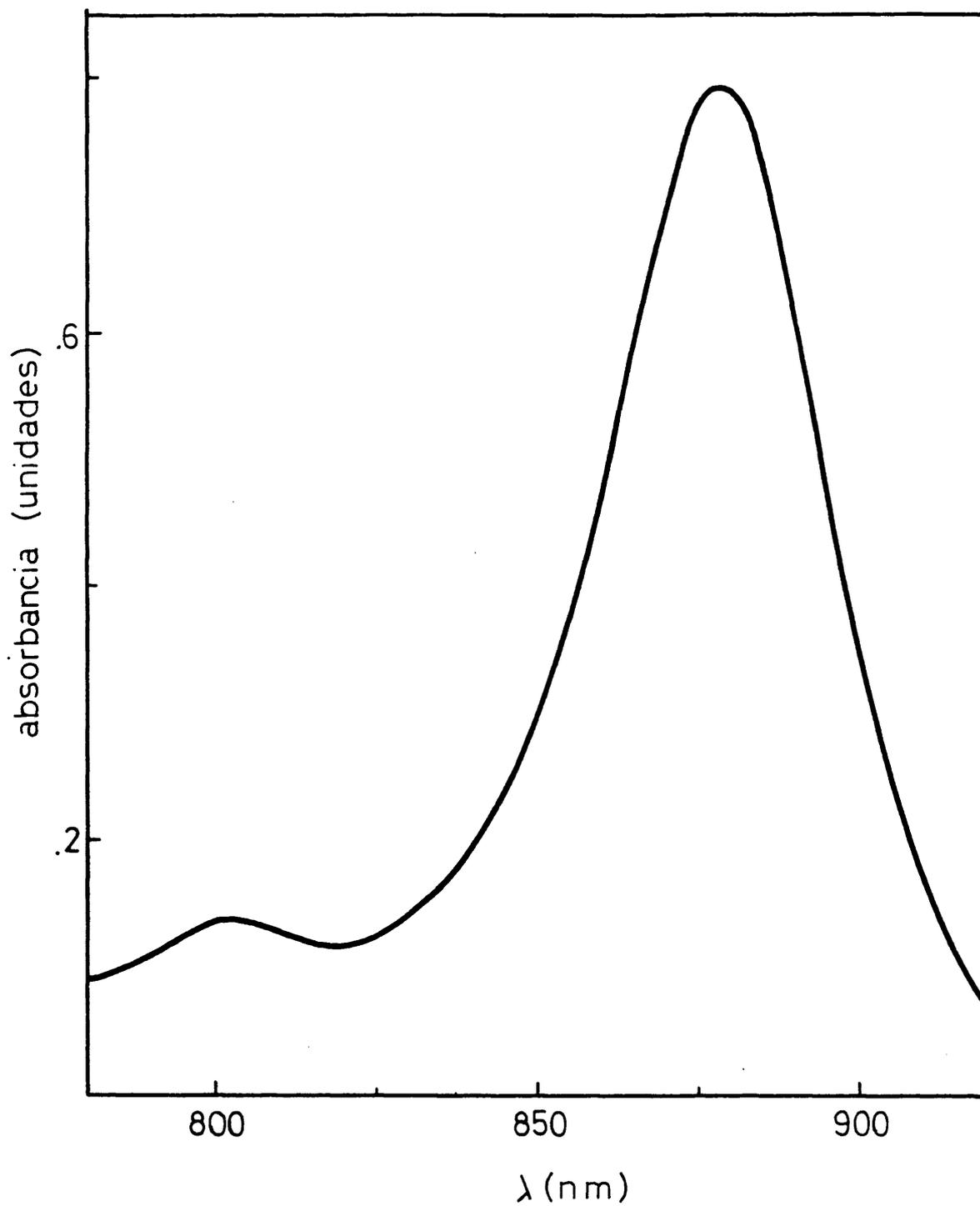


Fig. 14.- Espectro de absorción en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe revertiente T90.1 crecida en la luz.

dichos revertientes, parámetro que nos indicaría la capacidad fotosintética de las estirpes con distintos niveles de P800. Sorprendentemente se comprobó que todas las revertientes crecían a una velocidad normal o próxima a la normal con respecto a sus silvestres (datos no presentados aquí).

Varias preguntas importantes cabe hacerse a la vista de los resultados anteriormente expuestos. ¿Existe un segundo centro de reacción que opera en R. rubrum y que se encuentra enriquecido en las estirpes fototróficas deficientes en P800? ¿Es posible que el centro de reacción normal se haya modificado estructuralmente dando lugar a un espectro diferente o a una variación en el estado redox de la bacterioclorofila especial del centro de reacción? ¿Es suficiente una pequeña cantidad de centro de reacción normal para satisfacer las necesidades energéticas en un crecimiento fototrófico de R. rubrum, estando en exceso en la cepa silvestre?. Para atacar el problema se ha elegido F24.1 como material de estudio comparándola en todo momento con S1 y F24.

3.3. PROPIEDADES GENERALES DE LA ESTIRPE F24.1

3.3.1. ESPECTRO DE LOS PIGMENTOS "IN VIVO" E "IN VITRO"

Aunque ya se presentó en la Fig. 7 el espectro de los pigmentos de cromatóforos en la región del IR-cercano, era interesante comprobar si existía alguna diferencia en otras regiones del espectro. Para ello se hicieron los espectros de cromatóforos de las cepas S1, F24 y F24.1 en el IR-cercano y visible (Figs. 15-17). Como se desprende del análisis de los espectros, las únicas diferencias ob-

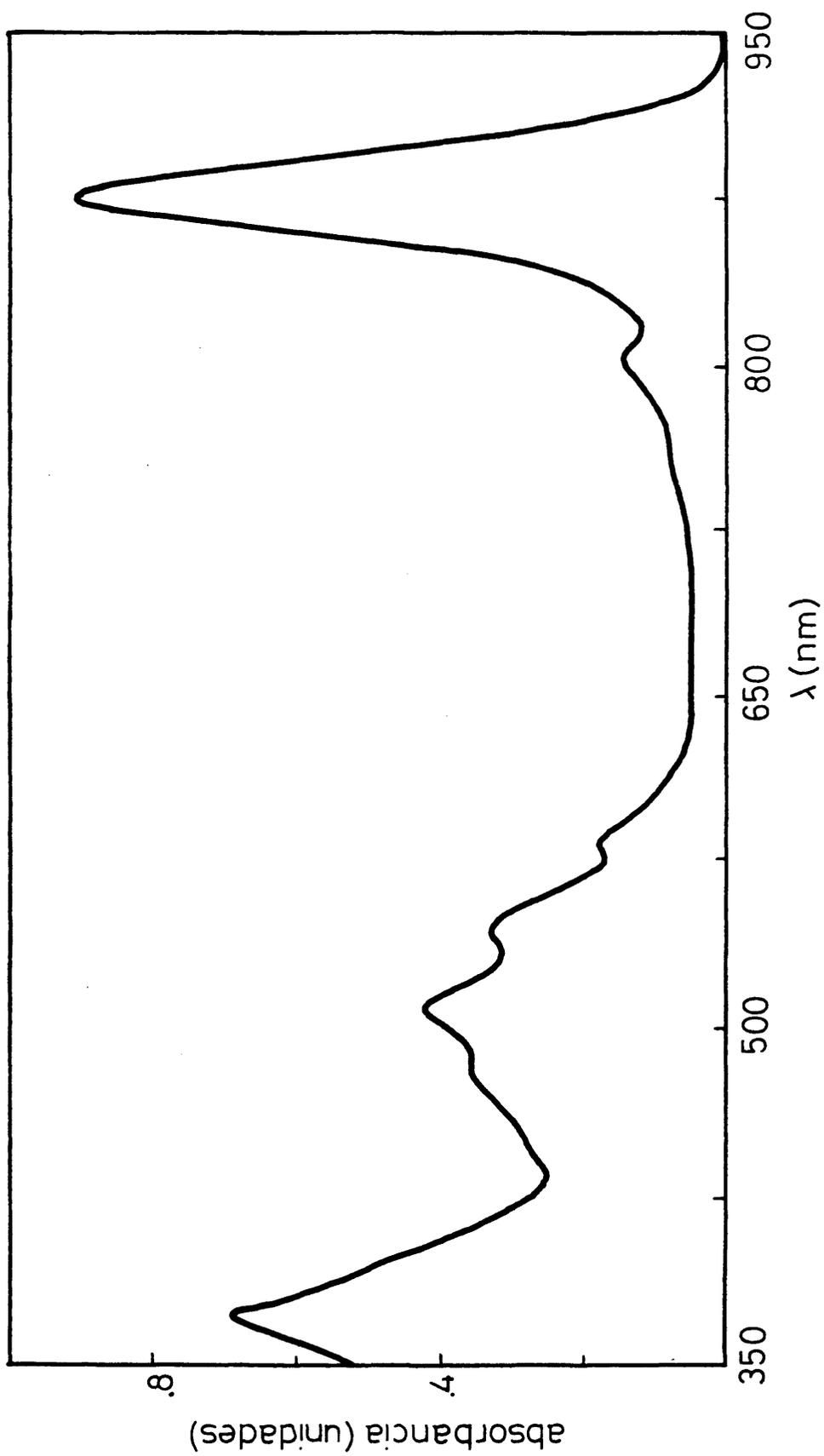


Fig. 15.- Espectro de absorción de los pigmentos "in vivo" de la estirpe S1 crecida en la luz, en el IR-cercano y visible.

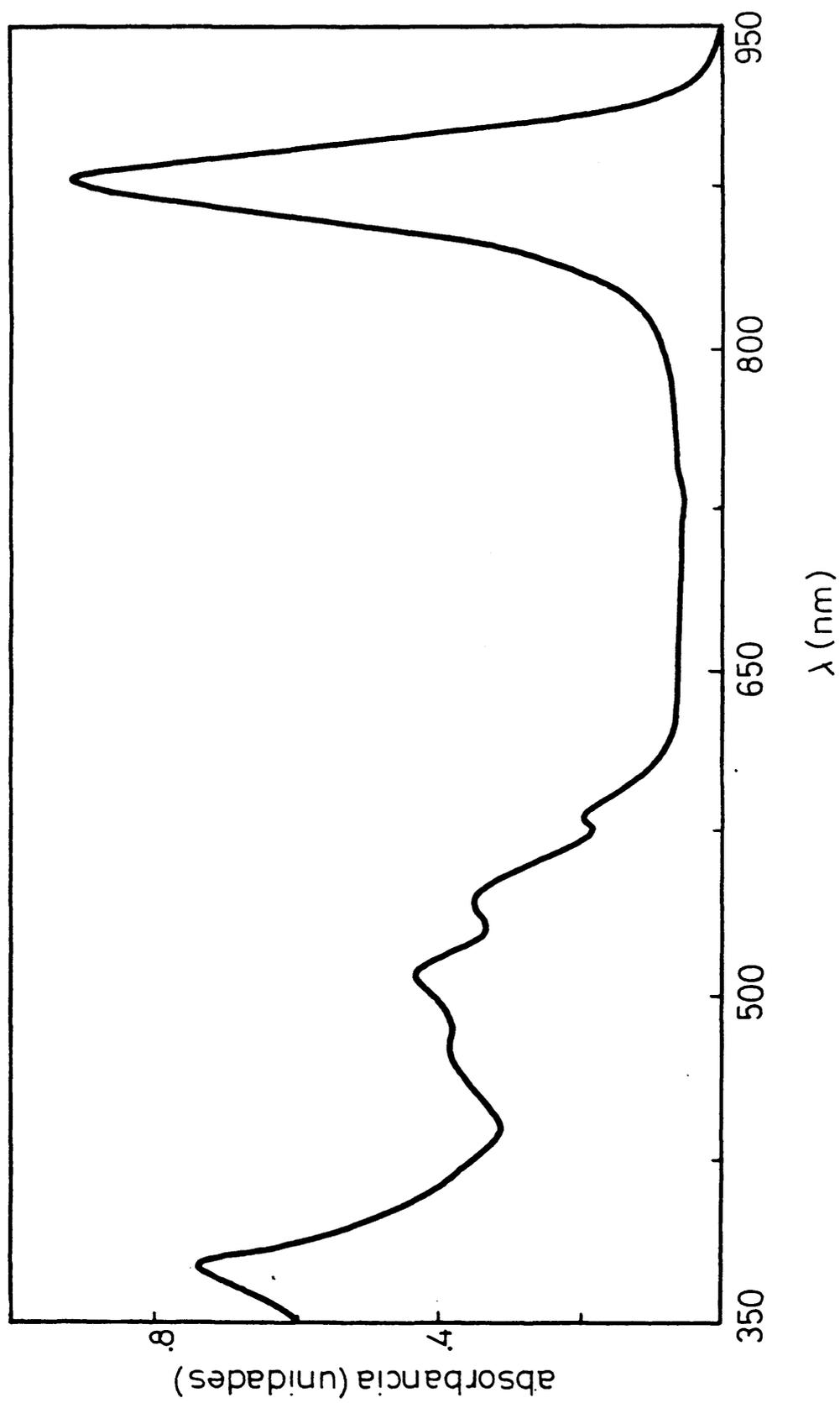


Fig. 16.- Espectro de absorción de los pigmentos "in vivo" de la estirpe F24 en el IR-cercano y visible.

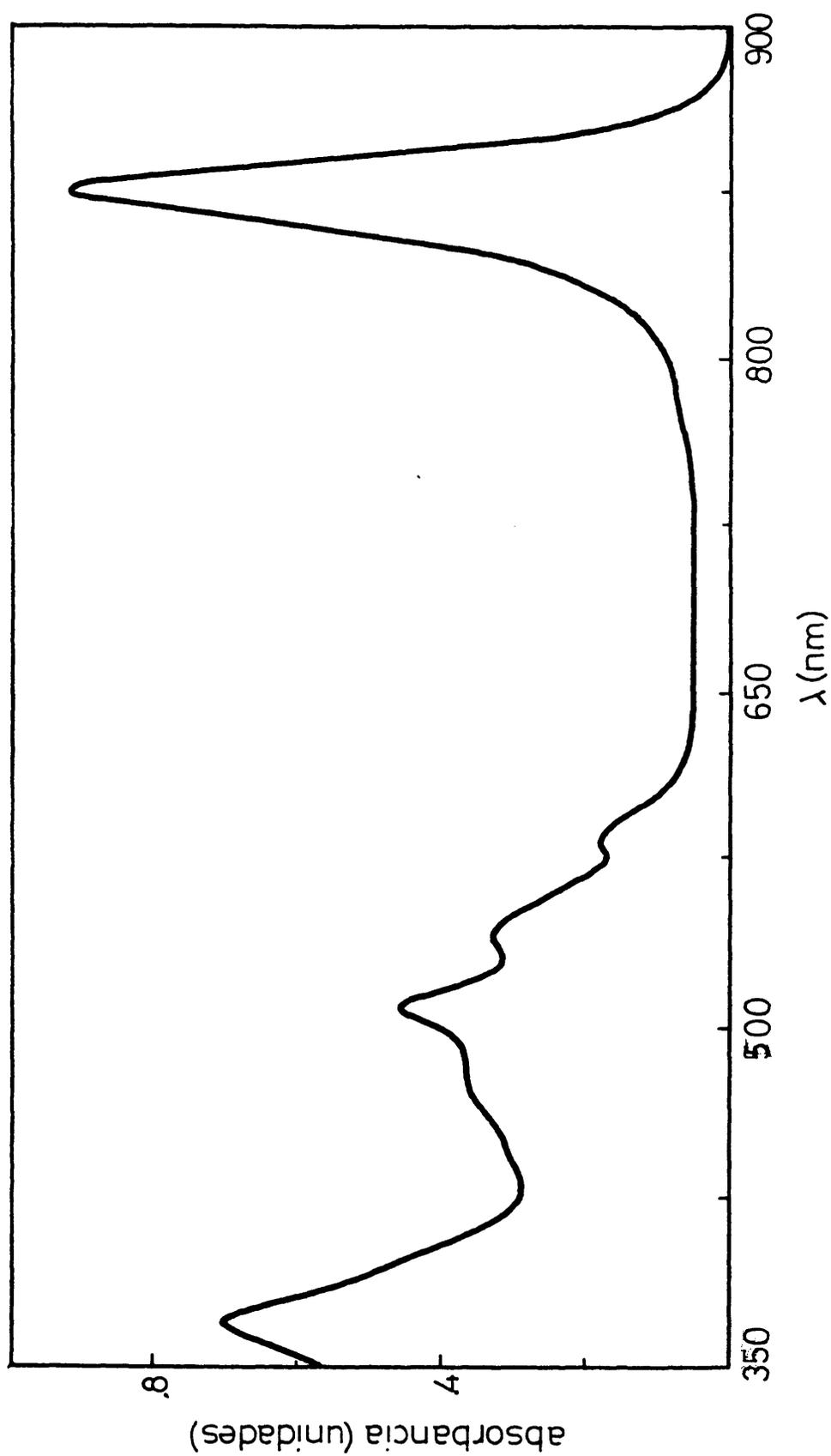


Fig. 17.- Espectro de absorción de los pigmentos "in vivo" de la estirpe F24.1 en el IR-cercano y visible.

servadas corresponden al IR-cercano ya descritas anteriormente (Fig. 2 y 7). Las demás bandas del espectro se corresponden perfectamente con las del silvestre.

Los pigmentos de F24.1 extraídos con acetona/metanol (7/2) mostraron espectros en la región visible perfectamente equiparables al silvestre (Fig. 18).

Por tanto, podemos afirmar que los pigmentos de F24.1 no presentan ninguna modificación importante, aparte de las del centro de reacción, tanto en su composición química como en su distribución y orientación en las membranas fotosintéticas.

3.3.2. CURVAS DE CRECIMIENTO FOTOTROFICO

Cuando se transfiere un preinóculo semiaeróbico de F24.1 a condiciones fototróficas sufre un retraso antes de comenzar a crecer, (experimentos en curso tratan de analizar los factores que pueden influir en dicho retraso). Sin embargo, cuando se parte de un preinóculo fototrófico el comienzo del crecimiento es inmediato, no apareciendo retraso alguno. En cualquier caso, el crecimiento exponencial en condiciones fototróficas de F24.1 es próximo al normal, como se desprende del cálculo de los tiempos de generación a partir de la Fig. 19. Dicho crecimiento no se puede atribuir a procesos fermentativos ya que un cultivo en las mismas condiciones de anaerobiosis, pero mantenido en la oscuridad, no experimentó crecimiento alguno. Asimismo, se encontró el mismo rendimiento fototrófico en ambas estirpes, S1 y F24.1, prueba evidente de que no funcionan procesos fermentativos en presencia de luz en F24.1.

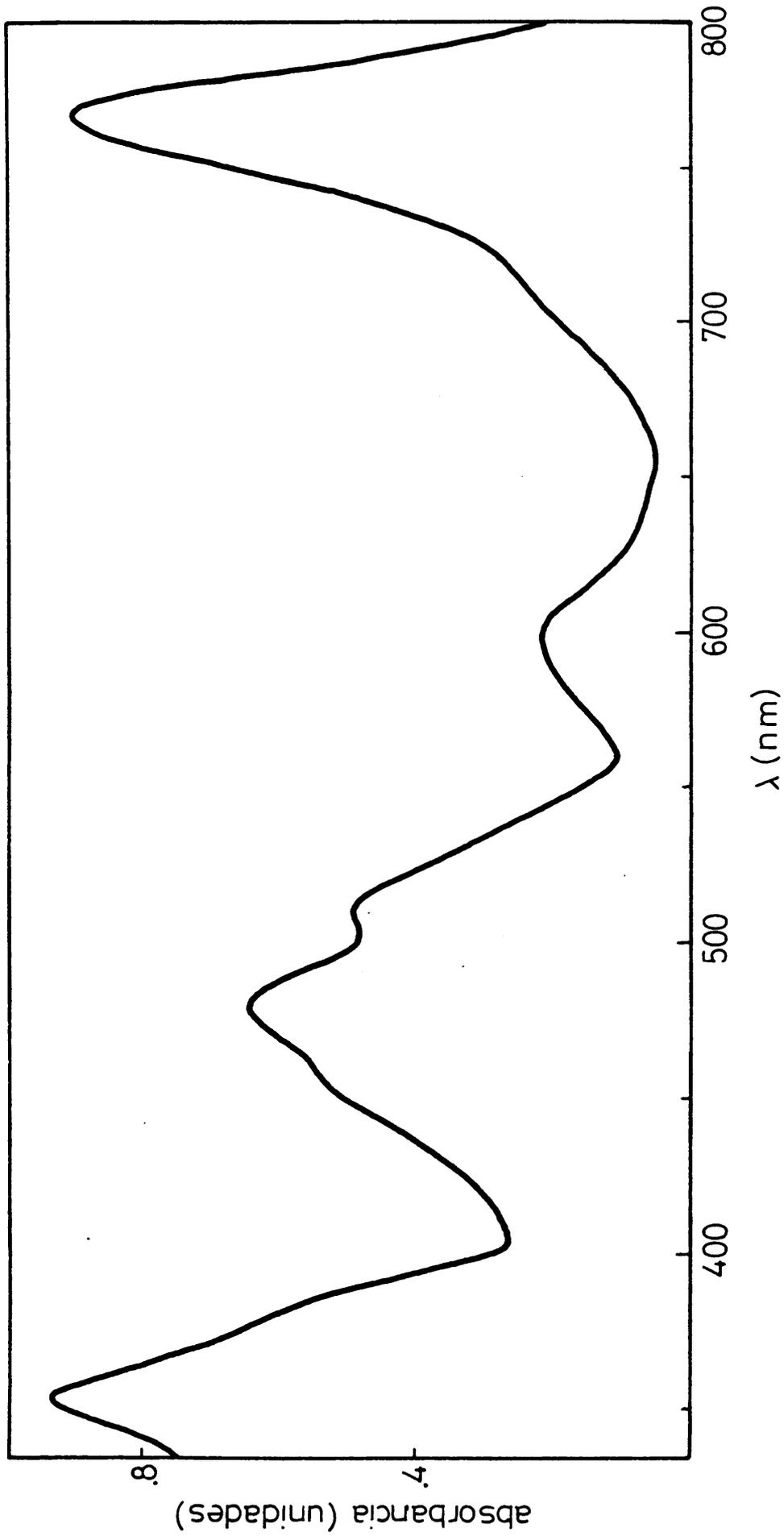


Fig. 18.- Espectro de absorción en el visible de los pigmentos de F24.1 extraídos con acetona/metanol (7/2).

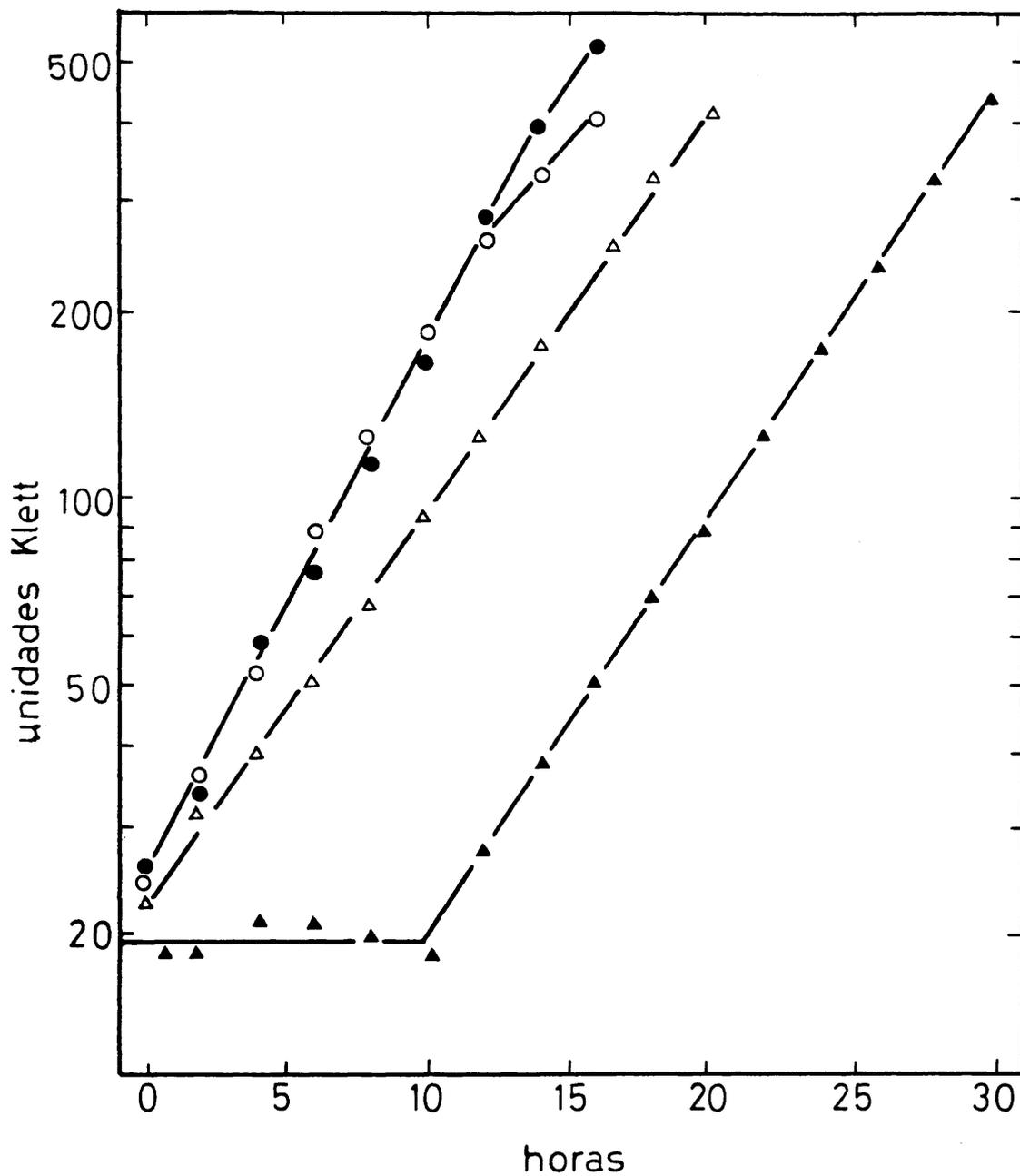


Fig. 19.- Crecimiento dependiente de luz de *R. rubrum*.
 Células crecidas previamente en la oscuridad (▲, ●) y células crecidas previamente en la luz (△, ○), de las estirpes silvestre (●, ○) y F24.1 (▲, △).

3.3.3. FOTOFOSFORILACION EN CELULAS ENTERAS

Una prueba que nos indica si un aparato fotosintético es funcional consiste en medir la capacidad de fosforilación inducida por luz en células enteras. Para ello se medía la acumulación de ATP en células enteras, después de un breve tiempo de iluminación (ver MATERIALES Y METODOS). Como se muestra en la Fig. 20 los resultados concuerdan con lo que cabría esperar: la estirpe F24.1 crecida en la luz acumulaba cantidades de ATP similares a la estirpe silvestre S1, cosa que no ocurría con células de F24.1 crecidas en la oscuridad. Dichos datos corroboran la existencia de un aparato fotosintético funcional en las células de F24.1 fototróficas, y la presencia en F24.1 semiaeróbico de un aparato fotosintético incompleto, indicando que durante el periodo de retraso en el crecimiento se sintetiza algún componente esencial para que la función fotosintética se pueda llevar a cabo.

3.3.4. INHIBICION DE LA RESPIRACION POR EFECTO DE LA LUZ

La falta de actividad fotosintética en células de F24.1 crecidas en condiciones semiaeróbicas podría ser debido a la inactivación de los centros de reacción de esta estirpe por el O_2 . Esa podría ser la razón de la ausencia de P800 en el espectro de la Fig. 7. Tal interpretación no parece ser correcta ya que el aparato fotosintético de células de F24.1 crecidas en la luz es funcional incluso en presencia de O_2 : células fototróficas del revertiente sufrían una drástica inhibición del consumo de O_2 cuando se iluminaban, de manera similar a lo que ocurría en S1 (Fig. 21). Esta inhibición requiere conservación de energía (Ramírez et al., 1968) y no se observa en mutantes con centros de reacción no funcionales (Takemoto et al., 1974) o en células de F24.1 crecidas semiaeróbicamente (Fig. 21).

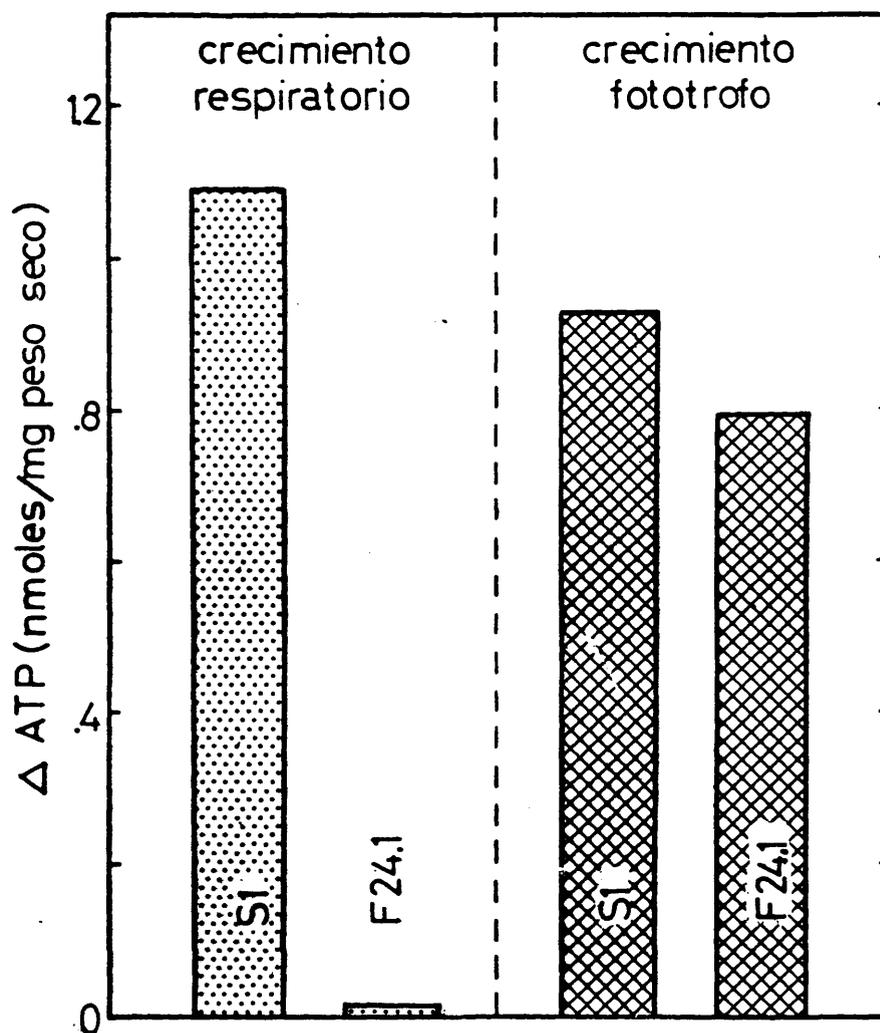


Fig. 20.- Incremento dependiente de luz de los niveles internos de ATP de suspensiones de células anaeróbicas.

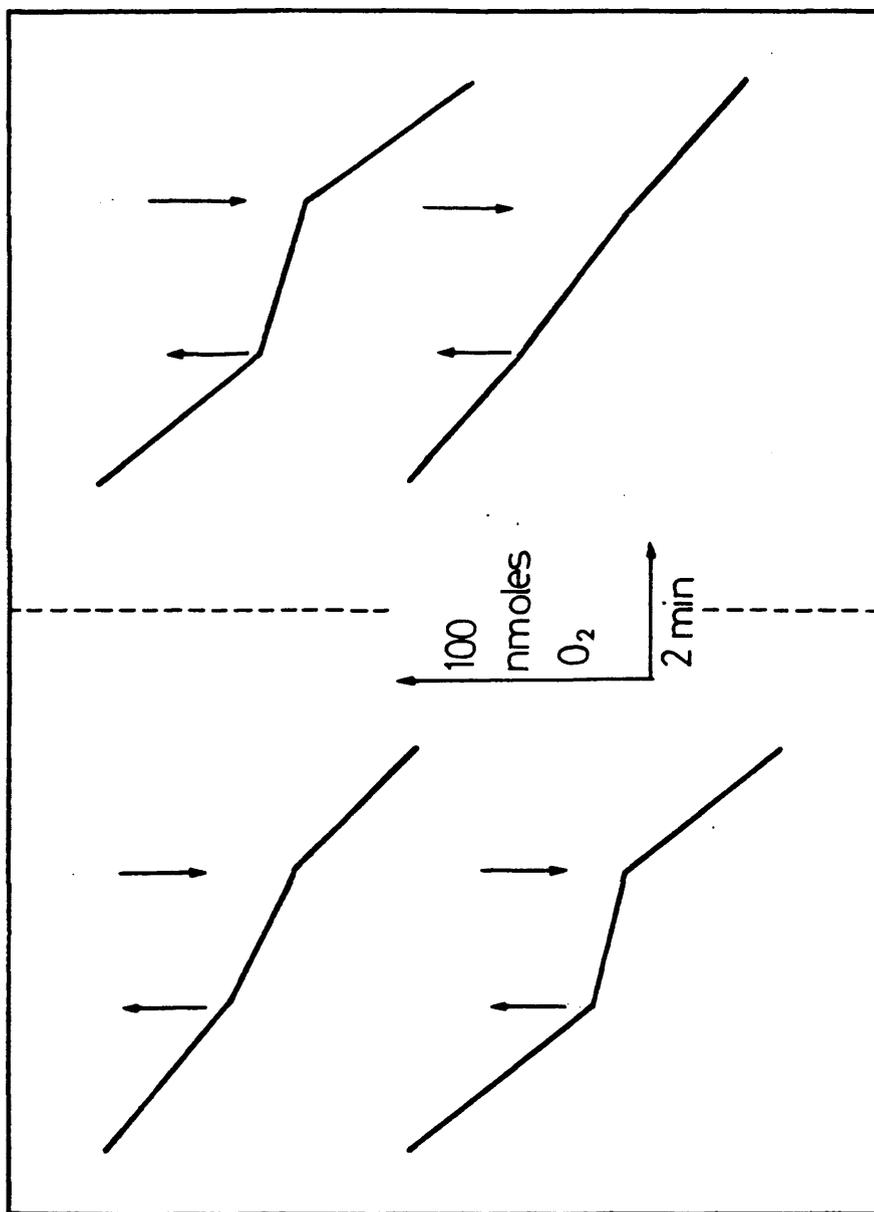


Fig. 21.- Efecto de la iluminación sobre la velocidad de consumo de O₂ por R. rubrum. Células crecidas en la luz (a) y células crecidas en la oscuridad (b) se resuspendieron en medio de cultivo fresco.

Con los resultados expuestos en esta sección se puede concluir que las células fototróficas de la estirpe revertiente F24.1 realizan fotosíntesis con una eficiencia próxima a la normal, a pesar de poseer una pequeñísima cantidad de P800. Para intentar llegar a un conocimiento más detallado y preciso de los mecanismos que operan en F24.1 hemos analizado detalladamente los centros de reacción de dicha estirpe mutante así como las reacciones más íntimamente relacionadas con la separación de cargas que tiene lugar en los mismos. Nuestro estudio consta de tres partes fundamentales: determinación del tipo o tipos de centros de reacción que funcionan en F24.1 y cuantificación de los mismos, análisis del potencial de membrana generado por la luz en cromatóforos y caracterización detallada mediante cinética rápida de las reacciones de óxido-reducción inducidas por destellos cortos en células enteras.

3.4. DETERMINACION CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DEL CENTRO DE REACCION QUE OPERA EN F24.1

A la vista de los resultados anteriores, que con firman la existencia en F24.1 fototrófico de un aparato fo tosintético que funciona con una eficiencia próxima a la normal en S1, se hacía necesario caracterizar y cuantificar el centro o los centros de reacción que funcionan en dicha estirpe revertiente. El problema se planteaba difícil debido a que todos los ensayos de las propiedades adscritas a los centros de reacción daban actividades muy disminuidas en F24.1. Esto nos ha obligado a utilizar técnicas muy sensibles y muy variadas, para estar seguros de que los resultados que se obtenían eran absolutamente fiables. En esta misma línea comprobamos que ciertas inter-ferencias, que eran despreciables en S1, se hacían muy os-

tensibles en F24.1, dificultando el análisis de los datos. Sin embargo, dichas dificultades se han solucionado en cada momento de manera satisfactoria.

3.4.1. ESPECTRO ABSOLUTO DE LOS PIGMENTOS ALREDEDOR DE 800 nm DE UNA SUSPENSION CONCENTRADA DE CROMATOFOROS

La Fig. 22 representa los espectros de los pigmentos de la región próxima a 800 nm, de una suspensión de cromatóforos con una $A^{1\text{cm}} = 3$ en el máximo a 880 nm. Se aumentó la concentración de pigmentos para ver de una manera más clara las diferencias cuantitativas entre las estirpes silvestre S1, la mutante F24 y la revertiente F24.1. Cuando se hacían las diferencias $A_{800\text{ nm}}(S1) - A_{800\text{ nm}}(F24)$ y $A_{800\text{ nm}}(F24.1) - A_{800\text{ nm}}(F24)$ se veía que la segunda era como un 6% respecto a la primera. Ello parece sugerir que el P800 presente en F24.1 es como un 6% respecto al que existe en S1, si admitimos que la estirpe no fototrófica carece totalmente de P800.

No obstante, este cálculo debe considerarse sólo aproximado debido a la influencia que pueda ejercer sobre la región de 800 nm otras bandas cercanas. De hecho, un ligero desplazamiento de la banda principal puede tener una fuerte influencia sobre la absorción a 800 nm de F24 y F24.1. Este problema se ha solucionado en parte restando en cada espectro la absorción a longitudes de onda simétricas en la banda principal; tales diferencias se representan en la Fig. 22. Sin embargo, era necesario la cuantificación del P800 utilizando otros métodos más precisos.

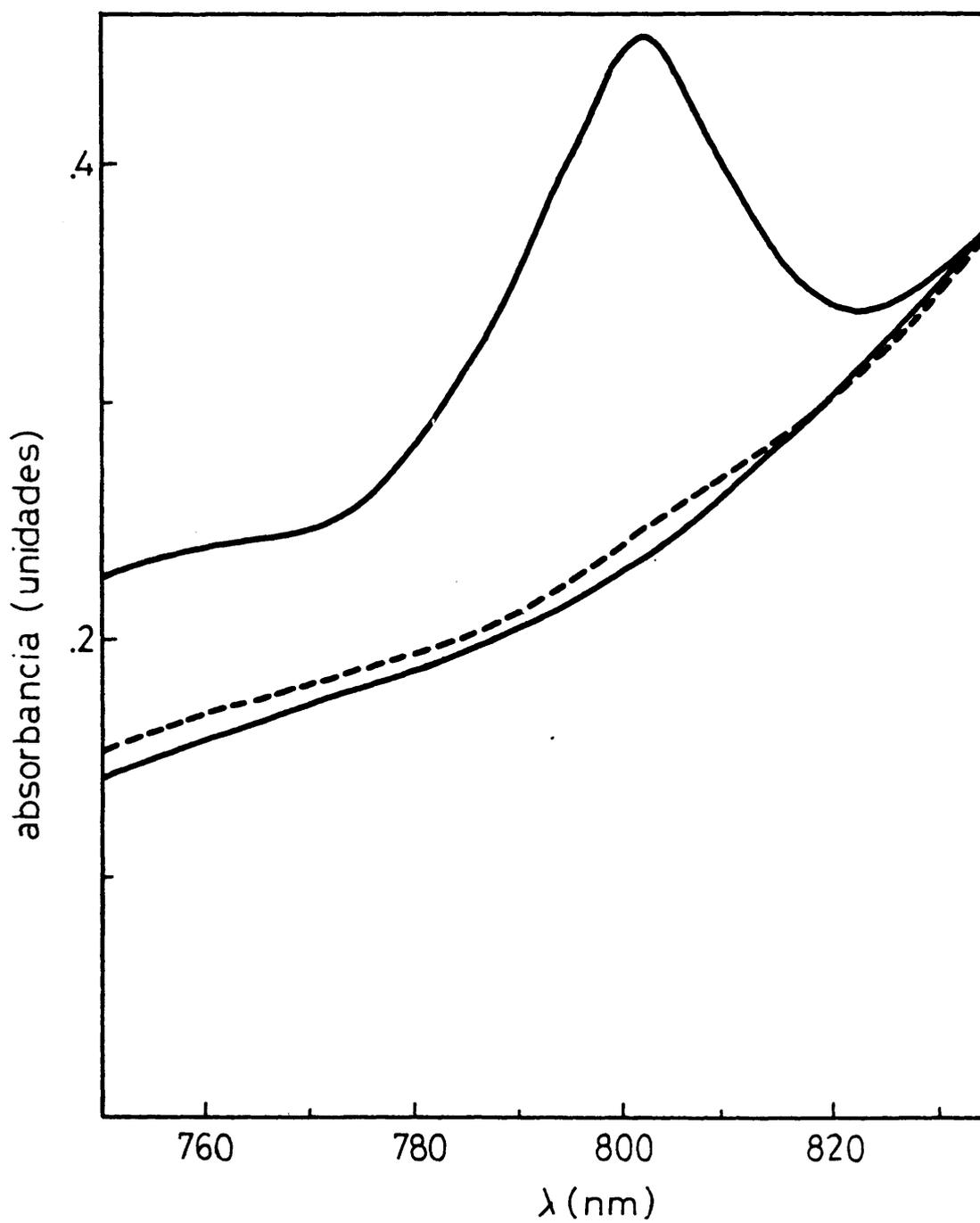


Fig. 22.- Espectro de absorción alrededor de 800 nm de cromatóforos de las estirpes S1, F24 y F24.1 ($A_{880\text{nm}}^{1\text{cm}} = 3$).

3.4.2. ESPECTRO DIFERENCIAL OXIDADO-REDUCIDO EN LA REGION DE 800 nm

Como ya hemos indicado, cuando se tratan los cromatóforos de la estirpe silvestre con un oxidante químico, el ferricianuro potásico, tiene lugar un desplazamiento de la banda centrada a 803 nm y atribuida al centro de reacción (Fig. 5). Dicho desplazamiento no ocurre en cromatóforos de la estirpe no fototrófica F24 (Fig. 6). Por el contrario cuando se tratan los cromatóforos de F24.1 con el ferricianuro potásico aparece un pequeño, pero claro desplazamiento de dicha banda. Este desplazamiento es como un 7% del registrado en S1 (Fig. 23). Esta forma de cuantificar el desplazamiento de la banda de 803 nm, sirve para medir de manera precisa la cantidad de centros de reacción que hay en una suspensión de cromatóforos. Sin embargo, el utilizar reactivos químicos en la región de 870 nm para cuantificar el centro de reacción induce a obtener conclusiones erróneas, como las obtenidas por otros autores (Barsky and Samuilov, 1973), ya que en esta región tienen lugar oxidaciones reversibles de la bacterioclorofila de antena que distorsionan y aumentan considerablemente el espectro diferencial del centro de reacción.

3.4.3. ESPECTRO DIFERENCIAL LUZ-OSCURIDAD EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE DESACOPLANTES

Los datos obtenidos con oxidantes químicos se confirmaron cuando se utilizó luz actínica para provocar los cambios. Cromatóforos iluminados de la estirpe silvestre presentaban varias características importantes en el IR-cercano atribuibles a procesos de óxido-reducción de la bacterioclorofila de centros de reacción: una decoloración del P870 y un desplazamiento de la banda del P800 (Fig. 24).

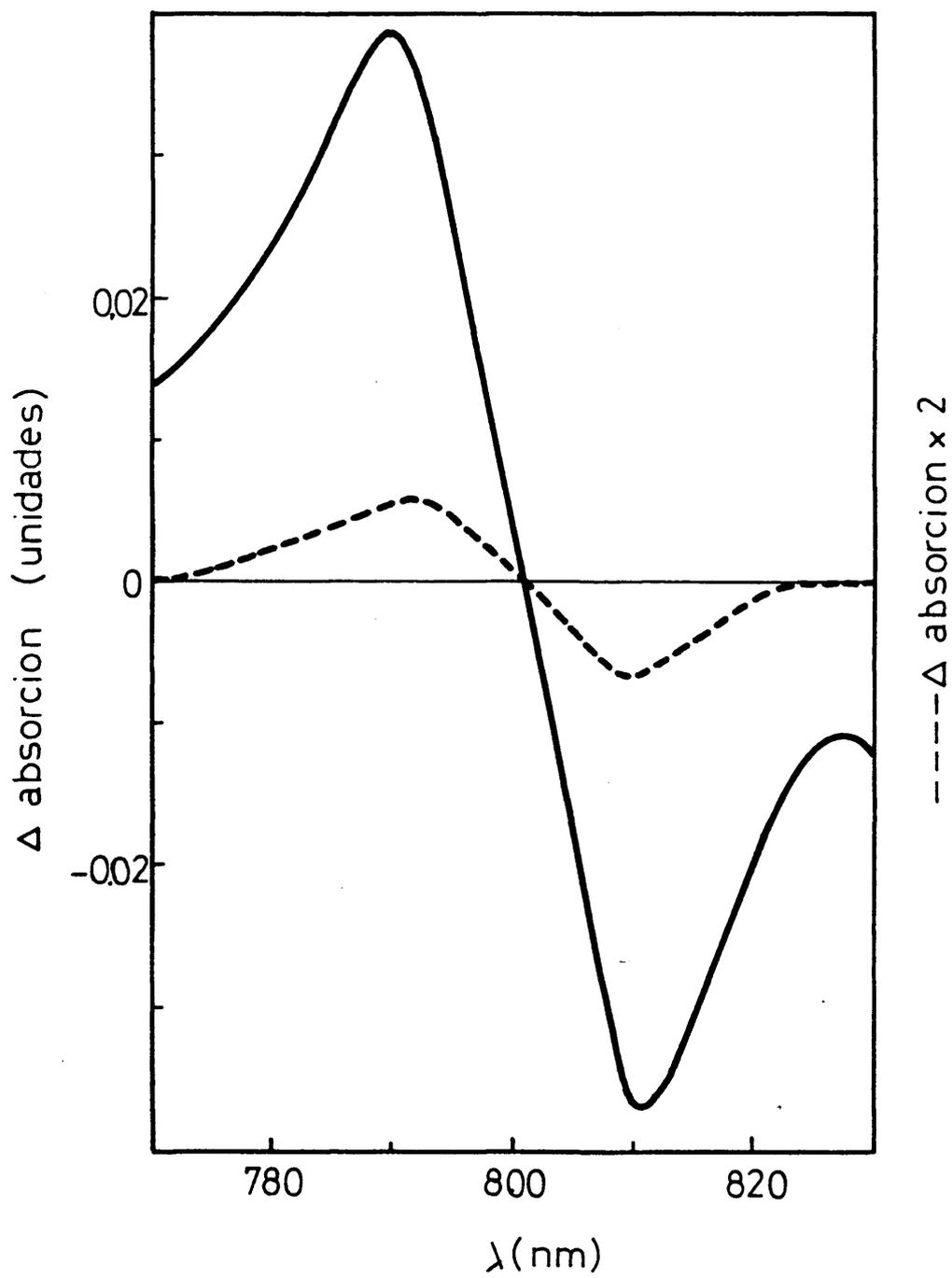


Fig. 23.- Espectro diferencial de absorción (oxidado-reducido) alrededor de 800 nm, de cromatóforos de las estirpes S1, F24 y F24.1.

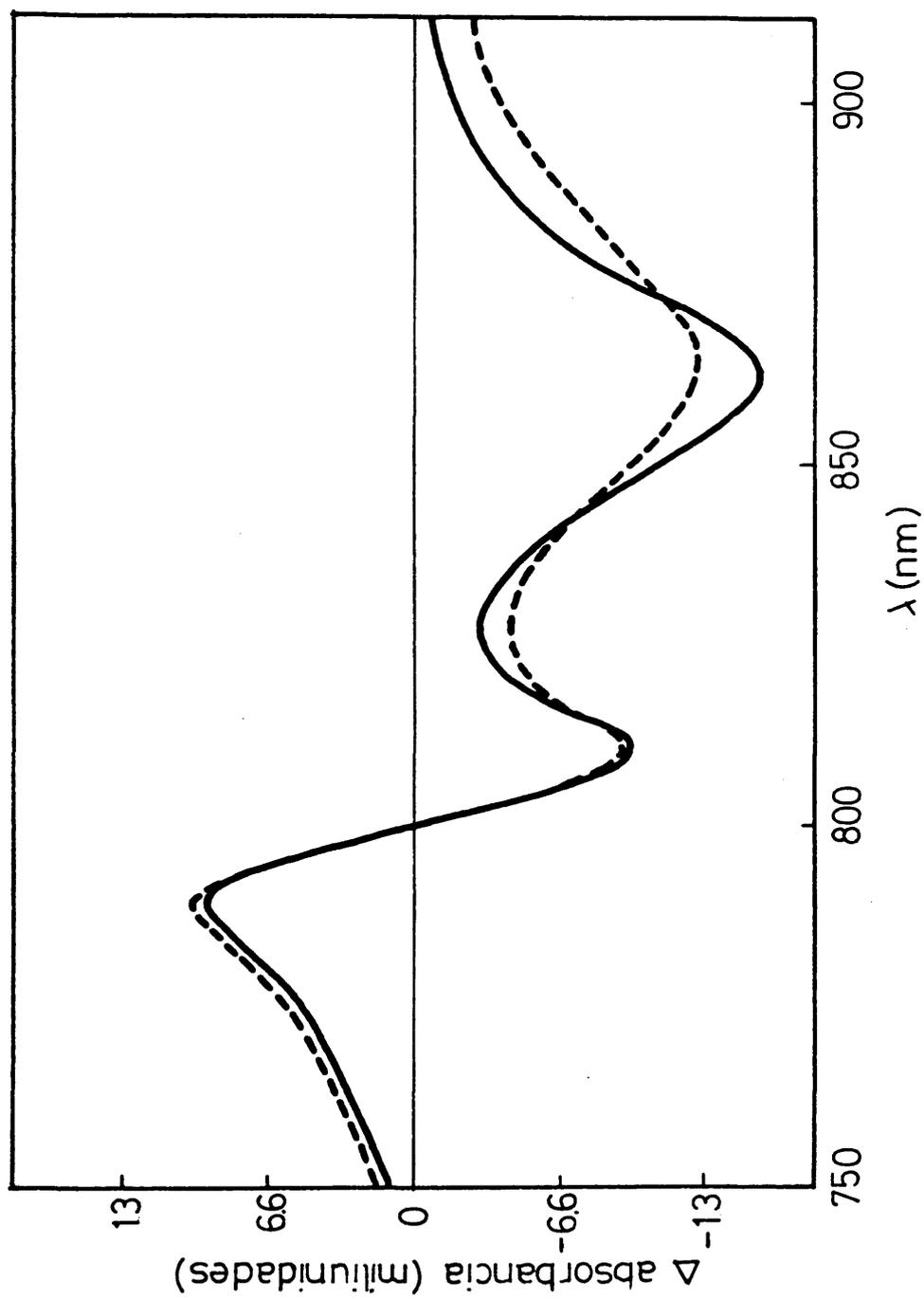


Fig. 24.- Espectro diferencial de absorción (luz-oscuridad) en el IR-cercano de cromatoforos de la estirpe S1 en presencia (---) y ausencia (—) del desacoplante Gramicidina D ($5 \mu\text{M}$).

La magnitud de estos cambios indica la cantidad de centros de reacción fotoquímicamente activos que existen en una suspensión de cromatóforos, y la forma del espectro puede indicar si dichos centros de reacción están modificados cualitativamente.

Asímismo cuando se iluminan cromatóforos aparece un desplazamiento de la banda principal de la bacterioclorofila de antena hacia longitudes de onda mayores, producido por los potenciales eléctricos de membrana que se establecen como consecuencia de los procesos redox que tienen su iniciación en la separación de cargas entre el donador y el aceptor primarios en los centros de reacción (efecto electrocrómico). Este desplazamiento nos da una idea de la generación de potencial de membrana inducido por la luz actínica y que se aprovechará principalmente para sintetizar ATP. Cuando se añadía un desacoplante del potencial de membrana, como la Gramicidina D, desaparecía el desplazamiento mostrando la forma del espectro algunas modificaciones, principalmente en la región del P870. En el caso de la estirpe F24.1, la modificación del espectro diferencial por efecto del desacoplante era muy pronunciada indicándonos que una parte muy importante del cambio del P870 no era una verdadera decoloración, sino un desplazamiento electrocrómico (Fig. 25). Por tanto, para cuantificar la decoloración atribuida al P870 en cromatóforos debemos de considerar los cambios obtenidos en presencia de un desacoplante.

Varias conclusiones se pueden sacar del análisis de estos resultados:

- a) La forma de los espectros inducidos por luz es indistinguible en ambas estirpes fototróficas.
- b) La cantidad de P800 y P870 en F24.1 es aproximadamente un 6% respecto a S1.

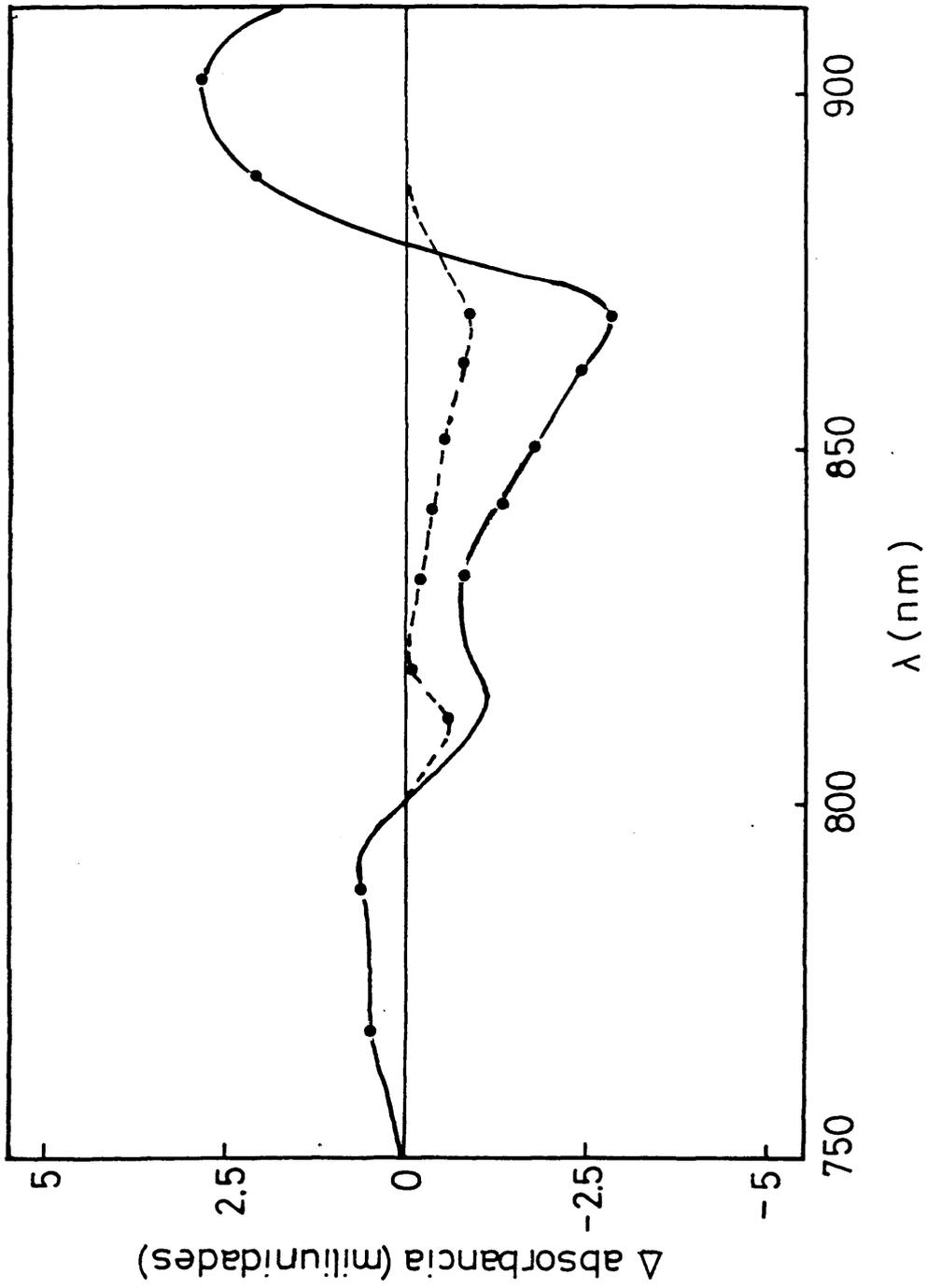


Fig. 25.- Espectro diferencial de absorción de absorción (luz-oscuridad) en el IR-cercano de cromatóforos de la estirpe fototrófica F24.1 en presencia (- - -) y ausencia (—) del desinfectante Gramicidina D (5 μ M).

- c) El potencial de membrana generado por la luz actínica es del mismo orden en ambas cepas (sobre este punto volveremos en secciones posteriores).

3.4.4. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS FOTOQUÍMICOS A 1245 nm

Los cromatóforos en su estado reducido no presentan ninguna absorción a 1245 nm. Sin embargo cuando los cromatóforos o los centros de reacción purificados se oxidan por efecto de la luz aparece una banda reversible en esta región del espectro (Dutton et al., 1975; Fajer et al., 1974). Basándose en estos resultados y en las propiedades de la bacterioclorofila, se ha atribuido dicha banda a la formación de un cation dimérico radical formado por el P870 oxidado. Además, el hecho de que en esta región no absorba la bacterioclorofila reducida ni ningún otro componente de los cromatóforos hace que se considere a esta región muy apta para el análisis de los cambios fotoquímicos atribuidos a los centros de reacción. La fig. 26 representa la cinética de los cambios inducidos por luz en cromatóforos de S1, F24 y F24.1. Las cinéticas son idénticas en S1 y F24.1 aunque la magnitud del cambio es como un 6% en F24.1 respecto al encontrado en S1. La estirpe no fototrófica no experimentó ningún cambio, tal como era de esperar.

3.4.5. CINÉTICA DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA EN CROMATOFOROS

Las membranas fotosintéticas emiten luz fluorescente cuando son excitadas con luz actínica. La mayor parte de dicha emisión se debe a la bacterioclorofila de antena, siendo prácticamente despreciable la contribución de los pigmentos del centro de reacción (Clayton, 1966). La presencia de centros de reacción en las membranas fotosintéticas

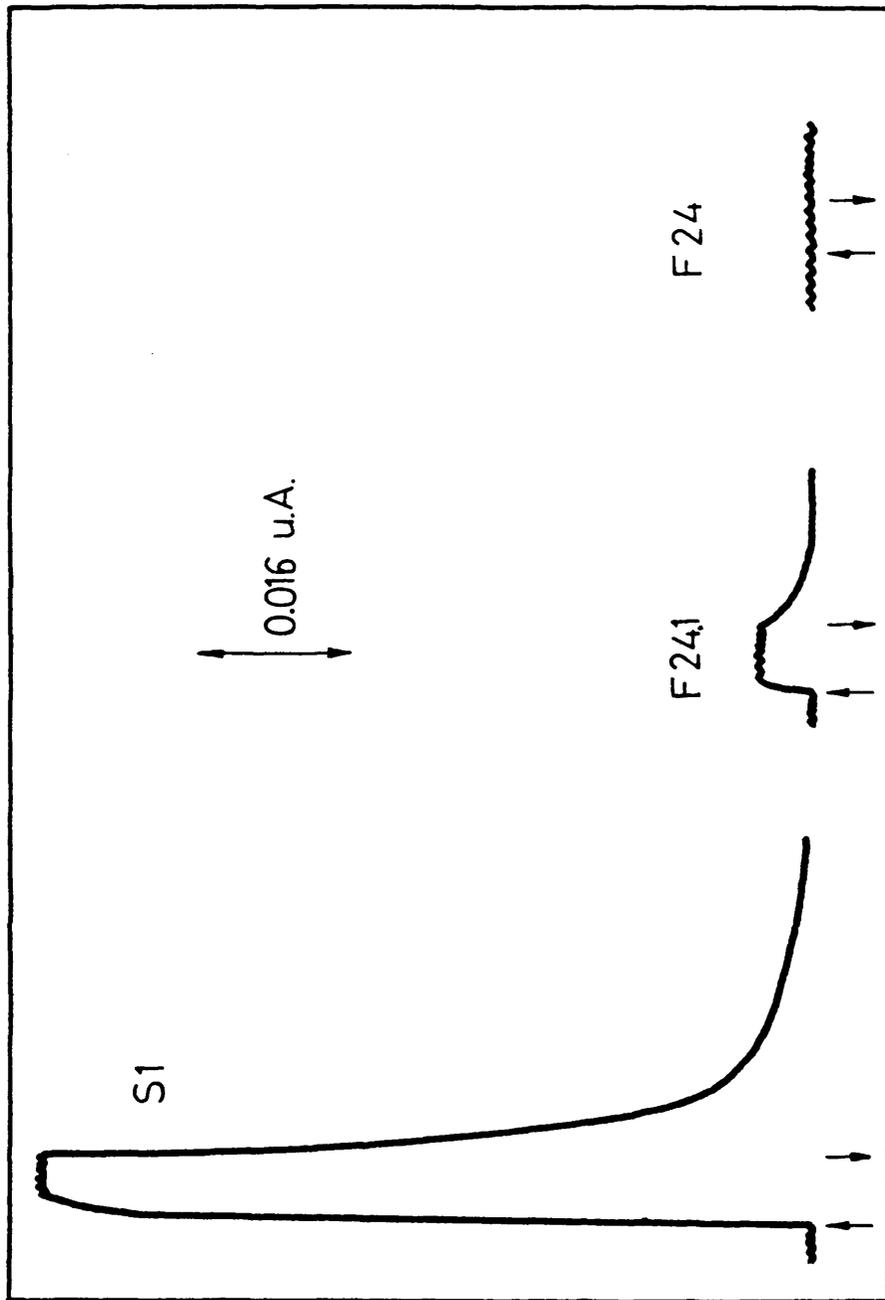


Fig. 26.- Cinética del cambio de absorción inducido por luz a 1245 nm en cromatóforos de las estirpes S1, F24 y F24.1.

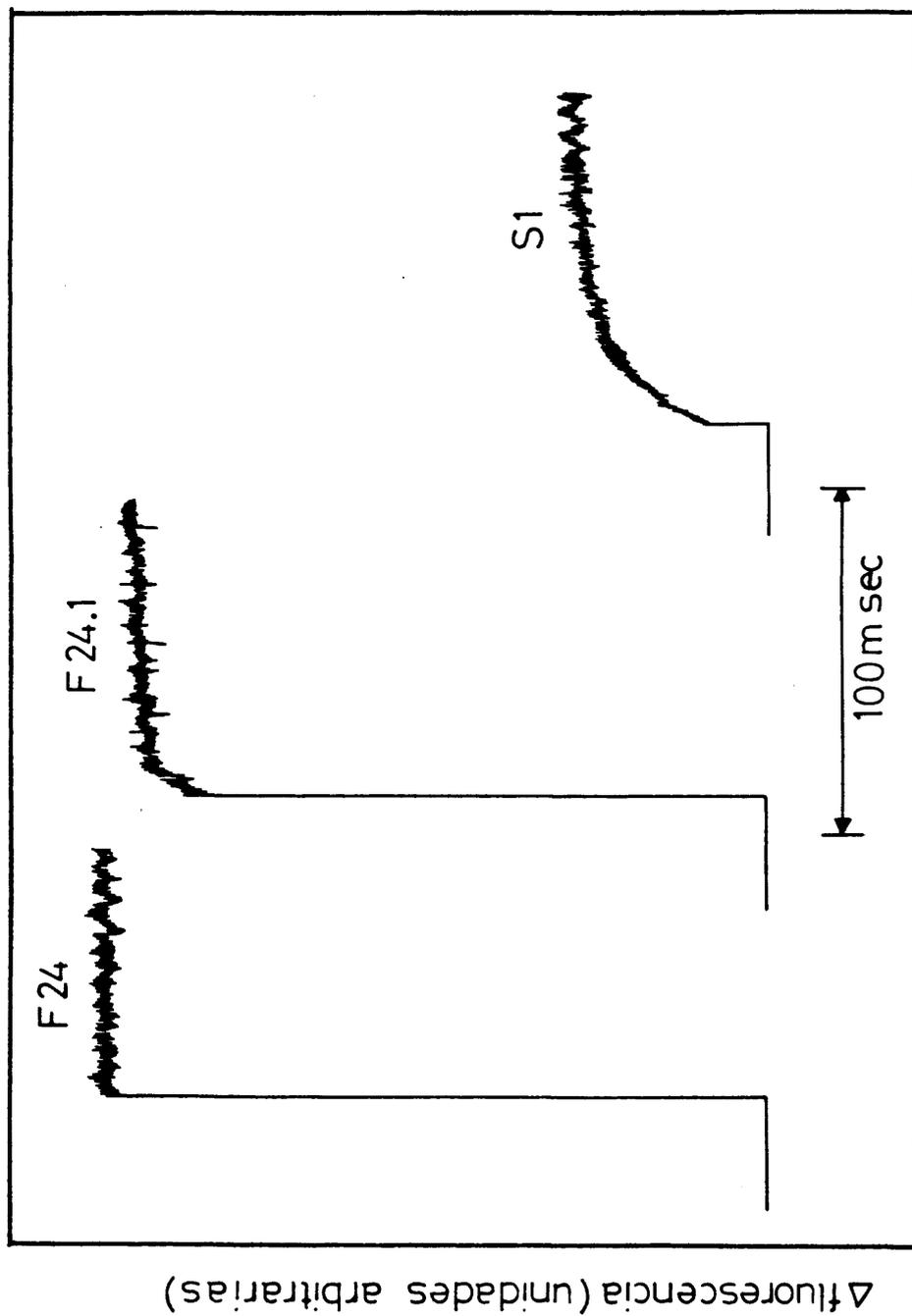


Fig. 27.- Cinética de emisión de fluorescencia inducida por luz en cromatóforos de los estirpes S1, F24 y F24.1.

disminuye el rendimiento máximo de la fluorescencia como confirmaron los resultados obtenidos con el mutante PM-8 de Rp. sphaeroides (Sistrom et al., 1966) y con sistemas reconstituidos mezclando complejos aislados de bacterio-clorofila de antena y centros de reacción purificados (Heathcote et al., 1977). Sin embargo, el efecto amortiguador del rendimiento de la fluorescencia por los centros varía dependiendo del estado redox químico de tales centros de reacción (Godik et al., 1977). Los centros en estado activo o abiertos tienen un efecto más marcado que cuando están en estado inactivo o cerrados, siendo la inversa del rendimiento de la fluorescencia una dependencia lineal de la concentración de centros de reacción activos (Clayton, 1966). Como consecuencia de estas características, en la cinética de inducción de fluorescencia bajo iluminación continua aparece un incremento con el tiempo de iluminación dependiendo del número de centros que se van oxidando y que por lo tanto no pueden procesar la energía canalizada por la antena. Por tanto, según apuntaron Vredenberg y Duysens (1963), el análisis detallado de las cinéticas de inducción de fluorescencia nos permite discernir sobre la presencia o no de centros de reacción en una suspensión de cromatóforos.

Los resultados obtenidos con las estirpes objeto de nuestro estudio no dejan ninguna duda sobre la ausencia total de centros de reacción en F24 y la presencia de una pequeñísima cantidad de los mismos en F24.1, como se desprende del alto rendimiento de fluorescencia y el análisis comparativo de la parte curva de las cinéticas. (Fig. 27).

3.4.6. ESPECTROS EPR INDUCIDOS POR LUZ EN CROMATOFOROS

Otra técnica que hemos utilizado para analizar el centro de reacción que opera en F24.1, es la de reso-

nancia paramagnética electrónica (EPR). Cuando se oxida la bacterioclorofila de centro de reacción, ya sea químicamente o por efecto de la luz, da una señal EPR de forma gaussiana con unas constantes características de $g = 2.0026$ y una anchura de pico a pico de la derivada primera de la curva $\Delta H \approx 9,5G$. (Bolton et al., 1969; McElroy et al., 1972). La constante $g = 2.0026$, muy próxima al valor del electrón libre, indica que el electrón paramagnético está muy deslocalizado sobre la molécula de bacterioclorofila, y la anchura $\Delta H \approx 9,5G$ indica que en la formación de dicha señal intervienen un par de moléculas según la fórmula

$$\Delta H_N = \frac{\Delta H \cdot \text{monómero}}{\sqrt{N}}$$

siendo N el número de moléculas que forman el complejo (Norris et al., 1971). Las señales encontradas en nuestros experimentos coinciden con las descritas para R. rubrum (Fig. 28). Sin embargo la señal de F24.1 resultó ser como un 8% respecto a la encontrada en la estirpe silvestre. Como era de esperar, cromatóforos de la cepa F24 no dieron ninguna señal EPR inducida por la luz.

3.4.7. ELECTROFORESIS DE CROMATOFOROS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida ha sido de mucha utilidad para estudiar las proteínas que forman parte de los cromatóforos. Quizás las proteínas mejor estudiadas sean las que integran la triada de los centros de reacción. Dichas proteínas pueden detectarse fácilmente en este tipo de electroforesis gracias a su situación característica y a su mayor proporción cuantitativa respecto a las otras proteínas, que pueden llegar a

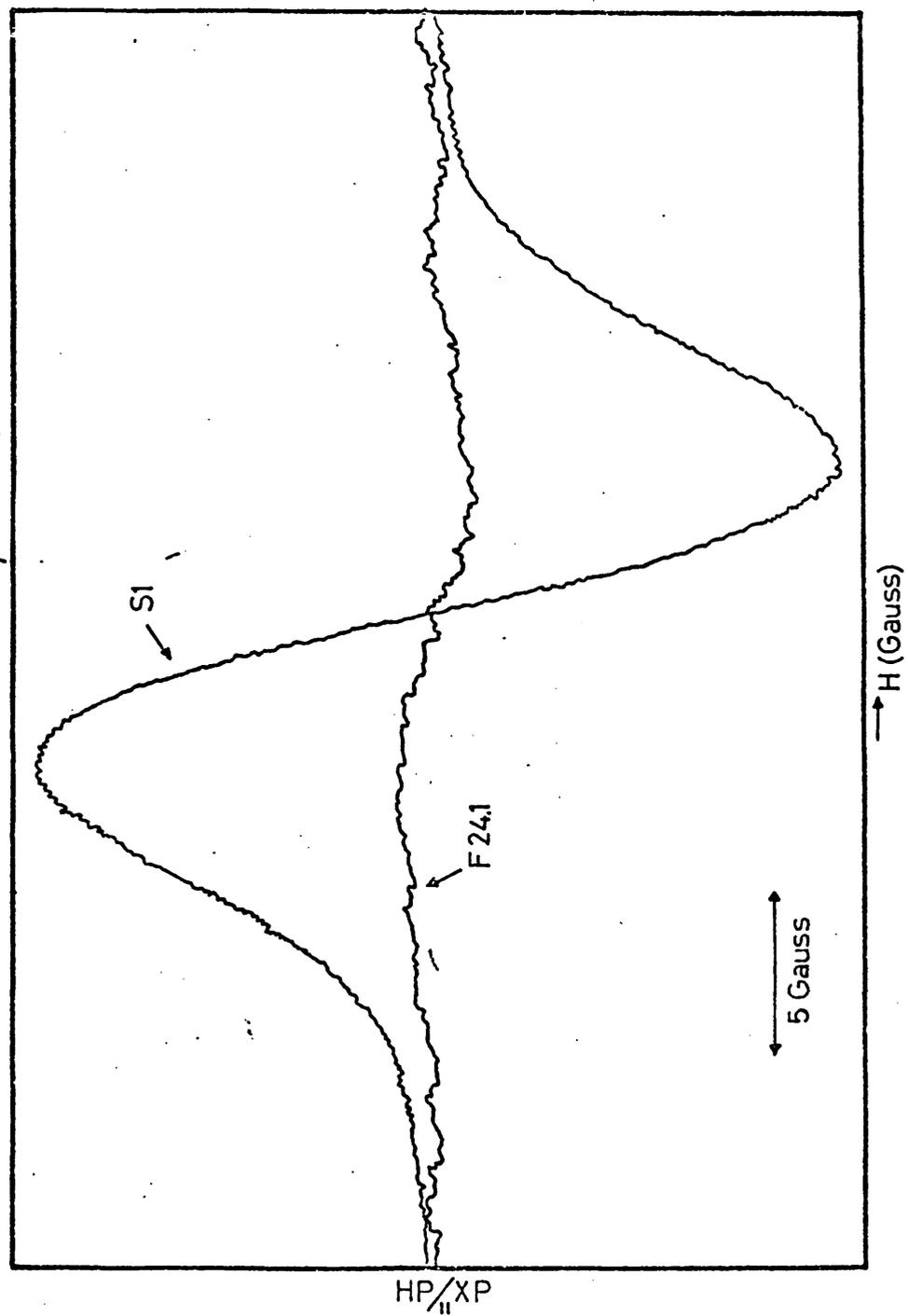


Fig. 28.- Señal EPR ($g= 2,0026$) inducida por luz en cromatóforos de las estirpes S1 y F24.1 fototróficas.

constituir hasta un 20% del total proteico (Clayton et al., 1972). La Fig. 29 muestra los patrones electroforéticos de cromatóforos de S1, F24 y F24.1. En la electroforesis de S1 se aprecian claramente las tres bandas adscritas a los centros de reacción, bandas a, b y c. En F24 aparece una banda clara en la zona que corresponde a la proteína a en el silvestre, mientras que las bandas b y c son prácticamente indetectables. En F24.1, sin embargo, existe un aumento de la proteína b, y posiblemente también de la c, respecto a F24, aunque las tres bandas adscritas al centro de reacción se encuentran muy disminuidas respecto a S1. Hasta el momento es inexplicable la mayor proporción de banda a en F24 respecto a F24.1, a no ser que las distintas condiciones de crecimiento influyan sobre los niveles de dicho polipéptido. La otra diferencia importante entre ambas estirpes está a nivel de la banda b, la reversión pa para el crecimiento fototrófico parece implicar un aumento claro de dicha banda. Posiblemente también ocurre lo mismo para la banda c, aunque ésta es más difícil de visualizar en este tipo de electroforesis.

No hay razón para pensar que las proteínas de centro de reacción de cromatóforos de F24 y F24.1 se hayan agregado a otras proteínas variando su distribución electroforética, ya que en dicho caso hipotético otras bandas mayoritarias tendrían que observarse en la región de mayores pesos moleculares, situación que no parece ser la realidad ya que el resto del patrón electroforético es idéntico al de la estirpe silvestre. Por tanto, podemos concluir que la triada de proteínas de centros de reacción es muy deficiente cuantitativamente en F24 y F24.1 respecto a S1.

3.4.8. PURIFICACION DE LOS CENTROS DE REACCION DE LAS CEPAS FOTOTROFAS S1 y F24.1

Una vez vistas algunas de las propiedades adscritas

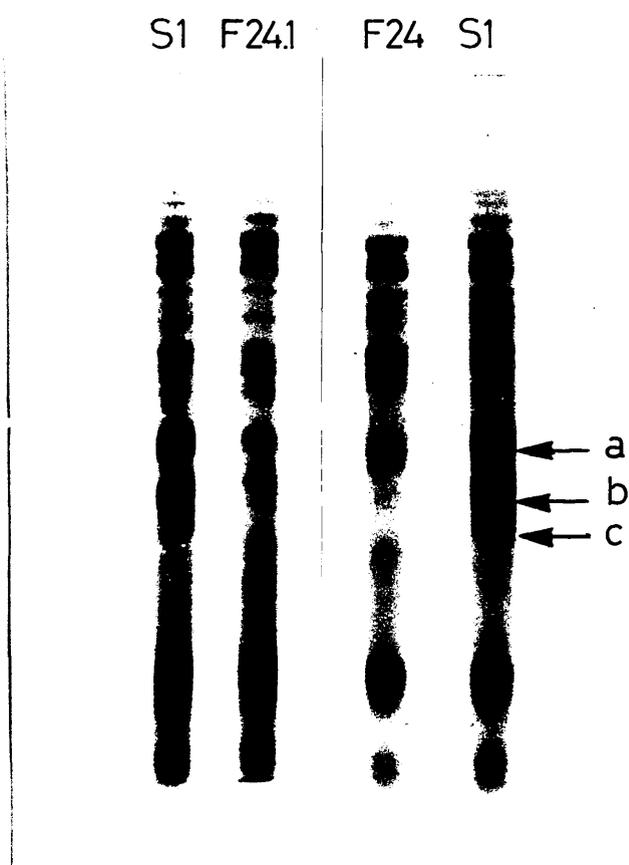


Fig. 29.- Electroforesis en SDS-poliacrilamida de cromatóforos de las estirpes S1 y F24.1 y no fototrófica F24.

a los centros de reacción en cromatóforos, el aislamiento de dichos centros fotoquímicos constituiría un paso más avanzado en su caracterización. El obtener los centros de reacción aislados del resto de los componentes de las membranas fotosintéticas nos permitiría hacer un análisis más directo sobre las mismas. En las preparaciones de centros de reacción purificados sería mucho más fácil analizar sus propiedades espectrales y electroforéticas características ya que se evitarían todos los inconvenientes de la escasa proporción de los mismos en cromatóforos de F24.1. Tales análisis apoyarían fuertemente la similitud o no de los centros de reacción que operan en ambas estirpes.

El problema presentaba más dificultades en F24.1 debido a su escasa proporción de centros de reacción. Dicha propiedad hizo necesario desarrollar técnicas distintas a las empleadas para la estirpe silvestre, ya que una pequeña contaminación de bacterioclorofila de antena supondría la imposibilidad de obtener resultados suficientemente claros. Además, tal intento implicaba cultivar mayor cantidad de células ya que había que partir de un volumen mayor de cromatóforos de la estirpe F24.1 (unos 500 ml de cromatóforos con $A_{880 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}} = 75$).

3.4.8.1. ESPECTRO DE LOS CENTROS DE REACCION PURIFICADOS

El espectro de absorción de centros de reacción de F24.1 en la región IR-cercano presenta las mismas características que los de S1, tanto en su forma reducida como oxidada (Fig. 30-31). En su forma reducida el espectro presenta tres bandas características alrededor de 865, 802 y 755 nm, las dos primeras atribuidas a bacterioclorofila y la otra a bacteriofeofitina. Cuando se oxidan dichos centros con luz u oxidantes químicos desapa

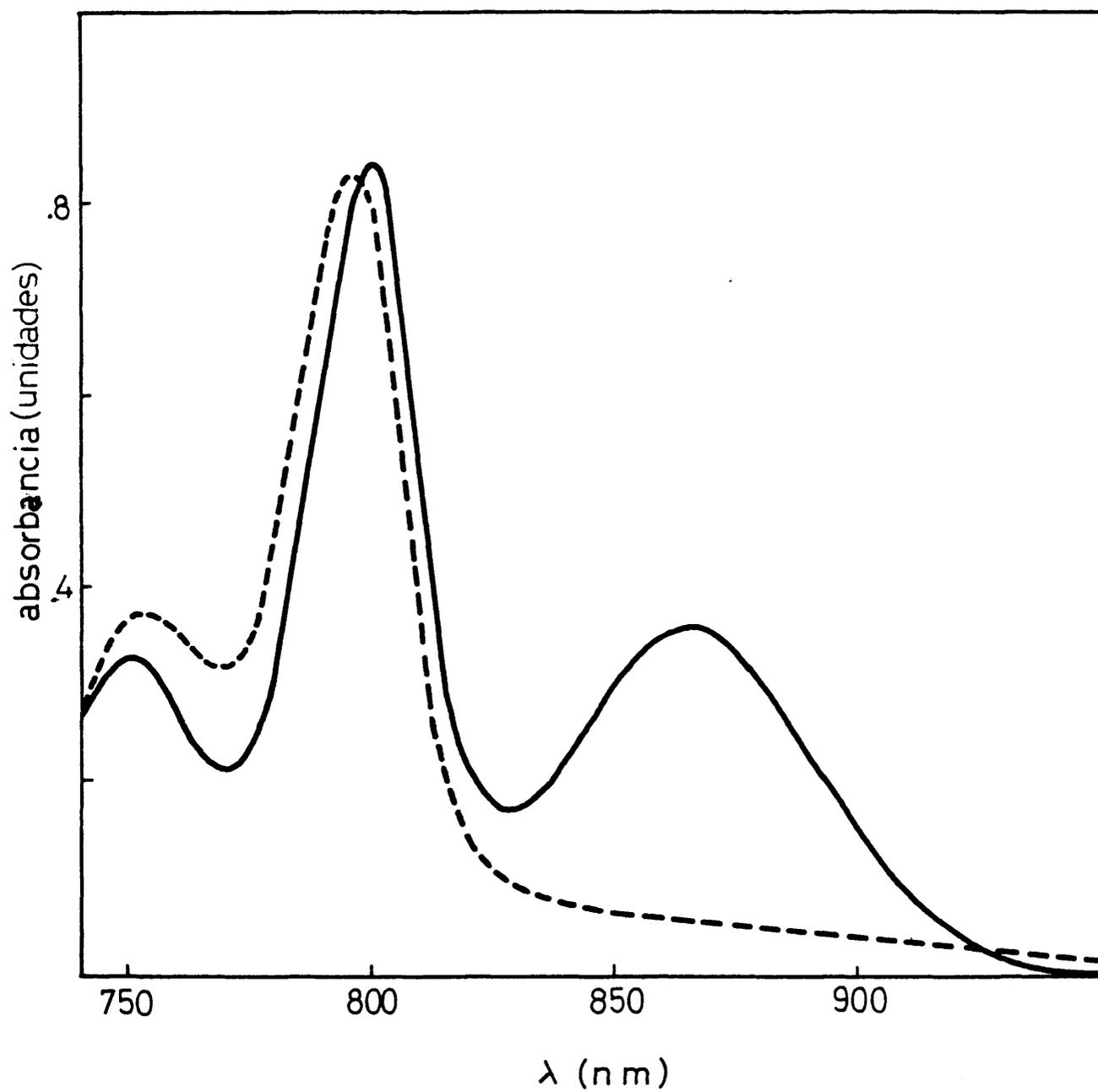


Fig. 30.- Espectro de absorción en el IR-cercano de centros de reacción purificados de la estirpe S1: (—) forma reducida; (---) forma oxidada.

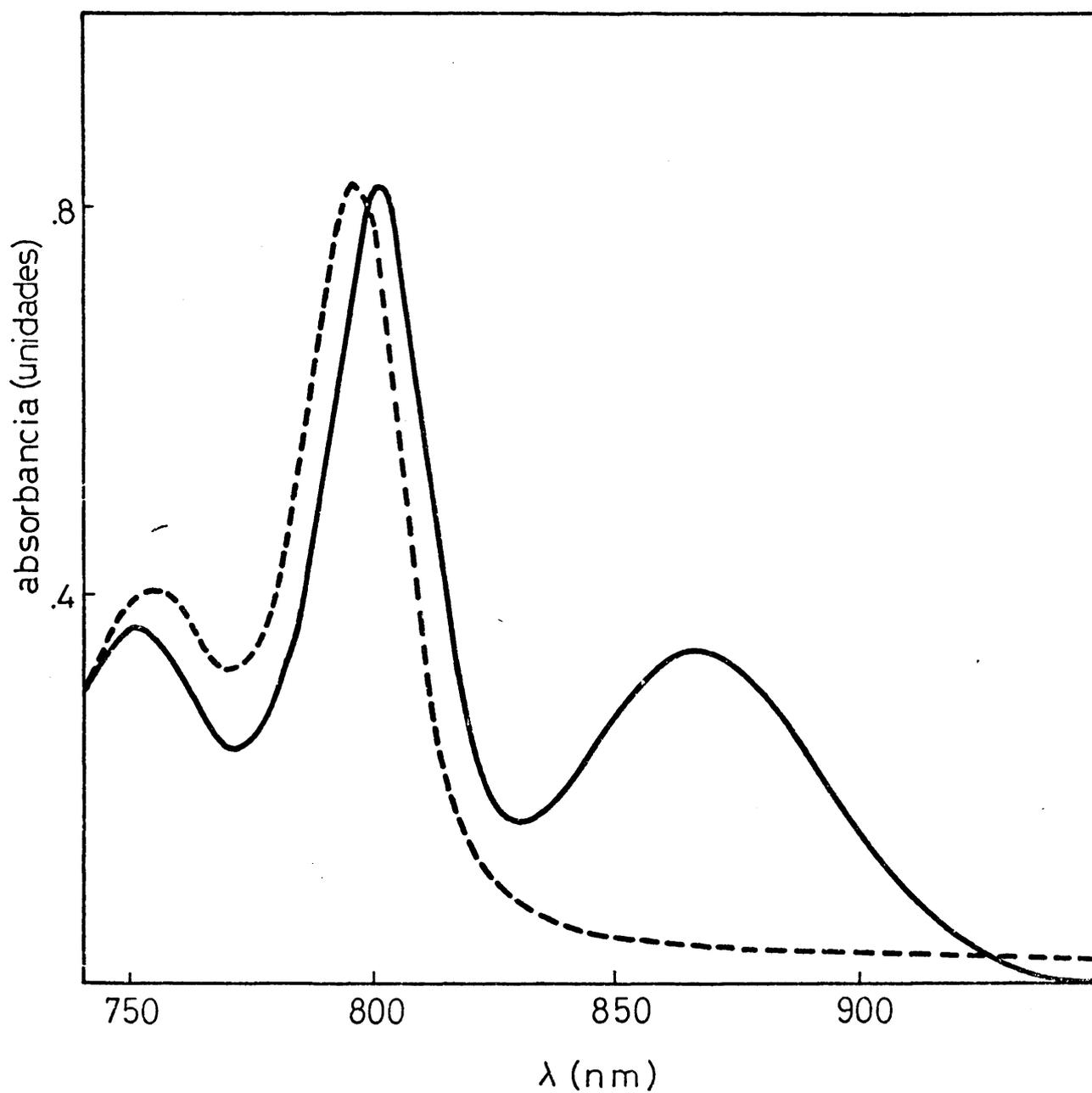


Fig. 31. Espectro de absorción en el IR-cercano de centros de reacción purificados de la estirpe F24.1: (—) forma reducida; (---) forma oxidada.

rece la banda de 865 nm (P870) y aparece un desplazamiento hacia el azul de la banda a 802 nm (P800) así como un ligero desplazamiento de la banda de bacteriofeofitina, dando como resultado el espectro diferencial oxidado-reducido que se muestra en la Fig. 32. Esto demuestra que los pigmentos constituyentes de los centros de reacción así como sus interacciones con el complejo no muestran diferencias detectables, al menos hasta el nivel alcanzado, en ambas estirpes fototróficas.

3.4.8.2. ELECTROFORESIS DE CENTROS DE REACCION

Fracciones muy purificadas de centros de reacción de las estirpes S1 y F24.1 se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida, Aparte de las pequeñas impurezas que se aprecian en los patrones electroforéticos de la Fig. 33 destacan tres bandas muy mayoritarias adscritas a los centros fotoquímicos de reacción. No se aprecian diferencias significativas respecto a la distribución de las tres bandas mayoritarias en S1 y F24.1, así como en la mezcla de ambas fracciones purificadas. Estos datos apoyan la similitud de las proteínas de los centros fotoquímicos de reacción de ambas estirpes.

3.5. CAMBIOS ELECTROCROMICOS INDUCIDOS POR LUZ

Uno de los parámetros clásicos empleados en el estudio de energización de membrana consiste en el análisis de los desplazamientos de las bandas de absorción adscritas a la bacterioclorofila de antena en el infrarrojo cercano y a los carotenos en la región visible del espectro. Sobre el desplazamiento sufrido por la bacterioclorofila de antena ya se habló someramente en el apartado 3.4.3.

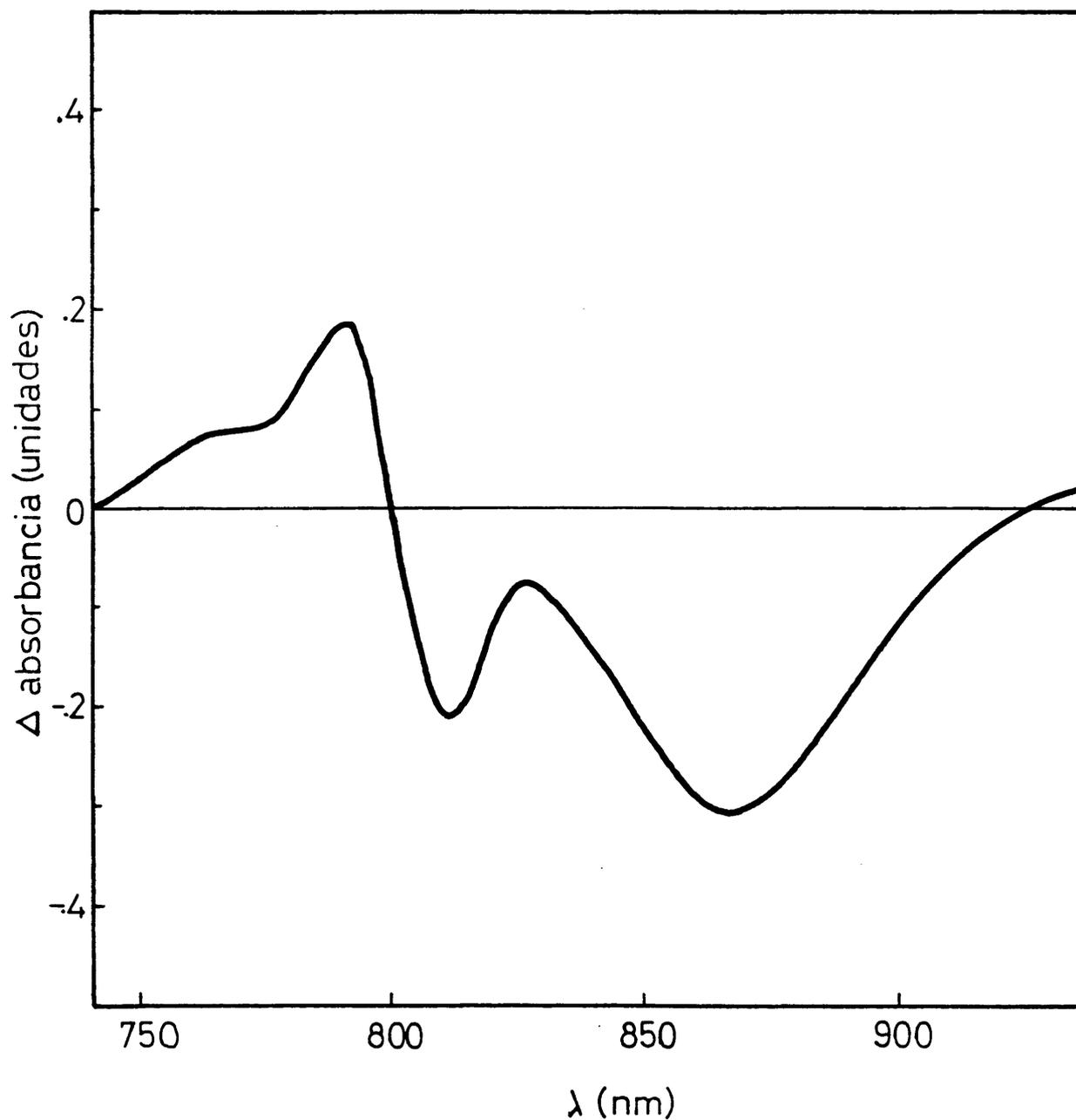


Fig. 32.- Espectro diferencial de absorción (oxidado-reducido) en el IR-cercano de centros de reacción purificados de la estirpe F24.1.

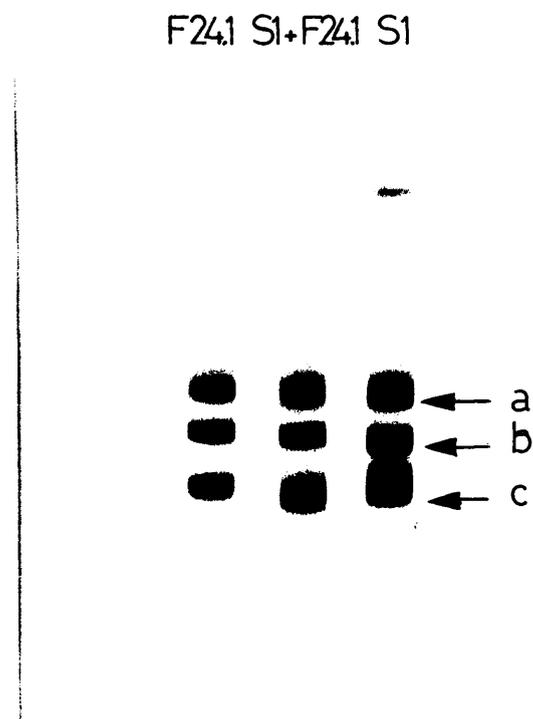


Fig. 33.- Electroforesis en SDS-poliacrilamida de centros de reacción purificados de S1 y F24.1 y una mezcla de ambos.

En esta sección nos limitaremos al análisis de los cambios electrocromicos sufridos por los carotenos en cromatóforos de las estirpes fototróficas S1 y F24.1 cuando son iluminados.

Los carotenos involucrados en los cambios electrocromicos no representan sino una pequeña proporción de todos los carotenos que existen en los cromatóforos (De Grooth et al., 1977). Experimentos en curso en varios laboratorios tratan de esclarecer el porcentaje exacto de carotenos que son afectados por la luz y si dichas moléculas son algo diferentes en su composición química, poco probable, en su orientación especial en la membrana o en su posible relación más directa con los centros de reacción. De cualquier forma, la magnitud del desplazamiento puede considerarse como un parámetro bastante fiable a la hora de cuantificar el potencial de membrana generado por la luz actínica en las membranas fotosintéticas como consecuencia de la separación de cargas en los centros de reacción y los procesos de óxido-reducción que tienen lugar sobre los transportadores de dichas membranas. Por tanto sería interesante determinar el potencial de membrana generado por la luz actínica en cromatóforos de las estirpes S1 y F24.1 medido como cambios electrocromicos de los carotenos, lo que nos daría una idea aproximada de sus posibilidades energéticas que podrían justificar en último término el crecimiento celular de F24.1 en condiciones fototróficas.

3.5.1. ESPECTRO DE LOS CAMBIOS FOTOQUIMICOS EN LA REGION DE LOS CAROTENOS EN S1 Y F24.1

La Fig. 34 muestra el espectro, entre 440 y 600 nm de los cambios inducidos por luz en cromatóforos de la cepa silvestre. En dicho espectro se observan unos cambios máximos alrededor de 600, 550 y 510nm. El cambio de 600 nm

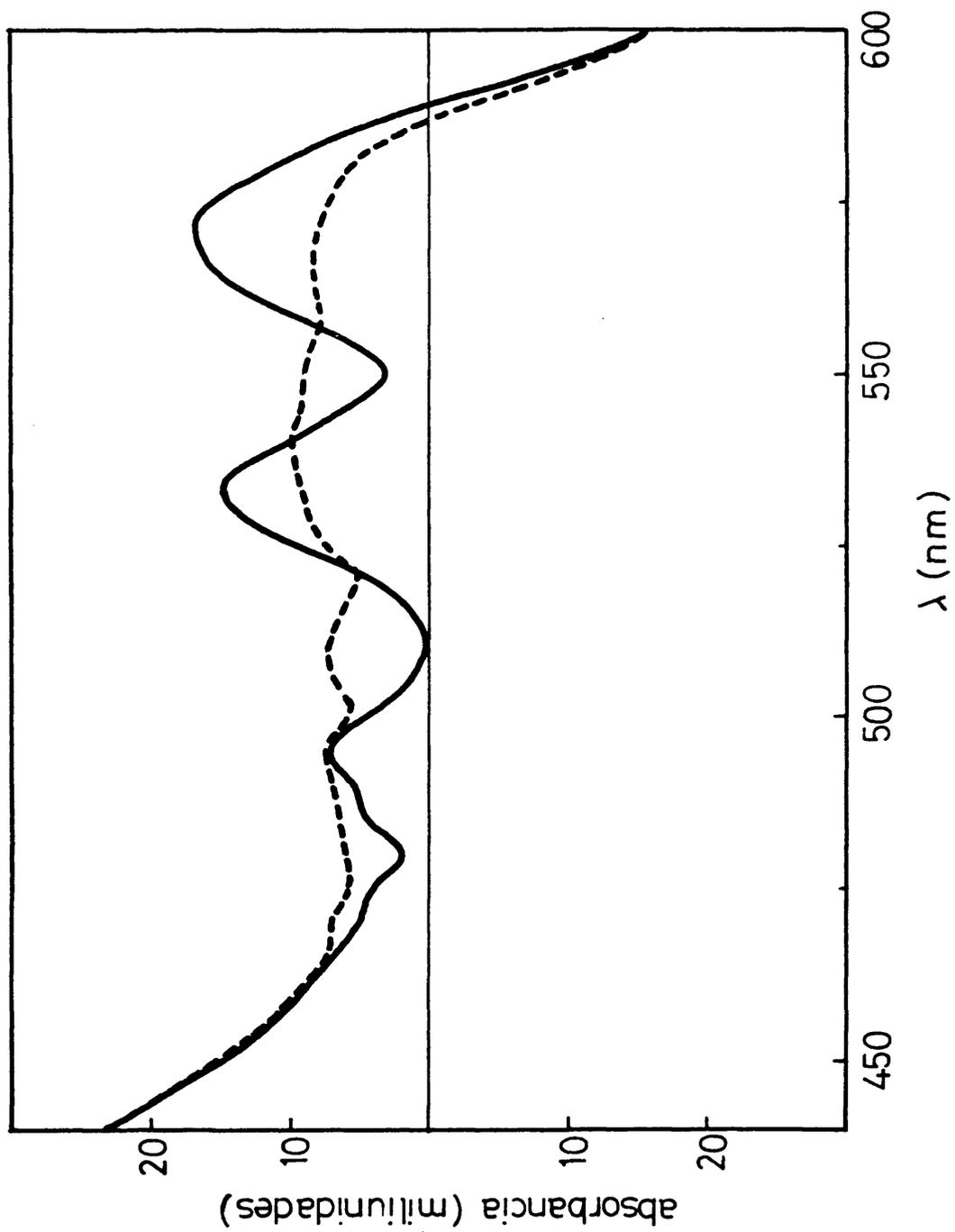


Fig. 34.- Espectro diferencial de absorción de luz-oscuridad (luz-oscuridad) entre 440-600 nm de cromat6foros de S1 en presencia (---) y ausencia (—) del desacoplante Gramicidina D (10 μ M).

se atribuye a la decoloración de la bacterioclorofila de centro de reacción mientras que el resto se atribuyen a desplazamientos de las bandas de los carotenos. Cuando se añade a la mezcla de reacción un desacoplante como la Gramicidina D, que disipa el potencial de membrana, los cambios electrocrómicos desaparecen obteniéndose un espectro completamente diferente al anterior (Fig. 34). El cambio a 600 nm no se altera, corroborando así que se trata de una decoloración y no de un desplazamiento de una banda de absorción. La diferencia entre ambos espectros, sin y con adición, muestra la parte de los cambios que son sensibles a desacoplantes (Fig. 35).

En la Fig. 36 se representa el espectro de los cambios que aparecen en cromatóforos de la estirpe fototrófica F24.1 al ser iluminados. Los cambios obtenidos a λ menores de 500 nm y mayores de 600 nm fueron muy pequeños en nuestras condiciones experimentales, por lo cual eran de dudosa fiabilidad de ahí que no se representen en la figura. Como se puede observar, existe mucho parecido en cuanto a la forma de este espectro y el diferencial de la Fig. 35. Cuando se añadió el desacoplante Gramicidina D todos los cambios desaparecieron coincidiendo perfectamente con la línea base. Por otra parte, el máximo a 575 nm en F24.1 representa como un 70% si lo comparamos con el mismo cambio sensible a Gramicidina D en la estirpe silvestre.

3.5.2. CAMBIOS FOTOQUIMICOS EN CROMATOFOROS DE G9

Aunque no es objeto directo de este trabajo, cabría preguntarse acerca del cambio positivo insensible a desacoplantes que aparece mezclado con el cambio típico de carotenos en S1. Para darnos alguna luz sobre el problema,

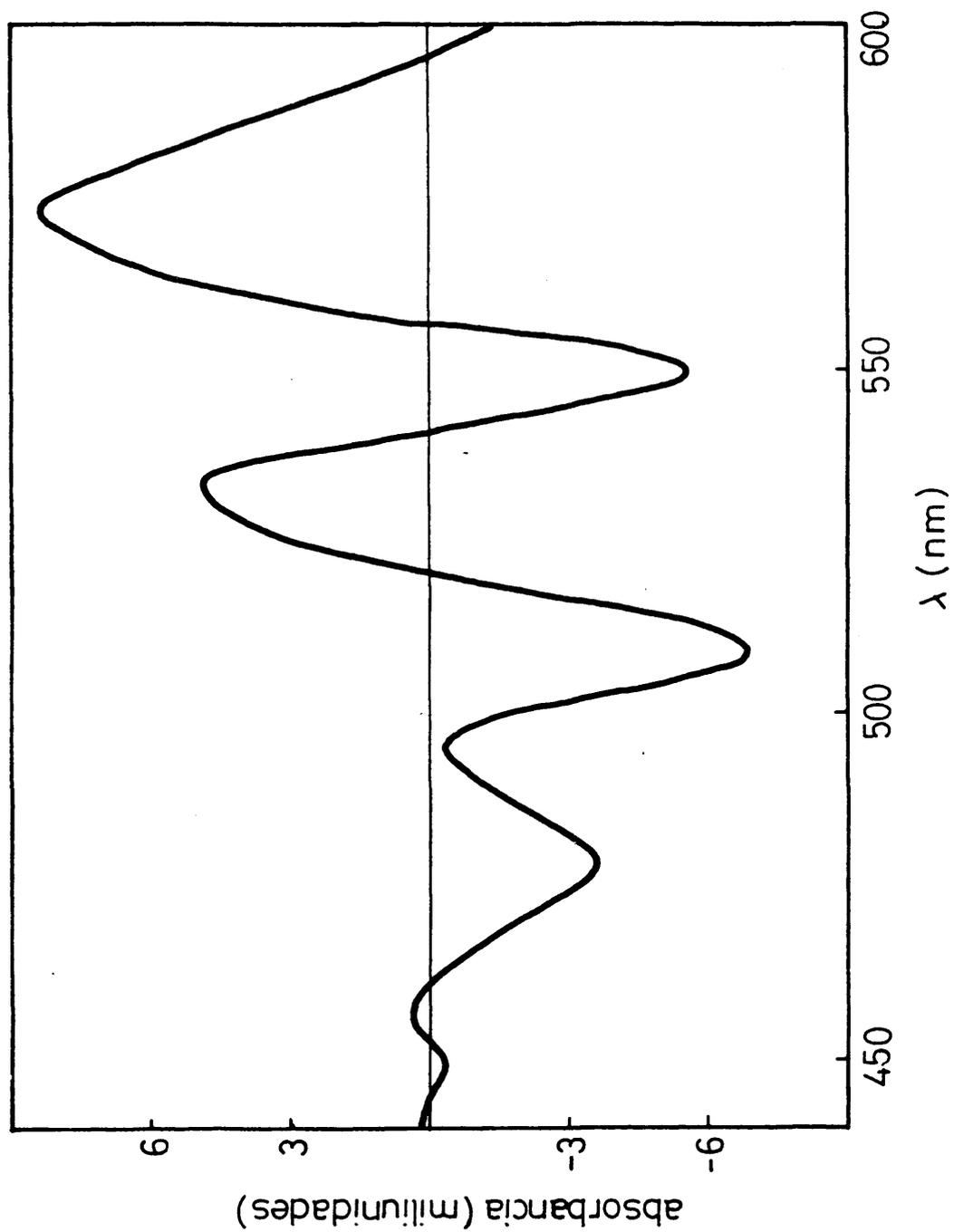


Fig. 35.- Diferencia entre los espectros de la Fig. 34 (—)-(---). Representa el espectro de los cambios sensibles al desacoplante.

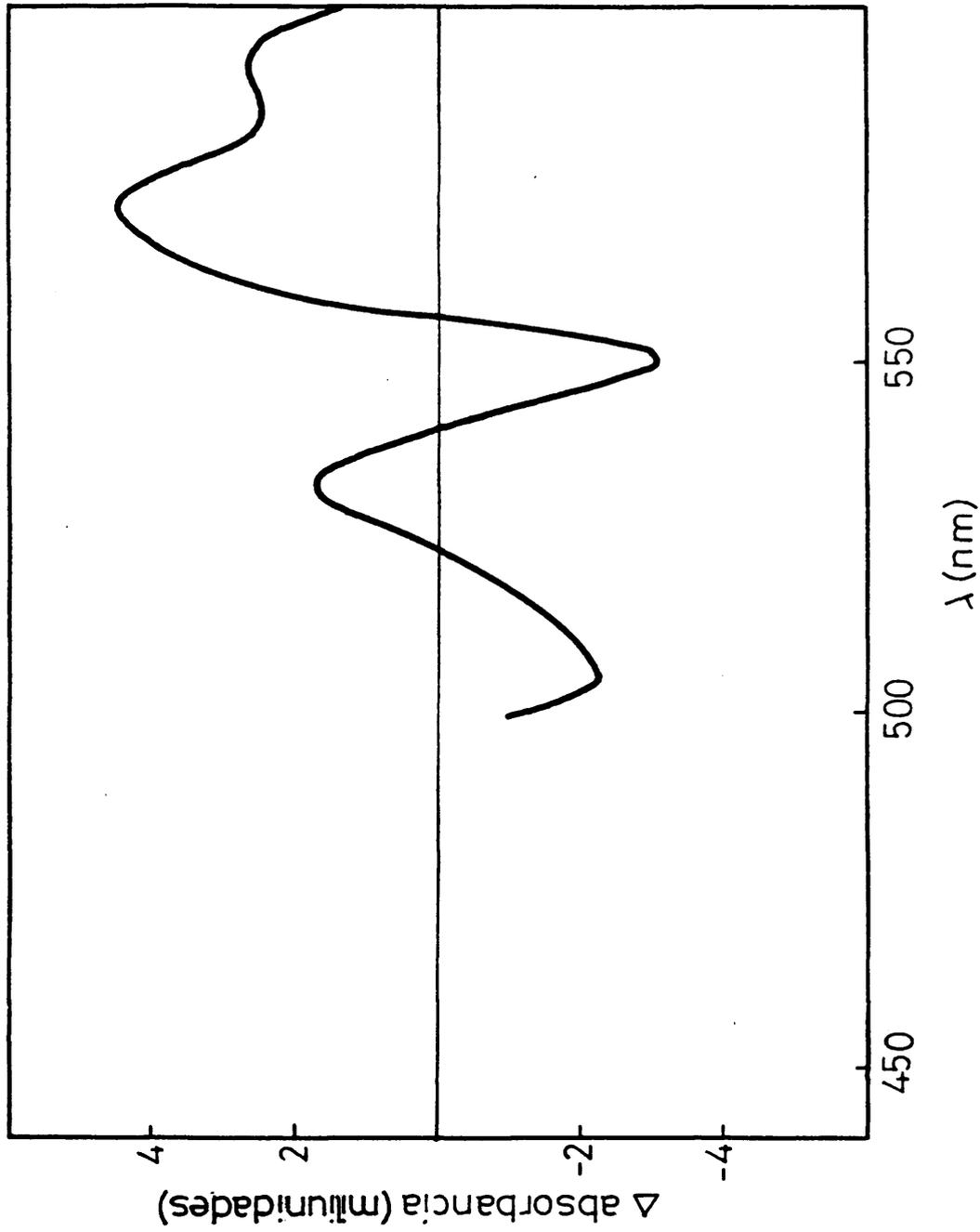


Fig. 36.- Espectro diferencial de absorción (luz-oscuridad) entre 500-600 nm de cromatóforos de F24.1

se analizó el espectro de los cambios inducidos por luz en cromatóforos de la cepa mutante de R. rubrum G9, que carece de carotenos (Fig. 37). Sorprendentemente este espectro coincidió perfectamente con el obtenido con la cepa S1 en presencia de Gramicidina D, lo que puede insinuar que junto al cambio típico de carotenos existe otro cambio superpuesto que no ha sido caracterizado convenientemente en R. rubrum. En otro sentido el espectro del mutante G9 coincidió perfectamente con el obtenido en esta región del espectro con centros de reacción purificados (no mostrado aquí), lo cual permite pensar que posiblemente dicho cambio superpuesto en la estirpe silvestre sea debido a la bacterioclorofila de los centros de reacción presentes en los cromatóforos. Un estudio más detallado, en los que se incluirían experimentos de cinética rápida, serían necesarios para llegar a conclusiones más completas.

De los resultados presentados aquí se pueden sacar varias conclusiones importantes:

- a) los carotenos no parecen estar modificados en F24.1 respecto a S1, tanto en su composición química como en su distribución en la membrana.
- b) Los cromatóforos de F24.1 son capaces de crear un potencial de membrana sensible a desacoplantes, próximo al de la estirpe silvestre, que podría justificar el crecimiento fototrófico de dicho revertiente.
- c) Los cromatóforos de F24.1 no presentan en esta región cambios insensibles a desacoplantes, dato que está de acuerdo con nuestra hipótesis de que dichos cambios insensibles pueden ser debidos a decoloración de la bacterioclorofila de centros de reacción.

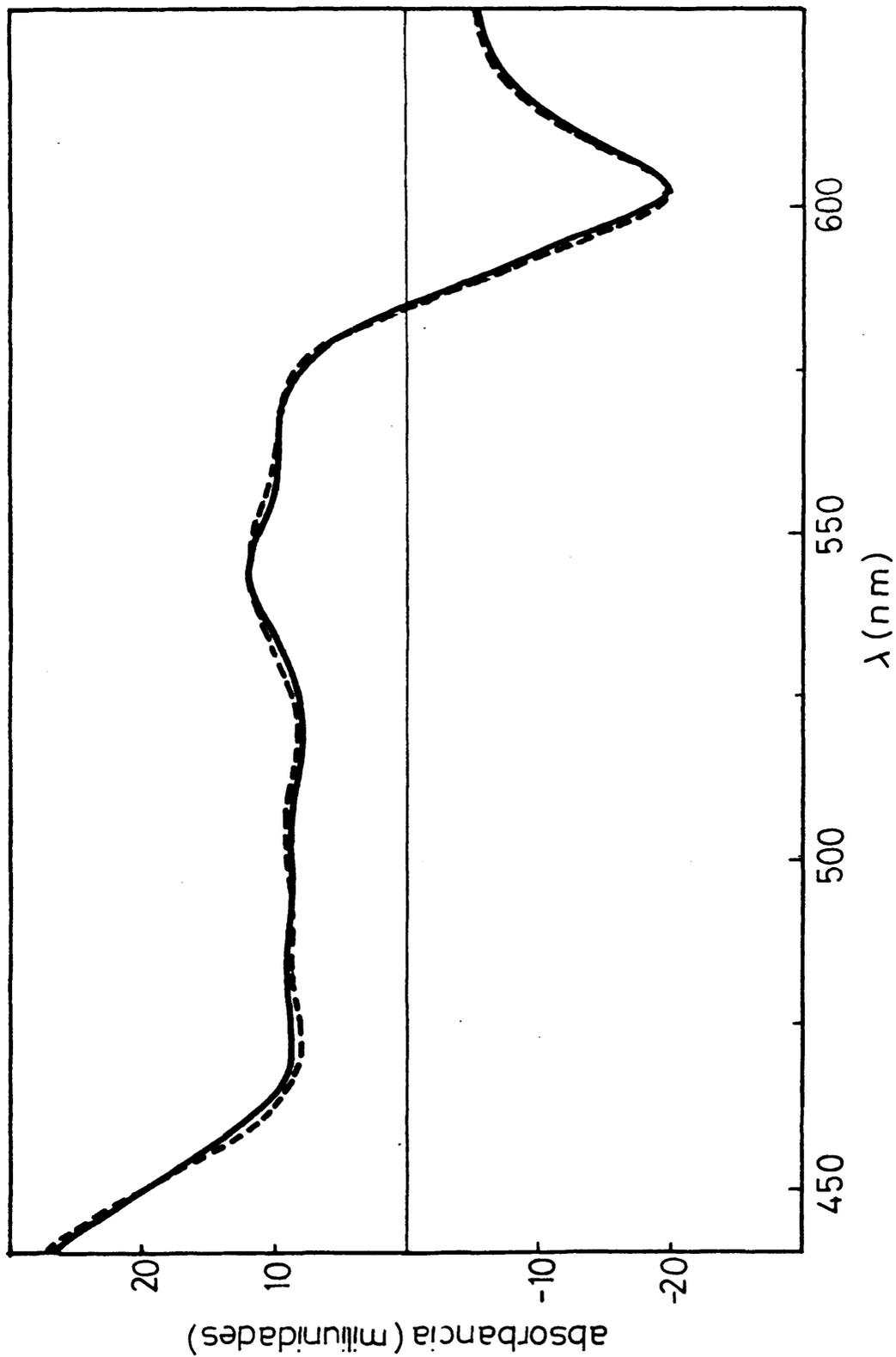


Fig. 37.- Espectro diferencial de absorción (luz-oscuridad) entre 440-600 nm de cromatóforos de G9 en presencia (---) y ausencia (—) del desacoplante Gramicidina D (10 μ M).

3.5.3. EFECTO DE DIVERSAS CONCENTRACIONES DE DESACOPLANTES SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA

Una vez demostrado que los cromatóforos de F24.1 pueden generar un potencial de membrana cuantitativamente no muy diferente a los de S1, sería interesante hacer un estudio comparativo en ambas estirpes fototróficas, sobre la sensibilidad de dicho potencial a diversas concentraciones de desacoplantes. Los desacoplantes permiten el paso libre de iones a través de la membrana, con lo cual desaparece el gradiente electroquímico que existe entre ambos lados de la membrana lo que provoca que el potencial de membrana se disipe. Si las membranas de los cromatóforos de S1 y F24.1 fuesen estructuralmente distintas, presentarían diversa resistencia al efecto de los desacoplantes que se manifestaría como una sensibilidad distinta de los cambios electrocrómicos a concentraciones variables de desacoplantes. Por otra parte, es lógico pensar que si el flujo de electrones a través de la membrana es proporcional a la cantidad de centros de reacción presentes, cabría esperar que en F24.1 concentraciones mínimas de desacoplante tendrían un efecto drástico sobre las manifestaciones del potencial de membrana, por lo tanto en F24.1 desaparecerían los cambios electrocrómicos a concentraciones mucho menores que en S1.

La Tabla V muestra los resultados obtenidos con distintas concentraciones de tres tipos distintos de desacoplantes. Al aumentar la concentración de los mismos, el cambio electrocrómico de los carotenos se fue haciendo menor en ambas cepas, aunque no significativamente diferente en alguna de ellas. Esto demuestra que las membranas fotosintéticas de F24.1 no están marcadamente modificadas, y que el flujo de electrones a través de las mismas no es significativamente menor respecto a S1, en nuestras condiciones experimentales.

TABLA V

EFFECTO DE DIVERSOS DESACOPLANTES SOBRE LOS CAMBIOS

ELECTROCROMICOS DE LAS ESTIRPES S1 Y F 24.1

<u>S1</u>	<u>F24.1</u>	% INHIBICION	
<u>DESACOPLANTE</u>	<u>DESACOPLANTE</u>	<u>DESACOPLANTE</u>	<u>% INHIBICION</u>
<u>CCCCP (μM)</u>	<u>CCCCP (μM)</u>		
0.00	0.00	0	0
0.25	0.125	24	41
0.50	0.25	36	59
1.00	1.00	53	69
<u>TCS (μM)</u>	<u>TCS (μM)</u>		
0.00	0.00	0	0
0.125	0.125	25	42
0.25	0.5	44	66
0.50		62	
1.00		73	

3.6. PROCESOS DE OXIDO-REDUCCION INDUCIDOS POR LUZ EN CELULAS ENTERAS: CARACTERIZACION POR ESPECTROSCOPIA DE DESTELLOS

La mayor parte de los datos que se conocen actualmente sobre fotosíntesis bacteriana se han obtenido en cromatóforos y en centros de reacción purificados. Sin embargo lo que se observa en cromatóforos no tiene por qué ser exactamente lo que de hecho ocurre en células enteras, ya que la rotura de las células y el proceso posterior pueden variar de alguna manera la distribución u orientación de algunos componentes intrínsecos de la membrana, algunos componentes de membrana o relacionados con ella pueden perderse durante la extracción de los cromatóforos, las vías de interconexión entre los diversos componentes membranosos pueden modificarse sustancialmente, etc. Un caso muy destacado en este sentido es el que ocurre con los citocromos involucrados en los procesos fotosintéticos de R. rubrum. Así, cuando se preparan cromatóforos la mayor parte de dichos citocromos se pierden en el sobrenadante desechable (van Grondelle et al., 1976) de ahí que resulta imposible hacer un estudio, al menos cuantitativo, de los cambios fotoquímicos de dichos compuestos en cromatóforos. El trabajar con cromatóforos tiene sin embargo muchas ventajas: se parte de un sistema más simple, se eliminan problemas de dispersión de luz, se pueden acoplar fácilmente sistemas artificiales como donadores y aceptores de electrones, los resultados suelen ser más fáciles de interpretar, etc. Todo ello hace que haya muy pocos ejemplos en la literatura de trabajos con células enteras.

La técnica de espectroscopía de destello ha sido de gran utilidad en el estudio de la fotosíntesis. La técnica consiste en dar un pulso de luz actínica y registrar las cinéticas que aparecen a continuación. Para registrar

dichas cinéticas se necesitan aparatos de respuesta muy rápida ya que la mayor parte de las reacciones que operan en fotosíntesis bacteriana tiene una vida media de μ s y ms. Las reacciones que constituyen un sistema cíclico funcionan todas a la misma velocidad bajo iluminación continua, ya que todas se encuentran en un equilibrio dinámico. Medir estas reacciones en el equilibrio no nos da ninguna información acerca de la secuencia de dichas reacciones. Mediante pulsos cortos que provoquen un único reciclaje de las reacciones, se puede desplazar el equilibrio que existe en la oscuridad hacia un lado u otro del equilibrio. La velocidad de aparición de este desplazamiento puede ser medida registrando la cinética en una escala de tiempo apropiada. De esta forma, podemos ver a que velocidad aparece un compuesto oxidado o reducido pudiendo acoplar reacciones con cinéticas similares y contruir una secuencia de las reacciones que constituyen el sistema cíclico.

A la vista de los resultados de las secciones anteriores en donde no se han encontrado diferencias cualitativas en las actividades adscritas a los centros de reacción, ni cuantitativas en el potencial de membrana sensible a desacoplantes, se hacía imprescindible una buena caracterización de los procesos de transducción de energía que tienen lugar en las estirpes de S1 y F24.1 fototróficas. Hemos elegido las células enteras como material de trabajo por las razones expuestas anteriormente. Con ello se pretende saber si las reacciones redox que tienen lugar en las membranas fotosintéticas ocurren con mayor rapidez en F24.1 que en S1, o si en aquella operan reacciones que están incrementadas respecto a las del silvestre, especialmente un posible segundo centro de reacción acoplado al citocromo C-428, que algunos autores han descrito muy provisionalmente para la estirpe silvestre S1 (van Grondelle

et al., 1976; Govindjee et al., 1970; Sybesma et al., 1969).

3.6.1. CINÉTICA DE RECUPERACION DEL CENTRO DE REACCION

La oxidación del P870 ocurre en el orden de algunos ps (Rockley et al., 1975; Kaufmann et al., 1975) y por tanto su cinética es imposible de determinar con nuestro instrumental. Nuestro interés se centra en la cinética de recuperación una vez que el centro de reacción ha sido oxidado por el efecto de la luz de un destello corto. Esta cinética consta de varias fases en S1 (Fig. 38): una fase más rápida que tiene lugar en el orden de 300 μ s, otra más lenta de 10 ms de vida media ($t_{1/2}$) y una muy lenta y cuantitativamente minoritaria.

Cuando se hace el mismo experimento con células enteras de F24.1 se observan dos fases muy diferenciadas (Fig. 39): una lenta y cuantitativamente pequeña, que se correspondería con la encontrada de las mismas características en S1, y otra rápida que constituye la mayor parte del cambio, con un $t_{1/2}$ del orden de 200 μ s. Dicha cinética no presentó cambio alguno, cuando se varió el número de destellos, al menos durante los cuatro primeros (Fig. 40).

Los resultados expuestos en este apartado apuntan hacia la idea de que en F24.1 los centros de reacción pueden funcionar a mayor velocidad que en S1. Mientras el P870 de S1 tarda en recuperarse totalmente unos 20 ms, todo el P870 de F24.1 está recuperado y dispuesto a funcionar de nuevo en el orden de 400 μ s. Ello supondría un mayor reciclaje de óxido-reducción del P870 de la estirpe revertiente sin estar modificados los centros de reacción. Por tanto, podemos sugerir que en S1 existe un paso limitante

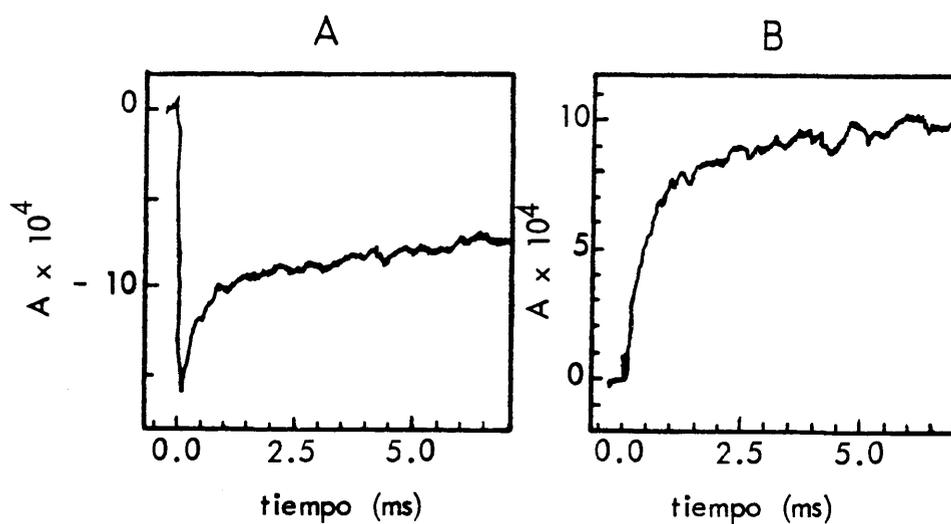


Fig. 38.- Cinéticas de reducción del centro de reacción (A) y de oxidación del citocromo C-420 (B) en células enteras de la estirpe silvestre S1 (según van Grondelle et al., 1976). Todas las cinéticas que se muestran a continuación corresponden a la estirpe fototrófica F24.1.

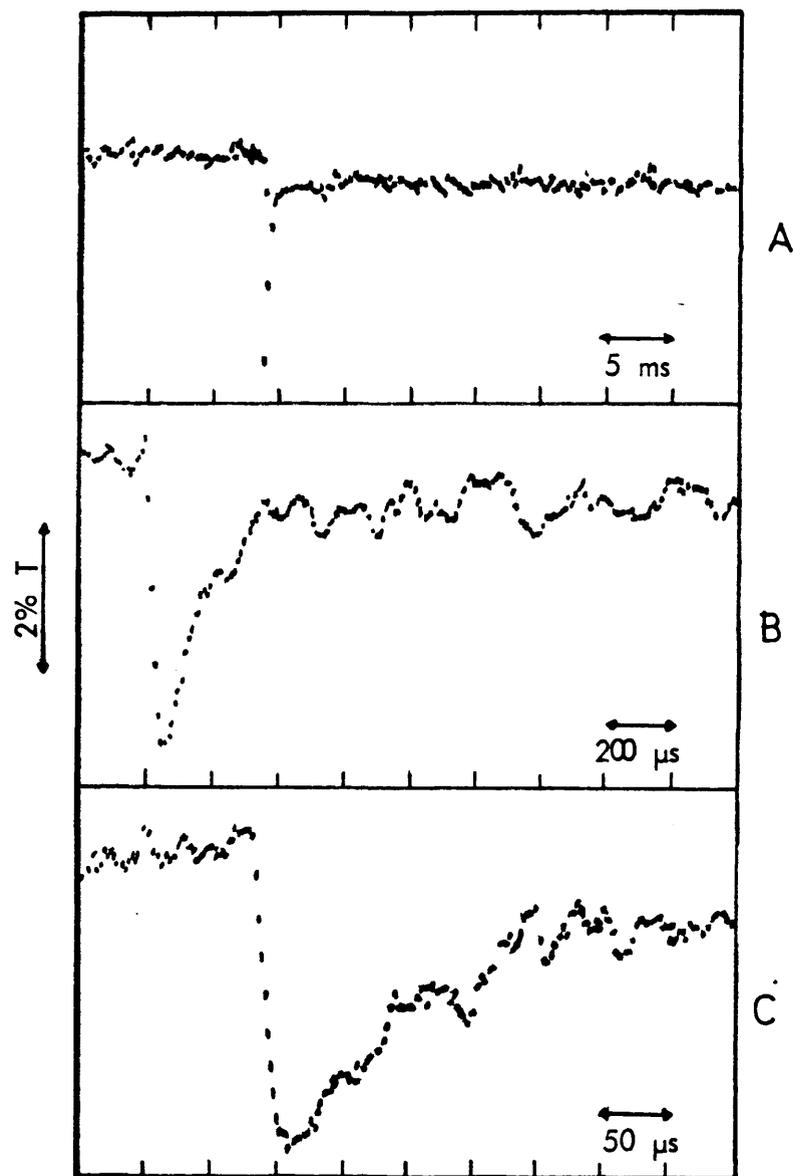


Fig. 39.- Cinética de reducción del centro de reacción registrada a 795 nm con distintas escalas de tiempo. Todos los ΔT en células enteras de F24.1 están aumentados 8x excepto en los sitios en donde se indica.

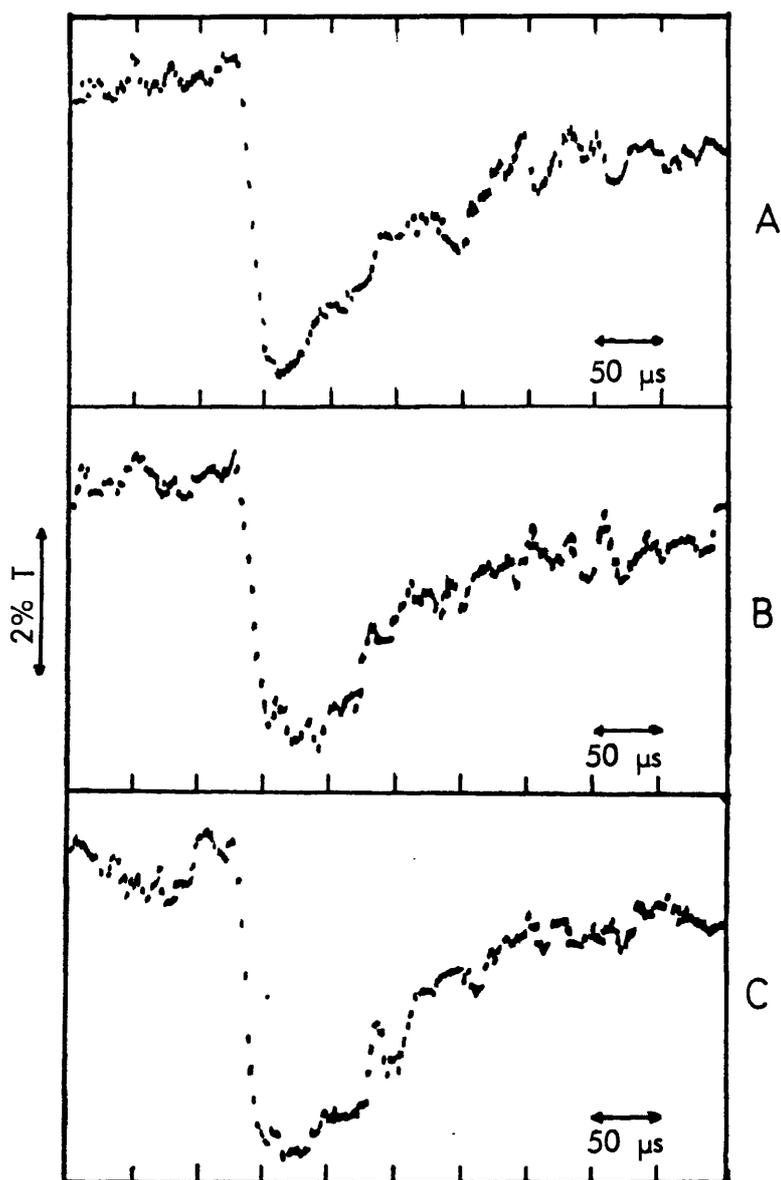


Fig. 40.- Cinética de recuperación del centro de reacción registrado a 795 nm después de un número variable de pulsos consecutivos: A (después de 1 pulso); B (2 pulsos); C (4 pulsos).

de la fotosíntesis a nivel de los donadores de electrones para el centro de reacción.

3.6.2. CINÉTICAS DE OXIDO-REDUCCION ADSCRITAS AL CITOCROMO C-420

3.6.2.1. CINÉTICA DE OXIDACION

Se admite actualmente que la función del cit C-420 en R. rubrum es la de servir de donador directo de electrones al P870. Muchos trabajos apoyan esta teoría basados fundamentalmente en estudios comparativos de la cinética de oxidación de dicho citocromo y la de reducción del P870 subsiguientes a un destello (Parson, 1967; Ke et al., 1967; Dutton et al., 1972), la modificación de la cinética de recuperación de P870 purificado cuando se añade a la mezcla de reacción citocromo c reducido (van der Rest et al., 1974) y medidas del rendimiento cuántico de la fotooxidación del citocromo c_2 (Loach et al., 1968).

Nuestros resultados están perfectamente de acuerdo con esta teoría. Cuando excitamos con un destello saturante y registramos a 420 nm (Fig. 41) se obtiene una cinética de oxidación con un $t_{1/2}$ de 200 μ s, que coincide perfectamente con el $t_{1/2}$ de recuperación del P870. En la misma Fig. 41 se representa la misma cinética a distintos tiempos de registro, en todos los casos se observa un tiempo medio de oxidación acoplado a la reducción del P870.

Denominamos cit C-420 al compuesto que cambia de absorción a 420 nm, cuyas características coinciden con las del cit C_2 purificado; de ahí que utilicemos ambas nomenclaturas para referirnos al mismo compuesto.

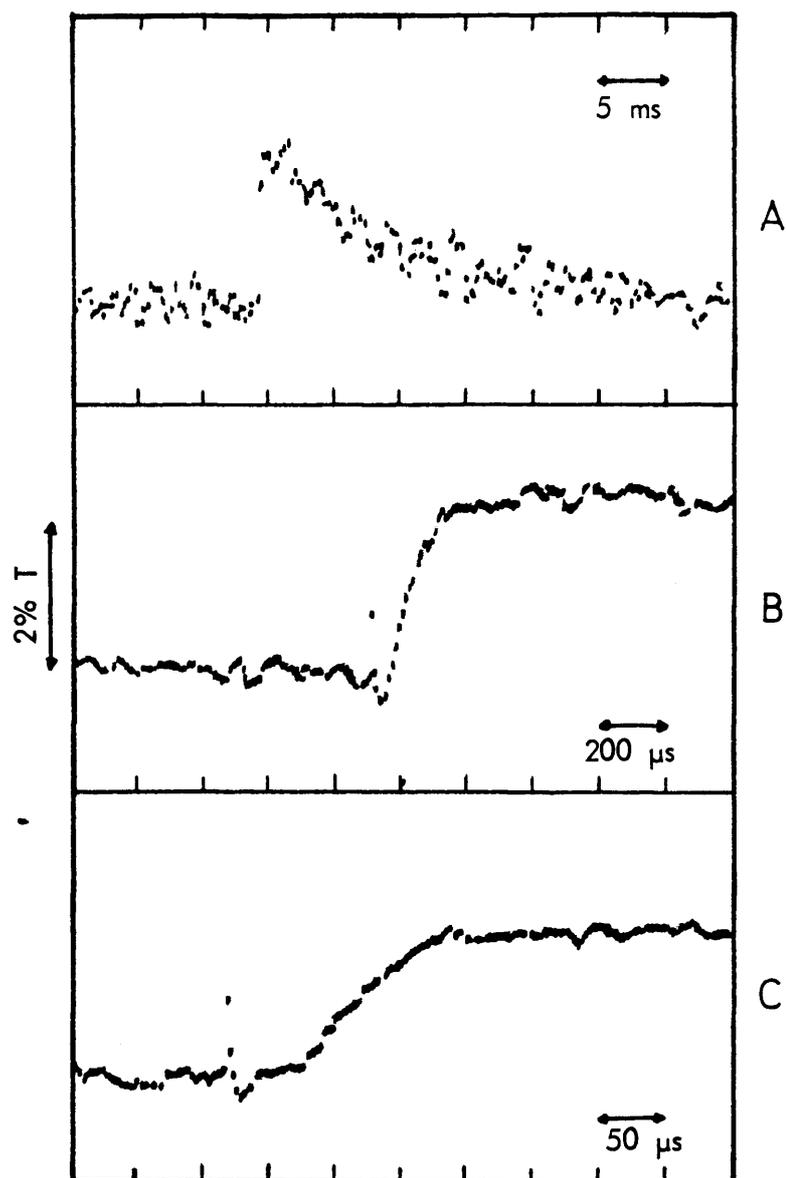


Fig. 41.- Cinética de óxido-reducción registrado a 420 nm con distintas escalas de tiempo.

3.6.2.2. CINETICA DE REDUCCION

La reducción subsiguiente a la oxidación del C-420 por un destello corto, mostró una cinética de primer orden con un $t_{1/2}$ de 4 ms (Fig. 42A). van Grondelle et al., 1976, demostraron que la cinética de recuperación del C-420 en células enteras de R. rubrum S1 consta de dos fases, con $t_{1/2}$ de 7 ms y 15 ms respectivamente. La explicación dada por dichos autores consistía en suponer que la fase más rápida se debía a la reducción del cit C-420 por el cit b560 que se halla en menor proporción en la célula, basándose en la similitud entre la cinética de oxidación de dicho cit b y la fase rápida de la cinética de reducción del cit C-420; la fase más lenta de recuperación del C-420 se debería a la reducción del citocromo restante por reductores no cíclicos conectados con dicho citocromo. El caso de F24.1 parece ser muy diferente ya que todo el C-420 oxidado por un destello único puede ser reducido por el cit b apareciendo una cinética monofásica. Si suponemos que F24.1 posee sólo un 5-10% de P870 respecto a S1, en un destello corto sólo puede aparecer esa pequeña cantidad de centro de reacción oxidado, asimismo idéntica cantidad de C-420 oxidado conectado a tales centros de reacción y por tanto las células de F24.1 poseen suficiente cit b reducido para recuperar todo el C-420 oxidado sin necesidad de actuar los reductores laterales. En apoyo de esta suposición tenemos el resultado de la Fig. 42B, en la cual podemos observar que en un segundo destello no se modifica, tanto cuantitativa como cualitativamente, la cinética de recuperación a 420 nm.

3.6.3. CINETICA DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LUZ A 428 nm

Pocas conclusiones claras se tienen actualmente acerca de los cambios fotoquímicos que ocurren en esta zo

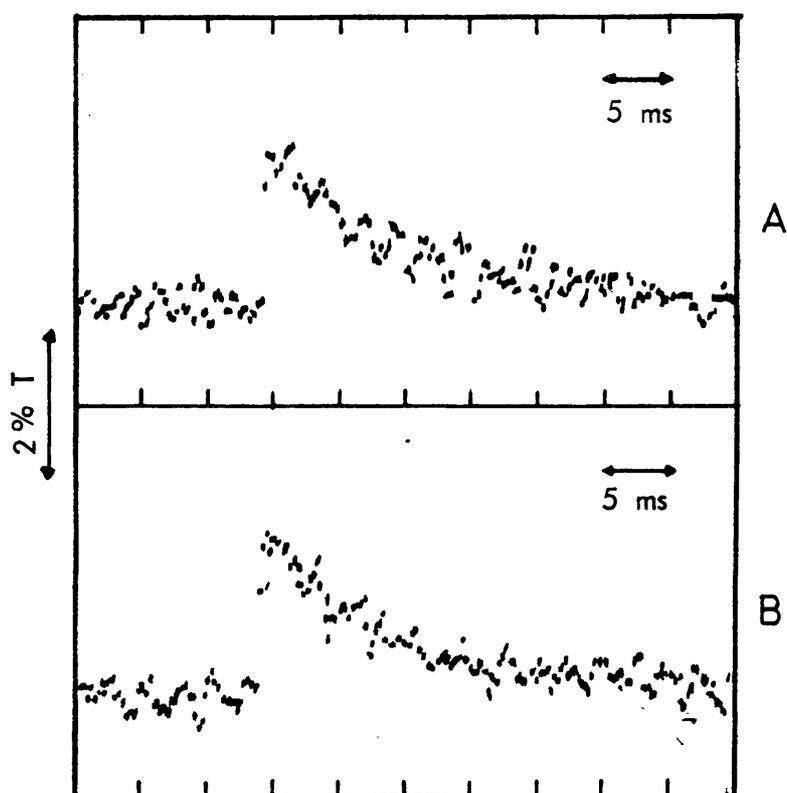


Fig. 42.- Cinéticas de óxido-reducción del cit C-420 subsiguientes a un primer (A) y segundo (B) pulso separado 100 ms.

na del espectro. Esta región se presenta particularmente difícil ya que en ella absorben varios compuestos que se afectan por la luz, a saber, un componente del centro de reacción (probablemente bacterioclorofila) o muy próximo a él, un citocromo de tipo b (cit b560), un citocromo de tipo c (cit C-428) y posiblemente algún otro compuesto no identificado hasta la fecha. En el desarrollo de nuestro trabajo los cambios a dicha longitud de onda se presentaban particularmente interesantes ya que varios autores anteriormente citados han descrito la oxidación del C-428 acoplada a la reducción de un posible segundo centro de reacción minoritario en la estirpe silvestre. Dicho centro minoritario podría estar aumentado en F24.1, pudiendo ser la causa del crecimiento "anómalo" de dicha estirpe revertiente. A pesar de la superposición de bandas en esta región, con la ayuda de la técnica de cinética rápida, se han podido sacar algunas conclusiones claras aunque otros datos permanecen aún sin explicar.

3.6.3.1. SATURACION POR LUZ ACTINICA SOBRE LOS CAMBIOS A 428 nm

Cuando se trabaja con destellos muy cortos cabe la posibilidad de no estar saturando en luz, sobre todo si los experimentos se hacen con células enteras. Por tanto, era necesario comprobar si nuestros experimentos se estaban haciendo con luz saturante o no. Para comprobarlo se registraron los cambios a 428 nm variando la intensidad del destello, situación que se conseguía colocando filtros neutros de distinta transmisión delante de la lámpara actínica. Los resultados de la Fig. 43 demuestran que en los experimentos con células enteras de F24.1 estábamos utilizando pulsos saturantes, ya que con un filtro que ab

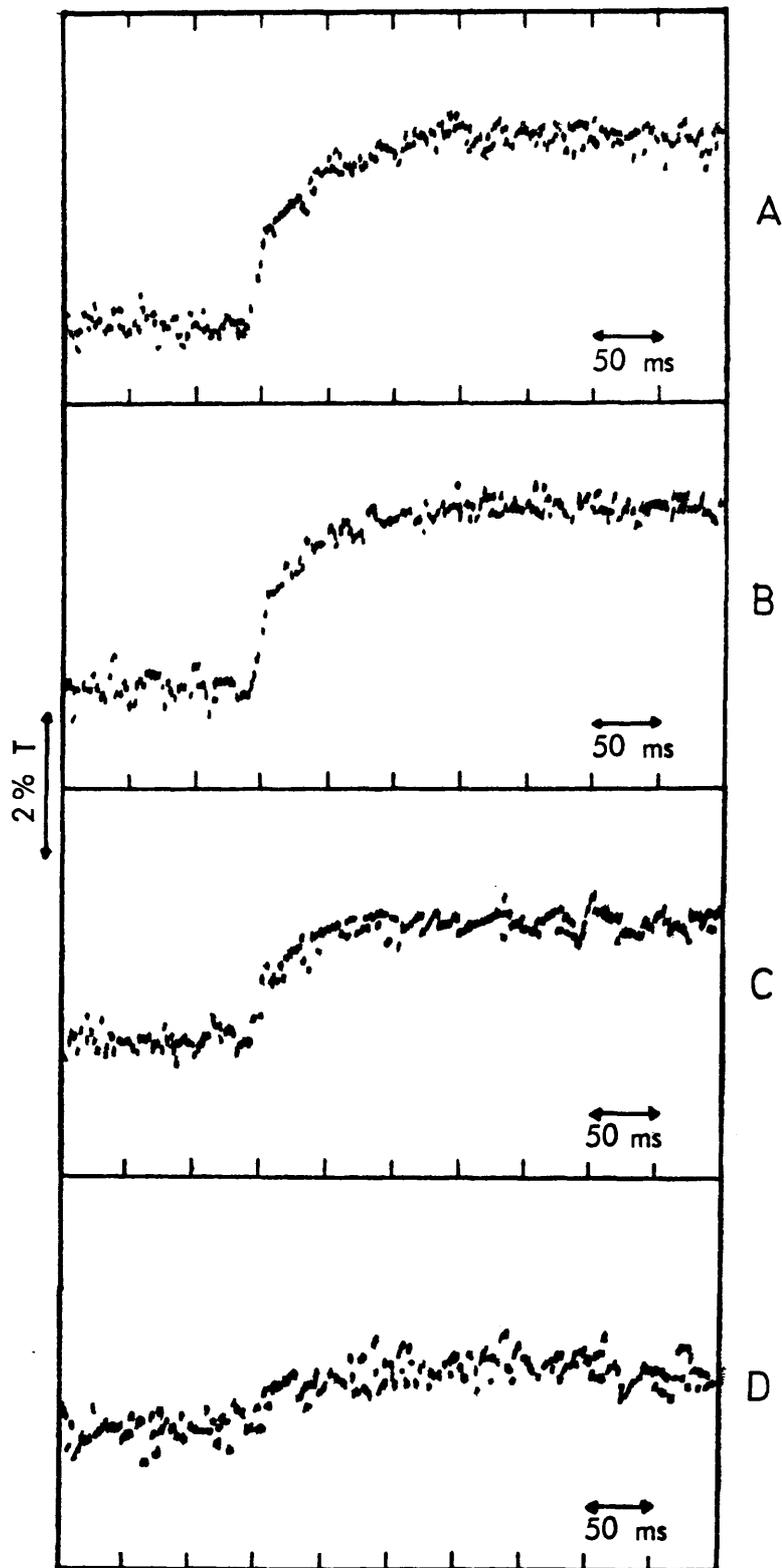


Fig. 43.- Incremento de transmisión a 428 nm inducido por pulsos de intensidad variable mediante el uso de filtros con distinta transmisión óptica.

sorbía el 50% de luz se obtuvo el mismo cambio que con el 100% que se empleaba normalmente.

Para corroborar este resultado, se comparó el cambio a 428 nm inducido por la luz de la lámpara usada normalmente y la emitida por un laser potente. Los cambios (no presentados aquí) fueron idénticos en ambas condiciones, lo que demuestra que la luz del destello utilizado normalmente era suficiente para saturar las reacciones fotoquímicas en células enteras de F24.1.

3.6.3.2. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS SUBSIGUIENTES A UN PRIMER DESTELLO

Cuando se ilumina con un pulso corto una suspensión de células de F24.1 se observa un cambio de absorción negativo bifásico (Fig. 44A). Las cinéticas a tiempos más cortos muestran las dos fases perfectamente definidas, una rápida con un $t_{1/2}$ de 300 μ s y otra más lenta con un $t_{1/2}$ de 4 ms (Fig. 44 B y C). El cambio más lento podría estar conectado con la reducción del cit C-420 como se deduce de la similitud de sus cinéticas. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna otra cinética de características similares al cambio rápido de 428 nm.

3.6.3.3. CINÉTICA DE LOS CAMBIOS A 428 nm AL VARIAR EL NUMERO DE DESTELLOS

La Fig. 45 muestra las cinéticas registradas a 428 nm después de 1, 2 y 4 destellos respectivamente. Sorprendentemente el cambio rápido desaparece al aumentar el número de destellos, mientras que la fase lenta permanece inalterada a través de los mismos. El hecho de que el cam-

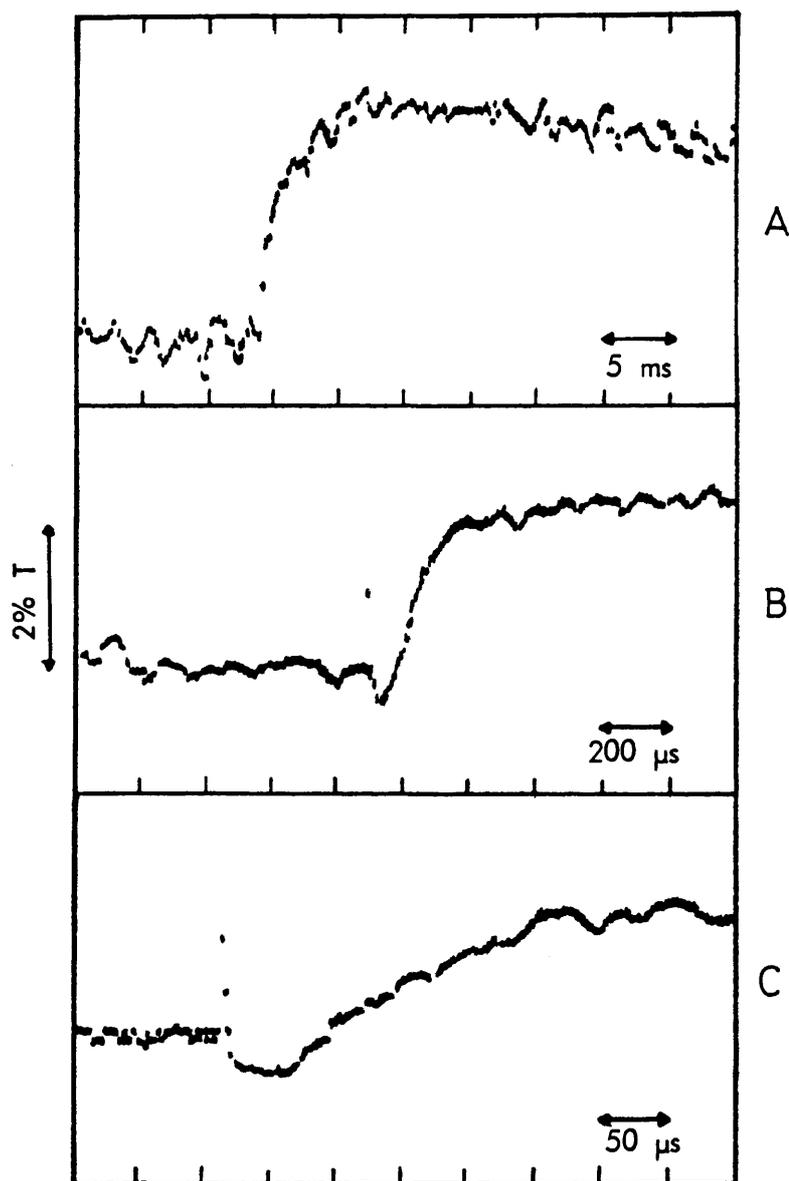


Fig. 44.- Cinética de los cambios a 428 nm inducidos por un pulso corto registrado con distintas escalas de tiempo.

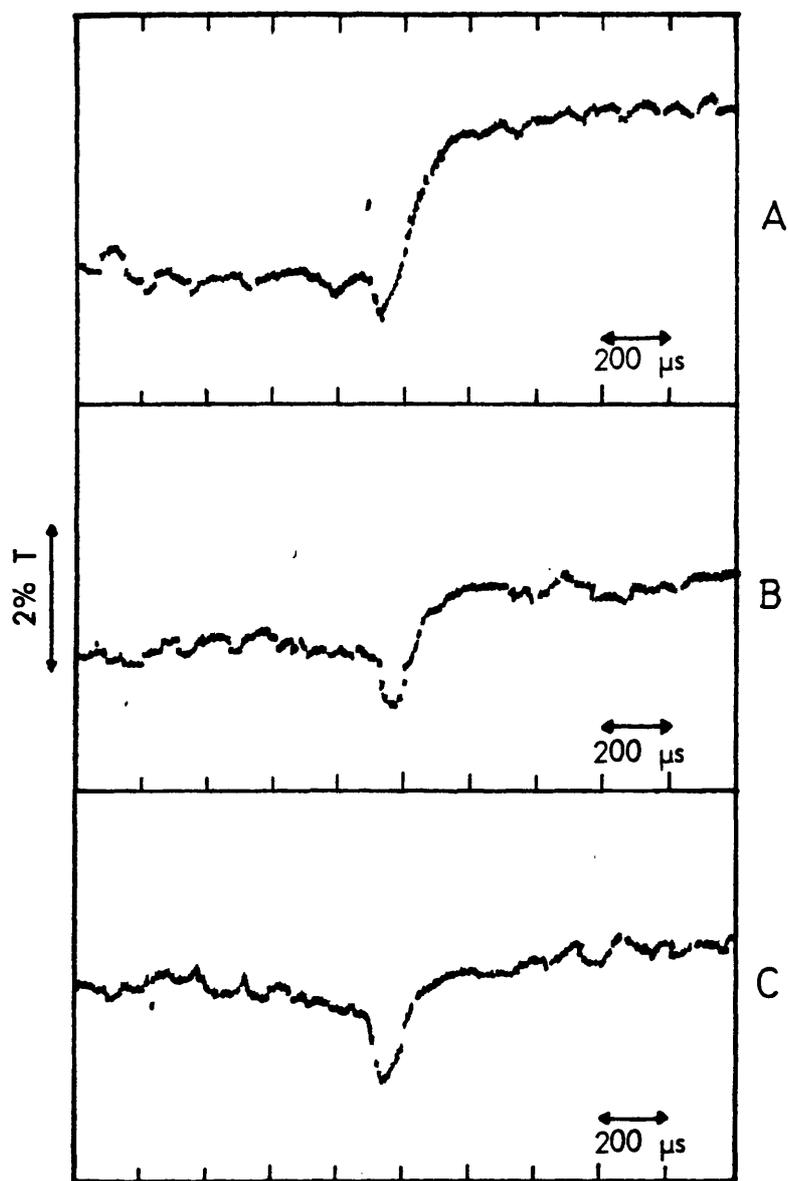


Fig. 45.- Cinética de los cambios registrados a 428 nm después de un número variable de pulsos consecutivos separados 100 ms.

bio lento permanezca sin alteración al variar el número de pulsos está de acuerdo con el experimento de la Fig. 42, en el cual el cambio a 420 nm se mantuvo totalmente con un segundo destello, lo cual apoya nuestra teoría de que el cambio lento a 428 nm está conectado con el cambio registrado a 420 nm.

Por otra parte, la desaparición del cambio rápido a 428 nm con el número de pulsos indicaría que el compuesto causante de dicho cambio no es donador primario de electrones para el P870, ya que como se presentó en la Fig. 40 la cinética de éste no varió a través de 1, 2 y 4 iluminaciones. Más bien se trataría de un compuesto muy relacionado con la fotoquímica primaria pero cuya formación se satura en un primer destello y cuya desaparición es muy lenta, del orden de segundos.

3.6.3.4. DETERMINACION DEL CAMBIO MAXIMO A 428 nm

El hecho de que en F24.1 exista solamente entre 5-10% de centros de reacción respecto a S1, y si suponemos que la cantidad de donadores secundarios de electrones no ha variado, en un primer destello no se obtendría el máximo cambio posible registrado a 428 nm. Para conocer el máximo cambio posible que se puede obtener a dicha longitud de onda es necesario utilizar destellos múltiples. La Fig. 46 confirma que se necesitan más de 10 destellos consecutivos para conseguir el cambio máximo a 428 nm. Este resultado apoya nuestra suposición de que la relación de donadores secundarios a centros de reacción es mucho mayor en F24.1 que en S1.

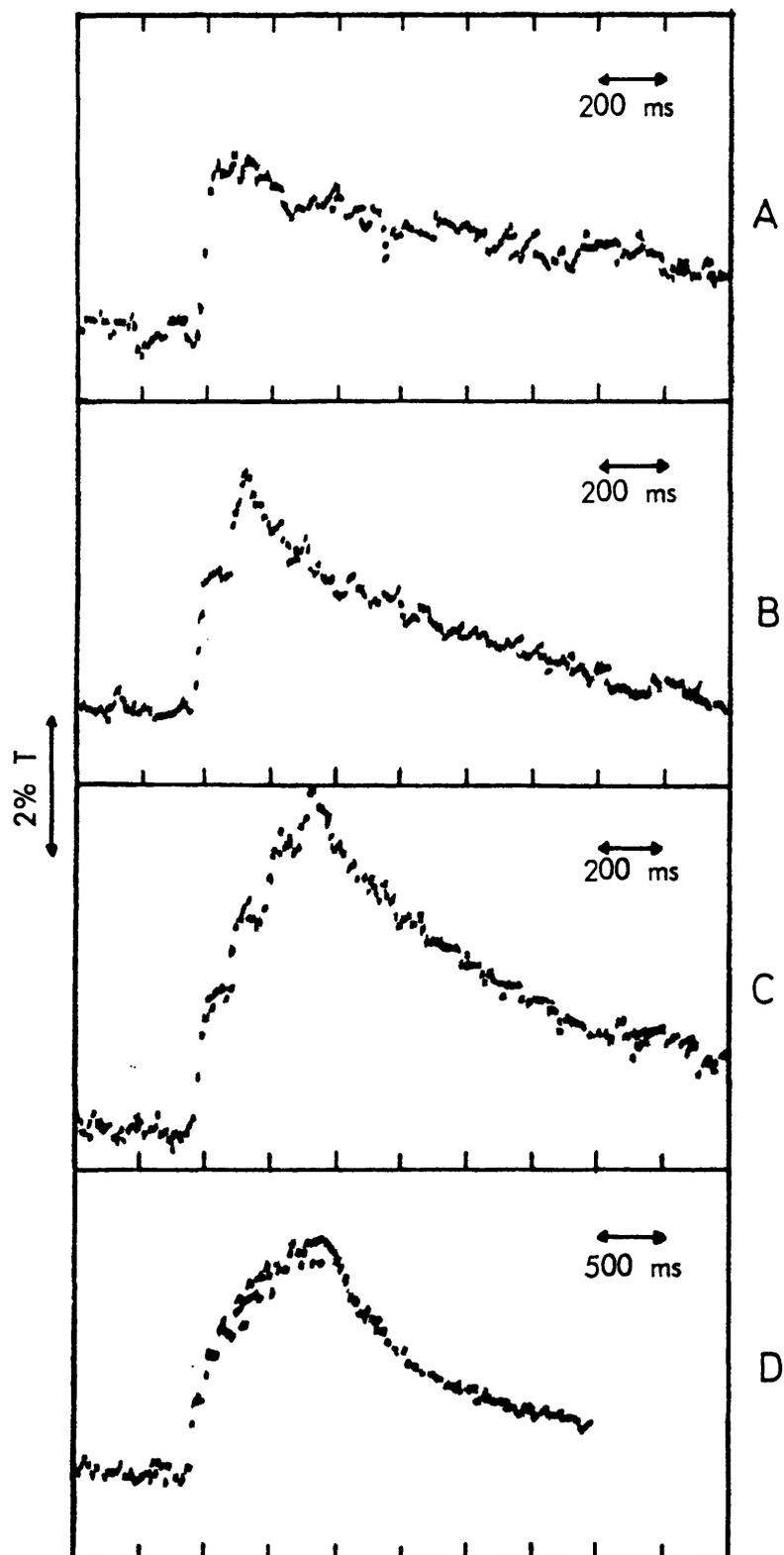


Fig. 46.- Efecto acumulativo de varios pulsos consecutivos sobre el cambio inducido a 428 nm. El ΔT en la gráfica D está reducido 1/2x.

3.6.4. EFECTO DE LA GRAMICIDINA D SOBRE LAS CINÉTICAS DE OXIDO-REDUCCION DE LOS CITOCROMOS

En la sección dedicada a potencial de membrana se habló del efecto de diversos desacoplantes sobre dicho potencial. Aunque no se conoce muy bien el mecanismo de acción de estos desacoplantes sí están bastante bien caracterizados sus efectos sobre algunas manifestaciones del potencial de membrana, como cambios electrocrómicos y fosforilación. Actualmente se admite que uno de los sitios (se desconoce si existen otros) de acoplamiento de energía generada en fotosíntesis de R. rubrum se localiza entre el cit b y el cit C-420 involucrados en un proceso de transporte cíclico en cromatóforos. Si este esquema fuese cierto también para células enteras, la adición de desacoplantes a una suspensión de células enteras provocará una aceleración de las reacciones redox que tienen lugar entre ambos transportadores, ya que el proceso de acoplamiento supone, entre otras cosas, una resistencia al paso de electrones a través de la membrana.

Nuestros resultados demuestran que el esquema en contrado en cromatóforos de S1 es válido también para células enteras de F24.1. Como se observa en la Fig. 47 A y B, tanto la cinética de oxidación del cit b como la cinética de reducción del cit C-420 se aceleran en presencia del desacoplante Gramicidina D. Estos datos apoyan la idea de que en células enteras de F24.1 los cit b y C-420 se encuentran directamente conectados y que puede existir entre ambos un sitio de fosforilación.

3.6.5. EFECTO DEL HOQNO Y ANTIMICINA A SOBRE LAS CINÉTICAS DE LOS CITOCROMOS

Los resultados en células enteras de F24.1 demuestran que tanto el HOQNO como la Antimicina A tuvieron

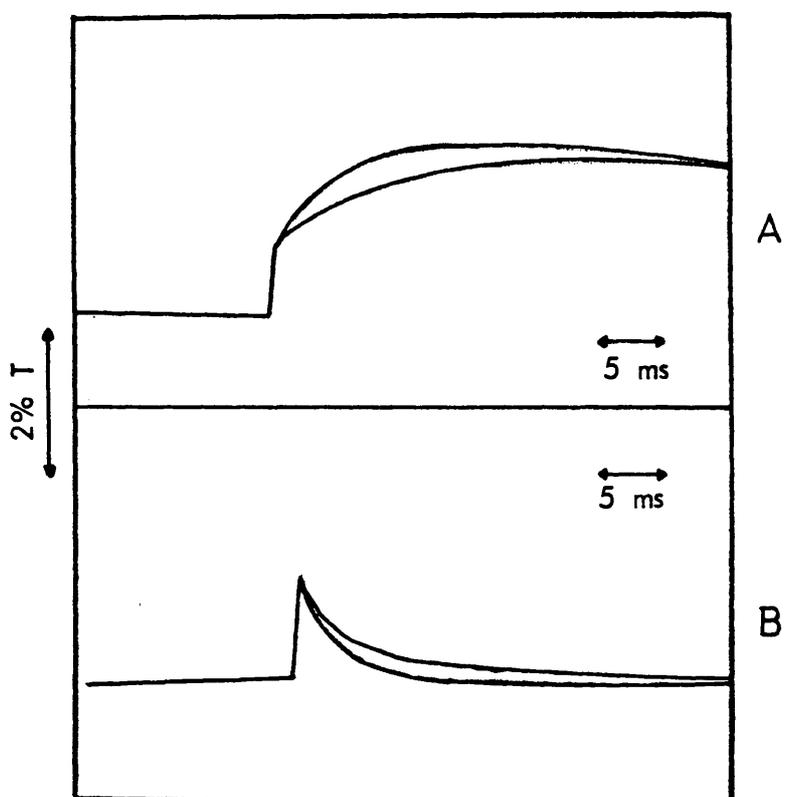


Fig. 47.- Efecto de la Gramicidina D (26,6 μM) sobre las cinéticas de oxidación del cit b 428 (A) y de reducción del cit C-420 (B).

un efecto similar al encontrado en S1 (van Grondelle et al., 1976). El HOQNO inhibió drásticamente la reducción del cit C-420 como se observa en la cinética de recuperación a 420 nm después de un destello único en ausencia y presencia del inhibidor (Fig. 48). Cuando el experimento se llevó a cabo utilizando pulsos múltiples se obtuvo la cinética de la Fig. 49B, en la cual se observan las sucesivas oxidaciones pero no las recuperaciones que tendrían lugar en ausencia del inhibidor. En la misma Figura se debe destacar que no se llega a la saturación del cambio sino después de muchas iluminaciones consecutivas, lo que indica que F24.1 posee mucho cit C-420 por P870, y se necesitan, por tanto, muchos ciclos de oxidación-reducción de los centros de reacción para conseguir oxidar todo el cit C-420. Este no sería el caso de la estirpe silvestre: en un primer destello todo el cit C-420 se oxida permaneciendo en tal estado oxidado ya que el HOQNO impide su reducción (van Grondelle et al., 1976), y por tanto en una segunda iluminación no debe aparecer ningún cambio.

En el antibiótico Antimicina A tuvo efectos similares a los del HOQNO sobre las cinéticas de óxido-reducción de los citocromos en F24.1. La Fig. 50 representa el espectro entre 428 y 444 nm del cambio inducido por tres destellos consecutivos. El máximo de la figura se centra alrededor de 432-433 nm. La Fig. 51 muestra la cinética de dicho cambio registrado a 436 nm. En esta figura se observa un cambio rápido que coincidiría con la reducción del cit b por los reductores de bajo potencial al ser reducidos por el aceptor primario. En presencia del inhibidor, la cinética de recuperación se hace muy lenta. El mecanismo de dicha oxidación así como los compuestos oxidantes se desconocen aunque lo más probable es que sean oxidantes externos a la cadena cíclica de transporte de cargas.

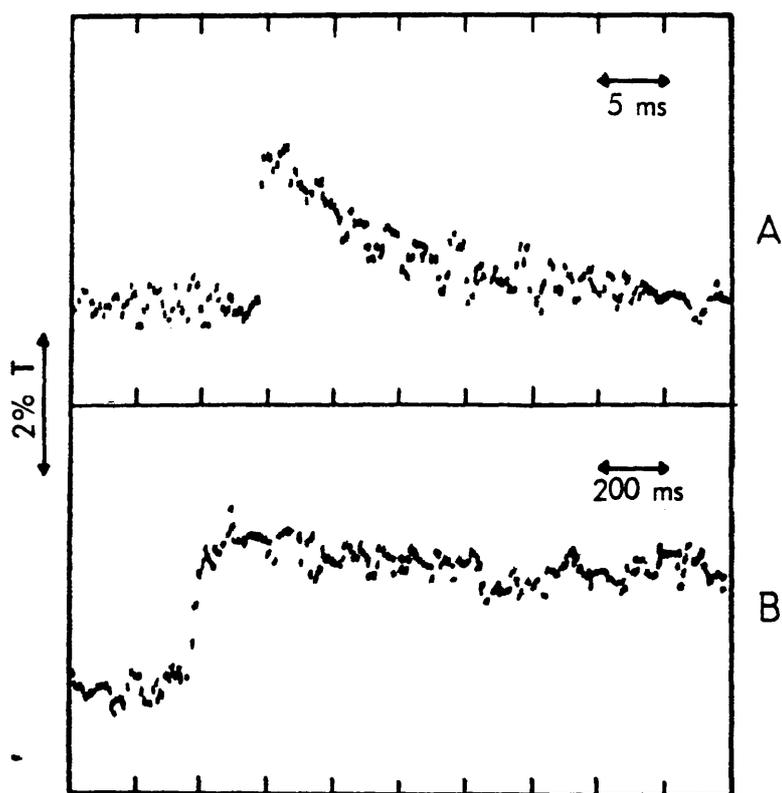


Fig. 48.- Efecto del inhibidor HOQNO sobre la cinética de recuperación del cambio registrado a 420 nm subsiguiente a un pulso único: A (sin adición); B (+ HOQNO 10 μ M).

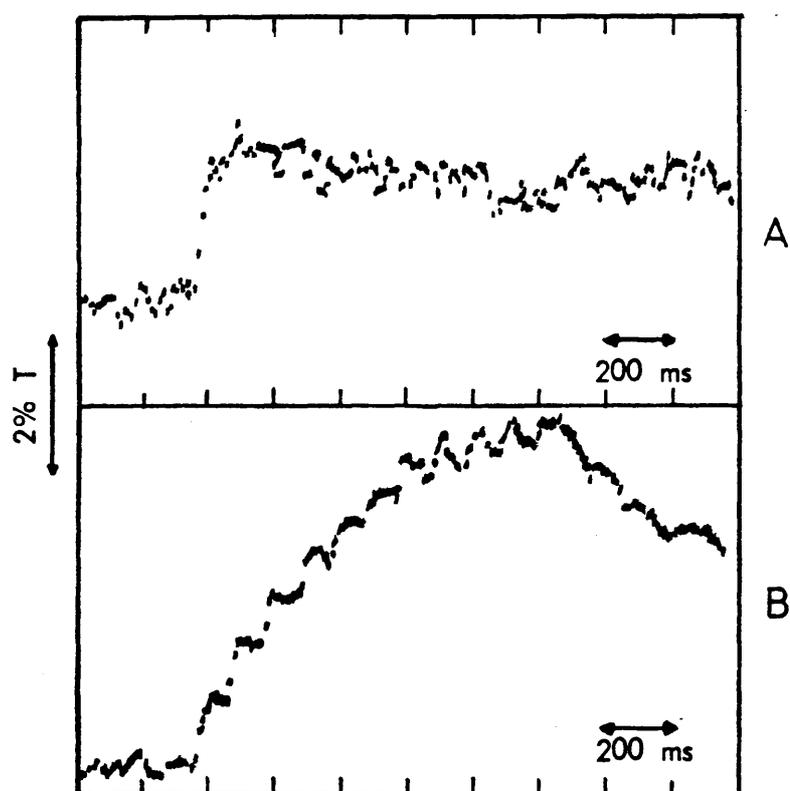


Fig. 49.- Efecto acumulativo de pulsos múltiples sobre el incremento de transmisión a 420 nm en presencia del inhibidor HOQNO ($10 \mu\text{M}$). La magnitud del cambio en B está reducida $1/2x$.

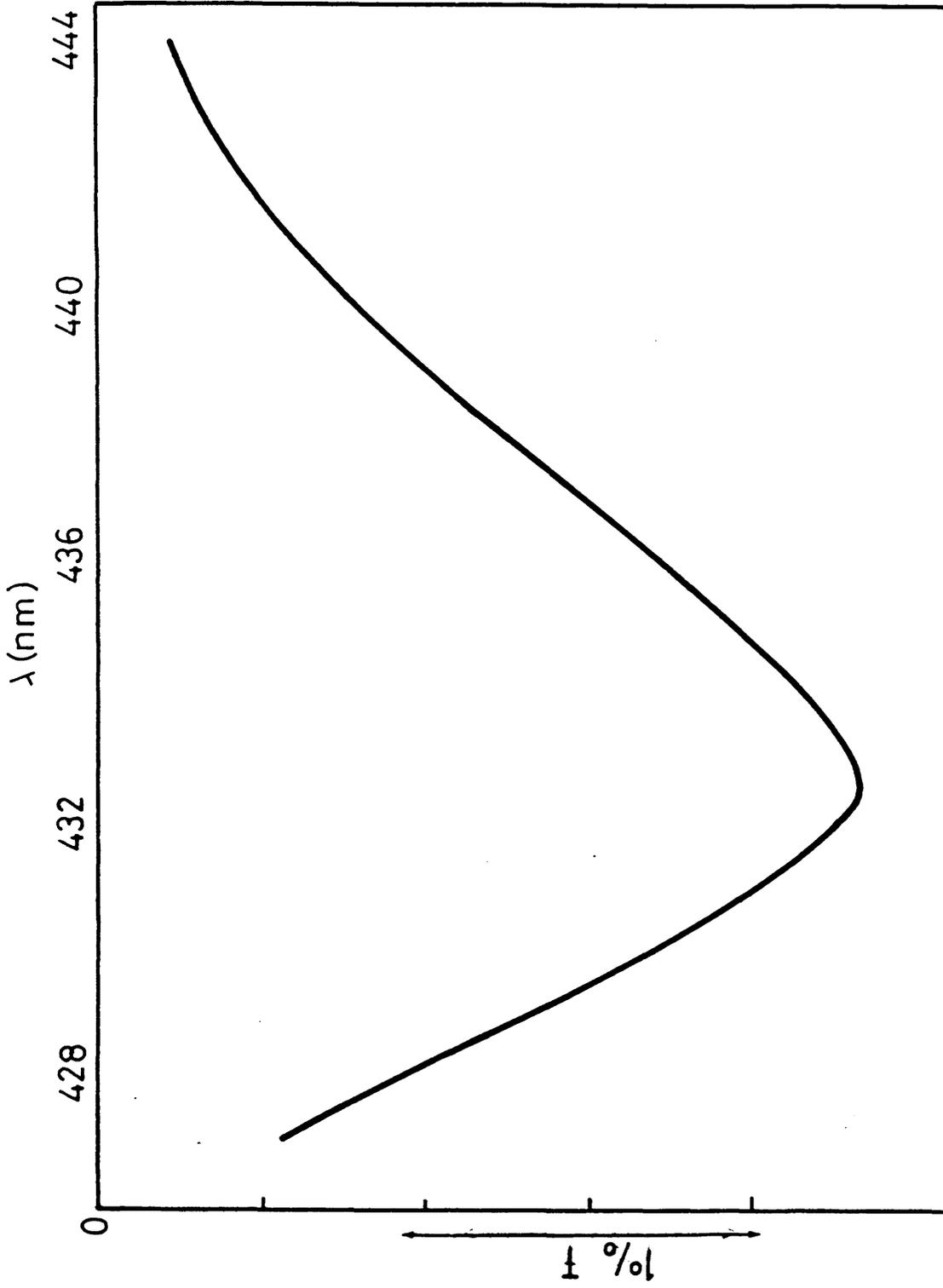


Fig. 50.- Espectro del cambio inducido por tres pulsos consecutivos en presencia del inhibidor Antimicina A (10 μ M).

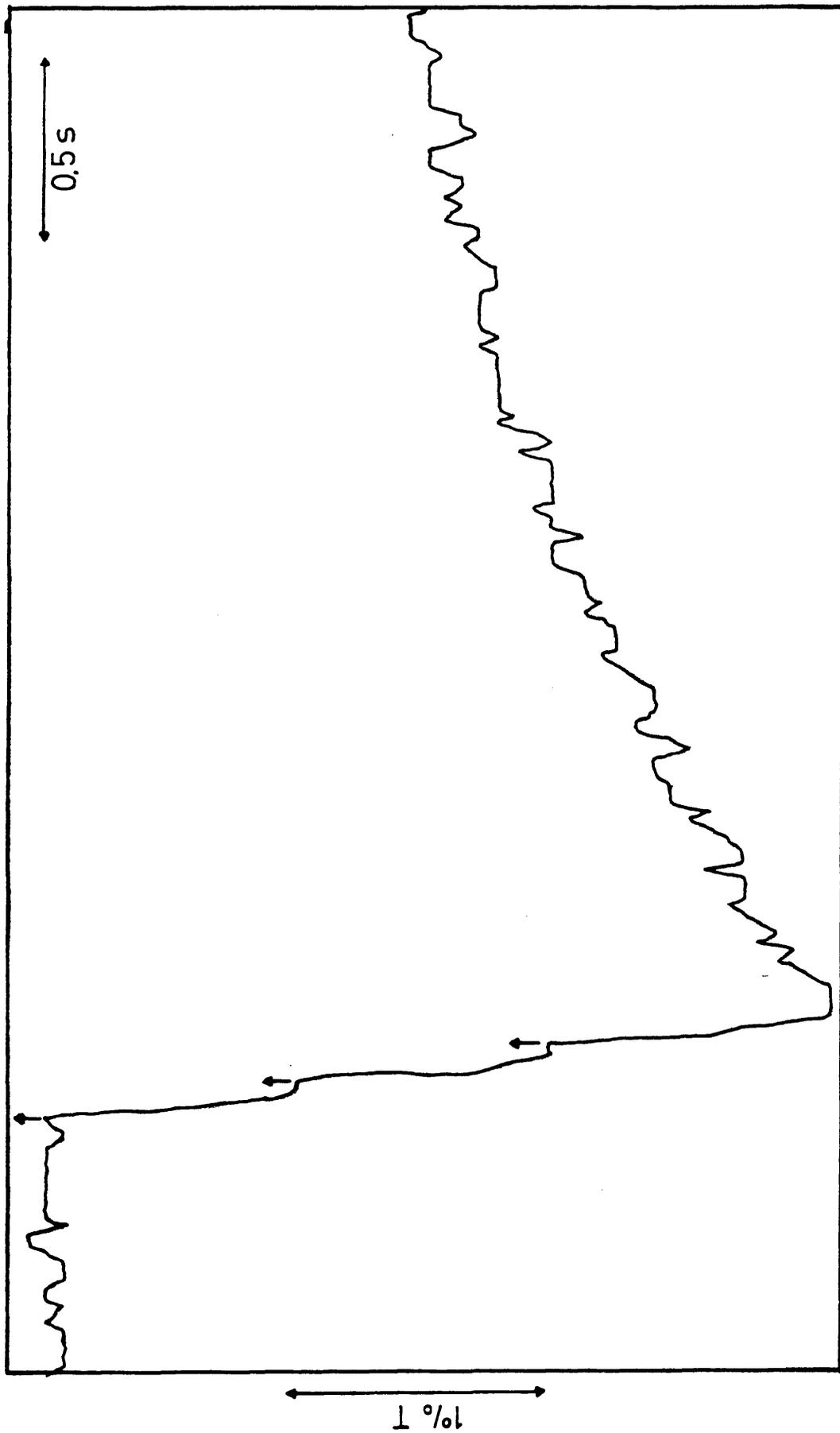


Fig. 51.- Cinética del cambio registrado a 436 nm inducido por tres pulsos consecutivos en presencia del inhibidor Antimicina A (10 μ M).

La Fig. 52 muestra la cinética de recuperación del cambio registrado a 420 nm después de tres iluminaciones consecutivas en presencia de Antimicina A. El cit C-420 sufre la consiguiente oxidación en cada iluminación, que se recupera muy lentamente ya que se ha cortado el flujo de electrones hacia dicho compuesto por efecto del inhibidor.

De los experimentos de espectroscopía de destello podemos sacar varias conclusiones importantes:

- a) El esquema básico de las reacciones de óxido-reducción inducidas por destellos en F24.1, es muy similar al propuesto por otros autores para la cepa silvestre.
- b) Hemos encontrado una secuencia de reacciones que involucran al cit b560 \longrightarrow cit C-420 \longrightarrow P870, basándose en la similitud de las cinéticas de óxido-reducción.
- c) Esta secuencia de reacciones pensamos que es parte de una cadena cíclica, ya que en presencia de inhibidores que cortan el flujo de electrones entre los cit b y C-420, se observa un incremento de absorción con el máximo a 432-433 nm que corresponde a la reducción del cit b.
- d) Basándose en los resultados con destellos múltiples y adición de inhibidores, podemos afirmar que la relación de donadores secundarios a P870 es mucho mayor en células enteras de F24.1 que en la estirpe silvestre. Esta situación permite que el centro de reacción de F24.1 pueda tener un mayor reciclaje de procesos de óxido-reducción por unidad de tiempo ya que su recuperación se completa en unos 400 μ s, mientras que en S1 tarda unos 20 ms.

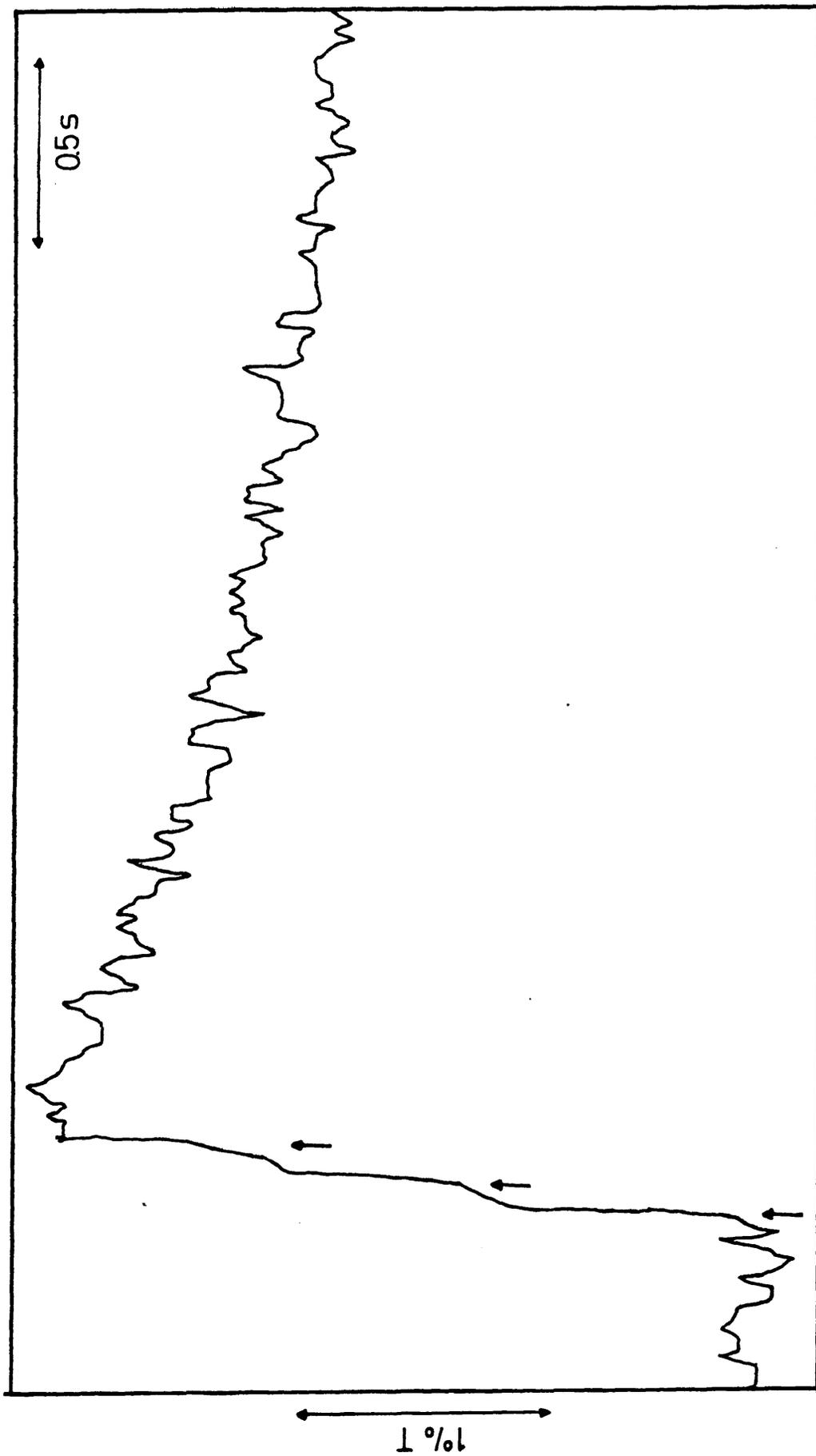


Fig. 52.- Efecto del inhibidor Antimicina A (10 μ M) sobre la cinética de recuperación del cambio registrado a 420 nm inducido por tres pulsos consecutivos.

IV. DISCUSSION

Con los resultados presentados en esta memoria no se ha pretendido hacer genética sobre la bacteria fotoorgano-trófica R. rubrum, si bien en la obtención de los mismos se hayan utilizado diversas estirpes mutantes. El objetivo de la línea que con esta tesis se ha comenzado en nuestro laboratorio consiste en estudiar las características fenotípicas de mutantes con centros de reacción alterados para obtener un mejor conocimiento de la función que desempeñan dichos complejos en la fotosíntesis bacteriana. En esta memoria se ha descrito por primera vez en la literatura el aislamiento de mutantes con centros de reacción alterados en R. rubrum. La deficiencia total de centros de reacción funcionales fue acompañada de la pérdida de la capacidad para crecer a expensas de la luz, lo que demuestra la esencialidad de tales complejos para un crecimiento fototrófico. Nuestros resultados confirman las conclusiones obtenidas por Sistrom y Clayton (1964) con el aislamiento del mutante no fototrófico PM-8 de Rp. sphaeroides. Asimismo hemos notificado el aislamiento de revertientes fototróficos que recuperaron distintos niveles de P800. Nuestro trabajo se ha centrado fundamentalmente en la caracterización detallada de uno de tales mutantes, el F24.1, cuyos resultados satisfactorios hacen preveer que el estudio futuro del resto de los revertientes aporte nuevos e importantes datos acerca de la estructura y función del centro de reacción.

Nuestro enfoque experimental para el estudio de la fotosíntesis de R. rubrum se ve en parte limitado por la falta en esta bacteria de un sistema de análisis genético. Sin embargo, el aislamiento de mutantes con un fenotipo bien caracterizado constituye en sí un primer paso para estudiar y desarrollar en el futuro dicho análisis genético. En este sentido, R. rubrum sería especialmente apropiado para estudios genéticos sobre los centros de reacción ya que esta bac

teria posee una banda única a 800 nm adscrita al centro de reacción, lo que facilitaría enormemente la selección de mutantes con distintos niveles de centros de reacción. Dicha característica no se da en otras bacterias fotosintéticas como Rp.sphaeroides, Rp.capsulata, Chr.vinosum, etc., que presentan una fuerte absorción adscrita a la bacterioclorofila de antena a dicha longitud de onda (Olson et al, 1966).

Basándonos en las características fenotípicas de los mutantes no fototróficos descritos, podemos afirmar que la mutación o mutaciones que operan en estos mutantes no afectan a la síntesis de la bacterioclorofila o carotenos, ni a su incorporación en la membrana. Dicha conclusión se deduce de la similitud de los espectros de los pigmentos de antena de los mutantes y del silvestre. Asimismo, la mutación o mutaciones no afectan al crecimiento respiratorio ya que las velocidades de crecimiento fueron similares en condiciones aeróbicas. Por otra parte, la ausencia en F24 de las actividades más características adscritas a los centros de reacción y la escasa proporción de las proteínas a, b y c en los geles SDS-poliacrilamida hacen pensar que la mutación o mutaciones afectan a la formación de los centros de reacción. La caracterización de las proteínas del centro de reacción, en cuanto a sus pesos moleculares (Clayton et al, 1972; Okamura et al, 1974), composición de aminoácidos (Steiner et al, 1974; Steiner et al, 1976) y grupos sulfuros lábiles (Steiner et al, 1974, Okamura et al, 1975) permiten concluir que se trata de tres polipéptidos diferentes, lo que nos obliga a pensar en otros tantos genes diferentes. Todos los mutantes no fototróficos ensayados en nuestro laboratorio tienen fuertemente alteradas cuantitativamente las tres proteínas del centro de reacción, y todos los revertientes ana-

lizados recuperaron paralelamente las tres proteínas. Estos datos permiten sugerir, teniendo en cuenta el tipo de mutágeno utilizado, que puede tratarse de una mutación puntual que afecta a un gen regulador que controla la actividad de los tres genes responsables de la síntesis de los tres polipéptidos del centro de reacción.

Como se vió en RESULTADOS, uno de los revertientes fototrofos, el F24.1, presentó una proporción mínima de la banda de 800 nm en cromatóforos y células enteras, a pesar de lo cual su crecimiento a intensidades de luz altas no se apartó demasiado del encontrado en la estirpe silvestre. La caracterización del centro de reacción que opera en dicha estirpe revertiente era un paso obligado en el desarrollo de nuestro trabajo, pues una modificación del centro de reacción podría generar un mayor rendimiento en su función. El espectro diferencial luz-oscuridad coincidió en F24.1 y S1 tanto en la región IR-cercano como en el visible (resultado no presentado). La señal EPR ($g = 2,0026$) presentó en F24.1 las mismas características que en la estirpe silvestre; dicha señal inducida por luz aparece como consecuencia de la formación de un radical catión dimérico (P_2^+) (Norris et al, 1971). Una banda inducida por luz a 1250 nm también se detectó en F24.1. Todas las señales analizadas adscritas al centro de reacción fueron similares cualitativamente en ambas estirpes, si bien en F24.1 representaron como un 5-10% de las señales registradas en S1. Por otra parte, la aparición de la banda a 1250 nm y la anchura de la señal EPR ($\Delta H \approx 9,5$ Gauss) sugiere que en ambas estirpes operan los mismos mecanismos en el proceso de la separación de cargas en los centros de reacción. La purificación de los centros de reacción de ambas estirpes y el estudio comparativo de

los mismos constituyen una prueba aún más convincente sobre la similitud de dichos centros de reacción en ambas estirpes fototróficas. Parece ser, por tanto, que el crecimiento "anómalo" de F24.1 en condiciones fototróficas no radica en modificaciones cualitativas de sus centros de reacción.

Los datos discutidos anteriormente dan una información sobre la naturaleza de los centros de reacción, pero no resuelven el interrogante acerca del crecimiento "anómalo" de F24.1 en condiciones fototróficas. Los datos expuestos en RESULTADOS sobre la generación de potenciales de membrana inducidos por luz dan un paso importante en la búsqueda de una justificación posible de tal crecimiento, aunque ello no aclare el mecanismo seguido por F24.1 para la formación de tal potencial.

Se acepta en general que la energía absorbida por los pigmentos del aparato fotosintético se utiliza para crear un potencial de membrana que tiene su punto de partida en la misma separación de cargas en los centros de reacción. Muchos estudios se han realizado, pero poco se sabe aún, sobre las distintas manifestaciones de dicho potencial: cambios conformacionales, principalmente intramoleculares, (Jackson et al., 1971; Boyer et al., 1973; Chance et al., 1969); gradiente de potencial electroquímico a través de la membrana (Slater, 1971; Mitchell, 1961 y 1968). Posiblemente todas las formas de energía anteriormente mencionadas tengan una importancia capital en los procesos fisiológicos celulares y más concretamente en el mecanismo de acoplamiento de energía que dará lugar a la síntesis de ATP.

En nuestros experimentos hemos utilizado los

cambios adscritos a los carotenos y bacterioclorofila de antena como parámetros indicativos del potencial de membrana. El paso de cargas eléctricas a través de la membrana provoca un desplazamiento de las bandas de absorción de los pigmentos mayoritarios de las bacterias fotosintéticas (Fleischman et al., 1968; Barsky et al., 1973; Jackson et al., 1971). La posibilidad de crear cambios de los carotenos en la oscuridad mediante gradientes de difusión iónica a través de la membrana apoya tales conclusiones (Jackson et al., 1968; Jackson et al., 1969; Crofts et al., 1970). Las mismas conclusiones se desprenden de la titulación potenciométrica de dichos cambios, puesto que se obtiene el cambio máximo cuando todos los citocromos y los centros de reacción de los cromatóforos se mantienen reducidos previamente a la excitación (Jackson et al., 1973; Dutton et al., 1975). Asimismo, el hecho de que dichos cambios estén ligados a estados de alta energía, ya que se pueden inducir en la oscuridad con pirofosfato y ATP (Barskii et al., 1973; Krasinskaya et al., 1977; Baltscheffsky, 1976), y de que la cinética de desaparición de los mismos se acelera en condiciones fosforilantes (Jackson et al., 1975), indica que la magnitud de tales cambios puede dar una medida de la capacidad de energizar la membrana. Por otra parte, la proporcionalidad entre gradientes de difusión iónica y los cambios de carotenos provocados por ellos ha sido brillantemente demostrado por Jackson y colaboradores (Jackson et al., 1969), y más recientemente por Takamiya y colaboradores (Takamiya et al., 1977). Basándonos, por tanto en estos trabajos anteriores creemos justificado el haber hecho un estudio comparativo de los potenciales de membrana generados por luz en cromatóforos de F24.1 y S1 cuantificando los cambios de los carotenos.

Los datos presentados en RESULTADOS, demuestran la existencia de dos partes muy diferenciadas en el cambio de los carotenos en S1, una parte del cambio fue sensible a desacoplante y la otra no. La diferencia entre los cambios en ausencia y presencia de desacoplantes (Fig. 35) da exactamente el espectro típico adscrito al desplazamiento de las bandas de los carotenos. Sin embargo en F24.1 toda la magnitud del cambio de los carotenos fue sensible a desacoplantes, coincidiendo el espectro de dichos cambios con el diferencial obtenido en S1. Por tanto, en F24.1 se obtuvieron directamente un espectro puro del desplazamiento hacia el rojo de las bandas de los carotenos. A la vista de los resultados cabe pensar que los cambios sensibles a desacoplantes pueden ser la manifestación de un potencial de membrana más íntimamente relacionado con los procesos de acoplamiento de energía, ya que dicho potencial en F24.1 representa el 65-70% del observado en S1, que es suficiente para mantener un crecimiento celular del 70-75%.

Los datos de la Tabla V confirman los resultados anteriores y además muestran que dicho potencial de membrana presentó una sensibilidad al efecto de diversas concentraciones de varios desacoplantes comparable en ambas estirpes. Podemos por tanto sugerir que la integridad de la membrana no ha cambiado a pesar de carecer de una gran proporción de centros de reacción. Además se puede sugerir que el número de cargas que se generan en la membrana por efecto de la luz no debe ser muy distinto en ambas estirpes fototróficas o que la generación de potencial de membrana no es directamente proporcional al flujo de cargas a través de dichas membranas.

El hecho de que en S1 una parte del cambio de los carotenos no sea inhibido por efecto de desacoplantes, y

que en F24.1, que no posee más que un 5-10% de centros de reacción, se elimine totalmente, hace pensar que el cambio resistente se deba a la bacterioclorofila oxidada del centro de reacción. Los resultados obtenidos con la estirpe mutante G9, que carece de carotenos, apoya esta idea. El espectro luz-oscuridad entre 440-650 nm en esta estirpe fue muy similar al espectro de los cambios resistentes a desacoplantes en S1. Además, el espectro luz-oscuridad de los centros de reacción purificados del G9 se pareció enormemente al espectro de los cambios resistentes en S1. Por tanto, cabe pensar que dicho cambio resistente no se debe a los carotenos, de ahí que para análisis de los cambios electrocrómicos en sí en esta región del espectro sea necesario restar el cambio correspondiente que se detecta en el G9, o hacer las medidas en un espectrofotómetro "DUAL", con lo cual se eliminan tales interferencias siempre que las λ de referencia y medida estén suficientemente próximas.

Estudios cinéticos comparativos entre cromatóforos y centros de reacción purificados de las estirpes S1 y G9 nos aclararía si la fase rápida de los cambios adscritos a los carotenos (Jackson et al, 1971; Jackson et al., 1973; Takamiya et al., 1977) se debe a dichos carotenos o a otras moléculas distintas. Al mismo tiempo sería interesante hacer un estudio cinético comparativo con diversos mutantes para ver cómo se modifican cada una de las fases de la cinética del cambio al variar los niveles de centros de reacción.

Los experimentos discutidos anteriormente nos dan una idea del tipo de centro de reacción que opera en F24.1 y presentan aspectos globales de la generación de un potencial de membrana. Sin embargo, un estudio detallado de las

reacciones de óxido-reducción que operan en F24.1 es necesario para poder llegar a una posible explicación del crecimiento no proporcional a los niveles de centros de reacción que se observa en la estirpe revertiente F24.1. La espectroscopía de destello ha sido utilizada con frecuencia para estudiar la fotosíntesis bacteriana. Mediante dicha técnica se han caracterizado cinéticas de óxido-reducción de: P870 (Parson, 1966; Lukashev et al., 1976; Dutton et al., 1975), P800 (Shuvalov et al., 1978), bacteriofotofitina (Parson et al., 1975; Kauffmann et al., 1975), aceptor primario (Vermeiglio et al., 1977; Wraight, 1977), citocromos (Dutton et al., 1975; Parson, 1969; Prince et al., 1975), etc, en cromatóforos y centros de reacción purificados. Pocos estudios se han hecho, sin embargo, sobre células enteras por las dificultades que entraña. No obstante algunos trabajos han aparecido en la literatura sobre células enteras (Dutton et al., 1975; Kihara et al., 1969; van Grandelle et al., 1976). Creemos haber acertado al elegir las bacterias enteras como material de trabajo para caracterizar las reacciones de óxido-reducción que operan en F24.1. Los resultados satisfactorios que hemos obtenido utilizando destellos suficientemente cortos para provocar un solo ciclo de reacciones en la cadena de transporte de electrones, nos permitirán avanzar algunas ideas sobre los procesos que hacen posible el crecimiento "anómalo" de F24.1. Las conclusiones más importantes que se pueden obtener de nuestros resultados, se desprenden de un análisis comparativo entre los resultados obtenidos en F24.1 y los presentados por van Grandelle y colaboradores (1976) sobre la estirpe silvestre. Tales estudios constituyen el análisis más detallado que se ha hecho hasta este momento de las reacciones fotoquímicas que tienen lugar en células enteras de R.rubrum S1.

A pesar de que el esquema de los compuestos que intervienen en el transporte cíclico de electrones es básicamente el mismo en ambas estirpes fototrofas, un análisis detallado de las cinéticas registradas en ambas estirpes permite distinguir diferencias muy significativas. La cinética de recuperación del P870⁺ en el S1 consta de dos fases mayoritarias perfectamente diferenciadas, la más rápida con un t_{1/2} de 200-300 μ s. que constituye como un 50% del cambio y otra más lenta de 10 m s. En F24.1 sólo se aprecia una fase rápida mayoritaria con t_{1/2} de 200-300 μ s. La explicación dada por van Grondelle a la existencia de dos cinéticas distintas parece razonable y se puede dar por válida. La causa radica en la baja relación C-420/P870 existente en R.rubrum S1, que contrasta con otras bacterias muy afines como Rp.sphaeroides y Chr.vinosum (Parson, 1969; Dutton et al., 1975; Prince et al., 1976).

Sin embargo, la situación en F24.1 es muy diferente, la relación C-420/P870 es mucho mayor que en la cepa silvestre, como lo confirman los cambios a 420 nm en presencia de HOQNO. En presencia de 10 μM de HOQNO, que corta la re-reducción del C-420, se necesitan más de 10 pulsos consecutivos para oxidar todo el C-420 conectado con el centro de reacción. Conjuntando los datos de la identidad de las cinéticas de recuperación del P870⁺ y oxidación del C-420, y la necesidad de una serie de destellos consecutivos para completar el cambio a 420 nm, podemos concluir que la relación C-420/P870 en F24.1 es mucho mayor que en S1, lo que facilitaría un reciclaje más rápido de óxido-reducciones a nivel de los centros de reacción, que podría compensar, al menos en parte, la enorme diferencia cuantitativa de los niveles de P870 en la estirpe revertiente. Mientras que en S1 gran parte de

los centros de reacción en un momento dado estarían sin funcionar por falta de donador directo de electrones, los centros de F24.1 estarían reducidos mucho más tiempo. Esta situación se ve aún más favorecida por el hecho de que la recuperación del cambio a 420 nm en F24.1 es monofásica y se completa en unos 5 m s, que contrasta con los resultados de van Grondelle en S1, en los cuales aparecen dos fases de recuperación, una de 7 ms de $t_{1/2}$ por efecto del cit b y otra de 15 m s debida a donadores externos al ciclo vía una citocromo c-reductasa. Es decir, el citocromo C-420 oxidado por el $P870^+$ tendría una reducción más rápida en F24.1 que en S1, debido a su mayor relación cit b/C-420^+ subsiguiente a un destello saturante. En base a este planteamiento anterior proponemos la existencia de un paso limitante a nivel del C-420 en el transporte de electrones cíclico de R.rubrum S1 que podría limitar asimismo la síntesis de ATP; postulando, por tanto, un exceso de centros de reacción que provocaría la existencia de muchos centros desacoplados en condiciones de luz saturante.

Experimentos recientes (del Valle-Tascón et al., 1978) llegaron a las mismas conclusiones midiendo la síntesis de ATP inducida por destellos cortos. Los autores encontraron una estricta proporcionalidad entre niveles de c_2 y cantidad de ATP sintetizada por una suspensión de cromatóforos. Una estequiometría de 1:1 fue encontrada, postulando, por tanto, un paso limitante para la fosforilación cíclica a nivel del cit c_2 en cromatóforos de R.rubrum S1. No obstante, las características de un mutante de Rp.sphaeroides, el R-22:E-1, (Clayton et al., 1966) contrastan con nuestras conclusiones. Dicho mutante presentó un 30% de P800 respecto a la estirpe silvestre y creció a una velocidad del 25%. Una posible explicación de

estas diferencias puede estar en la diferente relación cit c_2 /P870 en células enteras de Rp.sphaeroides y R.rubrum, o en una posible organización diferente del aparato fotosintético.

Algunos experimentos interesantes apoyarían indiscutiblemente, en caso de confirmarse afirmativamente, nuestras predicciones acerca del cit C-420 y P870. Un primer experimento consistiría en medir las cinéticas de óxido-reducción de los citocromos y P870 en células enteras de las estirpes silvestre y revertiente utilizando destellos múltiples convenientemente espaciados. Este experimento no se ha hecho anteriormente por las dificultades técnicas que entraña su realización. Con este tipo de experimento cabría esperar grandes diferencias entre las cinéticas de ambas estirpes: en F24.1 se repetirían las mismas cinéticas durante los primeros destellos, mientras que en S1 un segundo destello induciría cinéticas completamente diferentes a las registradas después de un primer destello. Por tanto una combinación apropiada de pulsos múltiples nos daría una idea clara de la velocidad de funcionamiento de los centros de reacción, o lo que es lo mismo, nos permitiría hacer una estimación aproximada de la cantidad de separación de cargas por unidad de tiempo en ambas estirpes fototróficas. Si fuesen similares podría servir para explicar la generación del potencial de membrana sensible a desacoplantes, y el crecimiento fototrófico de la estirpe F24.1, a pesar de poseer un 5-10% de centros de reacción.

No hay que olvidar, sin embargo, que el éxito de los experimentos propuestos con pulsos múltiples no sólo dependerá de la relación C-420/P870 sino también de la accesibilidad de tales citocromos a los centros de reacción. Sería condicionante de estos experimentos la cantidad de

citocromos que se puedan agregar a los centros, la velocidad de intercambio entre citocromos oxidados y reducidos, así como la posible aparición de cambios conformacionales de los centros oxidados que podrían provocar un cambio de orientación del sitio activo hacia otros citocromos reducidos colindantes con los oxidados inmediatamente antes.

Otra prueba que apoyaría nuestra interpretación de los resultados consistiría en el aislamiento de un mutante a partir del silvestre, con mayor capacidad de crecimiento y que a su vez hubiese aumentado su relación C-420/P870. Si sometemos un cultivo de S1 a altas intensidades de luz y hacemos sucesivos pases en dichas condiciones de crecimiento, sería posible obtener, después de muchas generaciones, un cultivo enriquecido en células que se hubiesen seleccionado por su capacidad de crecer más rápidamente. Tales células podrían cumplir las características antes mencionadas. Dicha selección se vería favorecida en presencia de arseniato, un inhibidor competitivo del fosfato, que se une al ADP dando un compuesto cuya hidrólisis posterior no desprende energía y por lo tanto es inservible para el crecimiento celular. En tales condiciones se seleccionarían aquellas células que tuviesen más capacidad para sintetizar ATP que podrían coincidir con las que tuviesen mayor proporción C-420/P870.

Otro experimento importante consistiría en iluminar con luz continua una suspensión bacteriana, apagar y ver la velocidad de reducción de P870⁺ en estado estacionario. Estas condiciones experimentales coinciden más con las condiciones normales de crecimiento y por tanto proporcionarían datos desde un punto de vista más fisiológico.

Una parte un tanto oscura en nuestros experimentos es la relacionada con la fase rápida del cambio observado

a 428 nm. No se ha caracterizado bien dicha fase ya que no parece que tenga algo que ver con el transporte cíclico, objeto principal de nuestro estudio. Los únicos datos que conocemos es que se trata de un cambio muy rápido, por tanto muy relacionado con la fotoquímica primaria, y que desaparece con los primeros pulsos. Dicho cambio se tiene que deber a un compuesto muy próximo a la separación de cargas en los centros de reacción, no sabemos si sobre el lado oxidante o reductor de la membrana. El hecho de que tal cambio disminuya drásticamente en destellos consecutivos apunta a que se debe a un compuesto que interviene en pequeña cantidad en el proceso y que su recuperación es muy lenta, del orden de s. Sin embargo, hay algunos indicios de que no se trata de un donador directo de electrones para el $P870^+$: por una parte se ha comprobado que en F24.1 el cambio a 792 nm es repetitivo al menos durante cuatro destellos consecutivos, cosa que no ocurre con el cambio rápido a 428 nm que prácticamente se agota en un primer destello; por otra parte el cambio a 420 nm es absolutamente repetitivo al menos en dos destellos consecutivos. Si existiesen dos donadores para el $P870^+$, como han apuntado algunos autores para la estirpe silvestre (Govindjee et al., 1970; van Grondelle et al., 1976; Sybesma et al., 1968), correspondientes al cambio a 420 nm y a la fase rápida del cambio a 428 nm, no podría darse esta situación, puesto que en un primer destello parte del $P870^+$ se recuperaría por el C-420 y otra parte por el hipotético C-428. En una segunda iluminación, todo el $P870^+$ se recuperaría por el C-420, lo cual supondría un número mayor de moléculas oxidadas de C-420 que en la primera, y por tanto tendría que aparecer un cambio de absorción mayor a 420 nm en el segundo destello que en el primero. Como tal situación se contradice con los resultados

obtenidos, cabe pensar que el cambio rápido a 428 nm no se debe a un donador directo para el $P870^+$ sino más bien se trataría de un compuesto que se encuentra en la parte del aceptor primario, que se satura rápidamente y que no interviene en el transporte cíclico como se desprende de su recuperación lenta.

Aunque las características cinéticas del cambio rápido a 428 nm coinciden bastante bien con las descritas para el C-428 (van Grondelle et al., 1976), nuestros resultados no apoyan que dicho cambio sea debido a la oxidación del C-428 por el $P870^+$. Nuestras conclusiones son válidas solamente para la estirpe revertiente, y no descartan la posibilidad de que en S1 exista un segundo centro de reacción conectado con el C-428. También es posible que el cambio rápido detectado a 428 nm en F24.1, se de también en el S1 pero que no se pueda detectar debido a que el resto de los cambios en dicha estirpe son mucho mayores, los cuales enmascararían dicho cambio minoritario.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES



1. Con el mutágeno nitrosoguanidina se obtuvieron cinco mutantes no fototróficos. Todas las características más significativas adscritas a los centros de reacción se encuentran ausentes en dichos mutantes.
2. A partir de esos mutantes se ha aislado una serie de revertientes espontáneos por recuperar la capacidad de crecer en la luz. Algunos de ellos recuperaron niveles de centros de reacción similares a la estirpe silvestre mientras que otros mostraron niveles inferiores. Un representante de estos, el F24.1, creció con velocidades próximas a las normales en condiciones fototróficas.
3. Se ha puesto a punto un método para cuantificar de manera precisa la proporción de P800 que existe en una suspensión de cromatóforos utilizando concentraciones controladas de tampones redox.
4. El revertiente fototrófico F24.1 posee un único centro de reacción funcional con las mismas características del centro típico de R. rubrum S1. Dicho centro de reacción representa cuantitativamente alrededor del 7% respecto a los niveles existentes en S1.
5. A pesar de poseer bajos niveles de P800, los cromatóforos de F24.1 son capaces de generar un potencial de membrana sensible a desacoplantes próximo al de la estirpe silvestre.
6. En S1 parte del cambio adscrito a los carotenos es sensible a desacoplantes y el resto no lo es, lo cual sugiere que dichas partes tienen su origen en procesos o moléculas diferentes.

7. Basándonos en las cinéticas obtenidas mediante espectros copia de destellos, en ausencia y presencia de inhibidores, podemos concluir que en células enteras de F24.1 funciona un sistema cíclico de transporte de electrones. Dicho transporte cíclico incluiría entre otros componentes: P870, cit C₂ y cit b. Este transporte de cargas cíclico coincide con el descrito para la estirpe silvestre.
8. El reciclaje de óxido-reducción en los centros de reacción de F24.1 puede ser más rápido que en S1, ya que la recuperación del cambio a 792 nm se completó en unos 400 μ s, mientras que en S1 tardó varios ms. Es posible que este reciclaje más rápido sea debido a la mayor relación citocromos/P870 y a la movilidad en la membrana de dichos transportadores. Como consecuencia, postulamos una velocidad de flujo de electrones diferente a nivel de los centros de reacción en ambas estirpes fototróficas.
9. El incremento de absorción más rápido a 428 nm ($t_{1/2} = 300 \mu$ s) no está acoplado a la reducción del P870⁺. Este hecho no está de acuerdo con su intervención en un flujo de electrones no cíclico como el postulado por otros autores.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aagard, J. and Siström, W.R. (1972) *Photochem. Photobiol.* 15: 209-25.
- Amesz, J., and Vredenberg, W.J. (1966) en: *Current in Photosynthesis* (J.B. Thomas and J.C. Goedheer, eds) pp. 75-83.
- Baltscheffsky, M. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130: 646.
- Baltscheffsky, M. (1967) *Nature*, Vol 216, N° 21, pp. 241-43.
- Baltscheffsky, M. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 130: 646-52.
- Baltscheffsky, H. (1974) *Origin of Life*, 5: 387.
- Ballschmiter, K. and Katz, J.J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91: 2661.
- Barsky, E.L. and Samuilov, V.D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325: 454-62.
- Barsky, E.L., Borisov, A.Yu., Fetisova, Z.G. and Samuilov, V.D. (1974) *FEBS Lett.* 43 (3): 275-79.
- Bishop, N.I. (1973) en: *Photophysiology VIII* (Giese, A.C., ed) pp. 65-96. Academic Press, New York.
- Bolton, J.R. (1978) en: *Photosynthetic Bacteria* (R.K. Clayton and W.R. Siström, eds) pp. 419-29.
- Borisov, A.Yu. (1978) en: *Photosynthetic Bacteria* (R.K. Clayton and W.R. Siström) 323-31.
- Boyer, P.D.; Cross, R.L. and Momsen, W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 2837-39.
- Brock, J.D. (1973) en: *The Biology of Blue-Green Algae* (N.G. Carr and B.A. Whitton, eds) pp: 487-500.
- Case, G.D., Parson, W.W. and Thornber, J.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 223: 122.
- Case, G.D. and Parson, W.W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 253: 187-213.
- Chance, B. and Nishimura, M. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 46: 19-24.
- Chance, B.; Crofts, A.R.; Nishimura, M. and Price, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 13: 364.

- Chance, B. and Smith, L. (1955) *Nature* 175: 803.
- Clayton, R.K. and Sistrom, W.R. (1966) *Photochem. Photobiol.* Vol 5: 661-68.
- Clayton, R.K. (1966) *Photochem. Photobiol.* Vol 5: 679-88.
- Clayton, R.K. and Haselkorn, R. (1972) *J. Mol. Biol.* 68: 97-105.
- Clayton, R.K. (1966) *Photochem. Photobiol.* Vol 5: 669-77.
- Clayton, R.K. (1965) en: *Molecular Physics in Photosynthesis* pp: 149-56.
- Clayton, R.K. and Yamamoto, T. (1976) *Photochem. Photobiol.* Vol 24. pp: 67-70.
- Clayton, R.K. and Clayton, B.I. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 501: 470-77.
- Cogdell, R.J.; Monger, T.J. and Parson, W.W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 408: 189-99.
- Cogdell, R.J. and Crofts, A.R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 502: 409-16.
- Cogdell, R.J. and Crofts, A.R. (1972) *FEBS Lett.* 27: 176-78.
- Cogdell, R.J.; Jackson, J.B. and Crofts, A.R. (1972) *Bioenergetics* 4: 413-29.
- Cohen, Y; Padan, E. and Shilo, M. (1975) *J. Bacteriol.* 123: 855-61.
- Cohen-Bazire, G. and Stanier, R.Y. (1958) *Nature* 181: 250-52.
- Cohen-Bazire, G. (1963) en : *Bacterial Photosynthesis* (H. Gest, A. San Pietro and L. Vernon, eds) pp: 89-114.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. and Stanier, R.Y. (1975) *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25-68.
- Crofts, A.R. and Jackson, J.B. (1970) en: *Electron Transport and Energy Conservation* (J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater, eds) pp: 383-408.
- Cruden, D.L.; Cohen-Bazire, G. and Stanier, R.Y. (1970) *Nature* 228: 1345.
- De Grooth, B.G. and Ames, J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 462: 247-58.

- Delaney, S.F.; Herdmann, M. and Carr, N.G. (1976) en: Genetic of the blue-green algae (Leroir, R.A, ed) pp: 7-28.
- del Valle-Tascón, S.; Giménez-Gallego, G. and Ramírez, J.M. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun. 66: 514.
- del Valle-Tascón, S. (1975) Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Univ.Complutense. Madrid.
- del Valle-Tascón, S.; van Grondelle, R. and Duysens, L.N.M. (1978) Biochim.Biophys.Acta 504: 26-39.
- Dutton, P.L. and Jackson, J.B. (1972) Eur.J.Biochem. 30: 495-510.
- Dutton, P.L.; Petty, K.M.; Bonner, H.S. and Morse, S.D. (1975) Biochim.Biophys.Acta 387: 536-56.
- Dutton, P.L.; Kaufmann, K.J.; Chance, B. and Rentzepis, P.M. (1975) FEBS Lett. 60: 275-80.
- Duysens, L.N.M. (1954) Nature 173: 692.
- Duysens, L.N.M. (1952) Ph.D.Thesis Univ. of Utrecht.
- Emerson, R. and Arnold, W. (1932) J.Gen.Physiol. 16: 191-205.
- Evans, H. and Crofts, A.R. (1974) Biochem.Biophys.Acta 357: 89-102.
- Feher, G.; Isaacson, R.A.; McElroy, J.D.; Ackerson, L.C. and Okamura, M.Y. (1974) Biochim.Biophys.Acta 368: 135.
- Feher, G. (1971) Photochem.Photobiol. 14: 373-87.
- Feick, R. and Drews, G. (1978) Biochim.Biophys.Acta 501: 499-513.
- Fenna, R.E. and Mathews, B.W. (1975) Nature (London) 258: 573.
- Fieldmann, N. and Gromet-Elhanan (1971) en: Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research (Forti, G., Avron, M. and Melandri, A. eds) pp: 1211-1220.
- Fleischmann, D.E. and Clayton, R.K. (1968) Photochem.Photobiol. Vol 8: 287-98.
- Fowler, C.F. and Sybesma, C. (1979) Biochim.Biophys.Acta 197: 276.
- Fraker, P.J. and Kaplan, S. (1971) J.Bacteriol. 108: 465.

- Geller, D.M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237: 2947.
- Giménez-Gallego, G. (1977) Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Univ. Autónoma. Madrid.
- Gingras, G. and Jolchine, G. (1969) en: *Progress in Photosynthetic Research* (H. Metzner, ed) Vol I, pp: 209-16.
- Gloe, A.; Pfennig, N.; Brockmann, H. and Trowitzsch, W. (1975) *Arch. Microbiol.* 102: 103.
- Goodwin, T.W. (1973) en: *Handbook of Microbiol.* Vol III (A.J. Laskin and H.A. Lechevalier, eds) pp: 75-83.
- Govindjee, R. and Sybesma, C. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 223: 251-60.
- Halsey, Y.D. and Parson, W.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 347: 404.
- Heathcote, P. and Clayton, R.K. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 459: 506-515.
- Higuti, T.; Erabi, T.; Kakumo, T. and Horio, T. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)* 78: 51.
- Holt, S.C.; Conti, S.F. and Fuller, R.C. (1966) *J. Bacteriol.* 91: 349-55.
- Ingledeu, W.I. and Ohnishi, T. (1975) *FEBS Lett.* 54: 167-71.
- Izawa, S., and Good, N.E. (1972) en: *Methods Enzymol.* 24: 355-77.
- Jackson, J.B. and Crofts, A.R. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18: 120-130.
- Jackson, J.B. and Dutton, P.L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325: 102-113.
- Jackson, J.B.; Crofts, A.R. and von Stedingk, L.V. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6: 41-54.
- Jackson, J.B. and Crofts, A.R. (1969) *FEBS Lett.* 4: 185-89.
- Jackson, J.B.; Saphon, S. and Witt, H.T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 408: 83-92.
- Jolchine, G., and Reiss-Husson, F. (1974) *FEBS Lett.* 40: 5-8.

- Katz, J.J.; Norris, J.R.; Shipman, L.L.; Thurnaner, M.C. and Wasielewski, M.R. (1978) *Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 393.
- Katz, J.J. and Norris, J.R. (1973) en: *Curr. Top. Bioenergetics* 5: 41.
- Kaufmann, K.J.; Dutton, P.L. Netzels, T.L.; Leigh, J.S. and Rentzepis, P.M. (1975) *Science*, Vol 188: 1301-04.
- Kaufmann, K.J. and Rentzepis, P.M. (1975) *Acc. Chem. Res.* 8: 407.
- Ke, B. and Ngo, E. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143: 319-31.
- Kihara, T. and Chance, B. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 189: 116-24.
- Kihara, T. (1970) *Biophys. Soc. Abst. TPM-GG*, 4th Annual Meeting, Baltimore.
- Krasinskaya, N.P. and Samuilov, V.D. (1977) *J. Bioenerg and Biomembranes* 9: 171-80.
- Lascelles, J. (1956) *Biochem. J.* 62: 78-93.
- Levine, R.P. (1969) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 513-40.
- Liaaen-Jensen, S. and Jensen, S. and Andrewes, A.G. (1972) *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 225.
- Liaaen-Jensen, S. and Jensen, A. (1971) en: *Methods Enzymol.* 23: 586.
- Lin, L. and Thornber, J.P. (1975) *Photochem. Photobiol.* 22: 34.
- Loach, P.A. and Hall, R.L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 786.
- Loach, P.A. and Sekura, D.L. (1968) *Biochem.* 7: 2642-49.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- McElroy, I.D., Manzarall, D.C. and Feher, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333: 261.
- McElroy, I.D., Feher, G. and Manzarall, D.C. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 267: 348-62.
- Mitchell, P. (1968) en: *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research. Badmin. England.
- Mitchell, P. (1963) *Nature (London)* 191: 144-48.

- Mitchell, P. (1966) en: Chemiosmotic Coupling in Oxidative Photophosphorylation. Glynn Research Publication. Bodmin.
- Morita, S. (1968) Biochim. Biophys. Acta 153: 241.
- Netzel, T.L.; Rentzepis, P.M. and Leigh, J.S. (1973) Science 182: 238-41.
- Nieth, K.E.; Drews, G. and Feick, R. (1975) Arch. Microbiol. 105: 43.
- Nishimura, M. and Chance, B. (1963) Biochim. Biophys. Acta 66: 1-16.
- Nishimura, M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 66: 17-21.
- Nishimura, M.; Roy, S.B.; Schleyer, H. and Chance, B. (1964) Biochim. Biophys. Acta 88: 251-66.
- Noel, H.; van der Rest, M and Gingras, G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 275: 219-30.
- Norris, J.R.; Uphaus, A.; Crepi, H.L. and Katz, J.J. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 625.
- Okamura, N.Y.; Steiner, L.A. and Feher, G. (1974) Biochemistry 13: 1394-402.
- Okamura, N.Y.; Isaacson, R.A. and Feher, G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 72, N° 9: 3491-95.
- Okamura, N.Y.; Ockerson, L.C.; Isaacson, R.A.; Parson, W.W. and Feher, G. (1976) Biophys. J. 16: 223a.
- Okayama, S.; Kakuno, T and Horio, T. (1970) J. Biochem. 68: 19-29.
- Olson, J.M.; Philipson, K.D. and Sauer, K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292: 206-17.
- Olson, J.M. (1970) Science 168: 438.
- Olson, J.M. and Stauton, E.K. (1966) en: The Chlorophylls (Vernon, L.P. and Seely, G.R., eds) pp: 381-98.
- Parson, W.W. (1969) Biochim. Biophys. Acta 189: 397-403.
- Parson, W.W. (1967) Biochim. Biophys. Acta 131: 154-72
- Parson, W.W.; Clayton, R.K. and Cogdell, R.J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387: 265-78.

- Parson, W.W. and Case, G.D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205: 232-45.
- Peters, G.A. and Cellarius, R.A. (1972) *Bioenergetics* 3: 345.
- Petty, K.M. and Dutton, P.L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 172: 346-53.
- Pfennig, N. and Truper, H.C. (1971) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21: 17.
- Pierson, B.K. and Castenholz, R.W. (1974) *Arch. Microbiol.* 100: 5.
- Prince, R.C. and Olson, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 423: 357-62.
- Prince, R.C.; Lindsay, J.G. and Dutton, P.L. (1975) *FEBS Lett.* 51: 108-111.
- Ramirez, J. and Smith, L. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153: 466-75.
- Reed, D.W. and Clayton, R.K. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 30: 471-75.
- Remsen, C.C.; Watson, S.W.; Waterbury, J.B. and Truper, H.G. (1968) *J. Bacteriol.* 95: 2374.
- Rieske, J.S.; Hansen, R.E. and Zaugg, W. (1964) *J. Biol. Chem.* 239: 3017-22.
- Rockley, M.G.; Windsor, M.W.; Cogdell, R.J. and Parson, W.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2251.
- Rubin, A.B. and Don Devault (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 501: 440-48.
- Saphon, S.; Jackson, J.B. and Witt, H.T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 408: 67-82.
- Sauer, K. and Austin, L.A. (1978) *Biochemistry*, Vol 17, N° 10: 2011-19.
- Sauer, K. (1975) en: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed) p.p. 115.
- Saunders, Y.A. (1978) *Microbiol. Rev.* Vol 42, N° 2: 357-84.
- Schachman, H.K.; Pardee, H.B. and Stanier, R.Y. (1952) *Arch. Biochem.* 38: 213-21.

- Seibert, M. and De Vault, D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205: 220-31.
- Sherman, L.A. and Clayton, R.K. (1972) *FEBS Lett.* Vol 22 N° 1: 127-32.
- Shuvalov, V.A.; Klevanik, A.V.; Sharkov, A.V.; Matweetz, Jn.A. and Krukov, P.G. (1978) *FEBS Lett.* Vol 91, N° 1: 135-139.
- Sistrom, W.R. and Clayton, R.K. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 88: 61-73.
- Sistrom, W.R. (1966) *Photochem. Photobiol.* 5: 845-56.
- Slater, E.C. (1971) *Ann. Rev. Biophys.* 4: 35-71.
- Slater, E.C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 301: 129-154.
- Smith, L.; Baltscheffsky, M. and Olson, J.M. (1960) *J. Biol. Chem.* 235: 213-18.
- Straley, S.C.; Parson, W.W.; Mauzerall, D.C. and Clayton, R.K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 305: 597-609.
- Sybesma, C. and Kok, B. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 180: 410-13.
- Sybesma, C. and Fowler, C.F. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 1343.
- Takamiya, K.I. and Dutton, P.L. (1977) *FEBS Lett.* Vol 80, N° 2: 279-84.
- Takamiya, K.I. and Nishimura, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 368: 339-47.
- Takamiya, K.I. and Nishimura, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 396: 93-103.
- Takemoto, J. and Lascelles, J. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163: 507-14.
- Vadeboncoeur, C. (1973) M.Sc. Thesis. Univ. Montréal. Montréal
- van Grondelle, R.; Duysens, L.N.M. and van der Wal, N.H. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449: 169-87.
- van Grondelle, R.; Duysens, L.N.M.; van der Wel, J.A. and van der Wal, N.H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 461: 188-201.

- Vermeaglio, A. and Clayton, R.K. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 461: 159-65.
- Vermeaglio, A. and Clayton, R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449: 500-15.
- Vernon, L.P. and Ke, B. (1966) en: *The Chlorophylls* (Vernon L.P. and Seely, eds) pp. 569-608.
- Vredenberg, W.J. and Duysens, L.N.M. (1963) *Nature (London)* 197: 355.
- Vredenberg, W.J.; Amesz, J. and Duysens, L.N.M. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 18: 435-39.
- Yamamoto, N.; Hatekeyama, H.; Nishikawa, K. and Horio, T. (1970) *J. Biochem.* 67: 587.
- Yen, H.C. and Marrs, B. (1976) *J. Bacteriol.* 126: 619.
- Yoch, D.C.; Carithers, R.P. and Arnon, D.I. (1977) *J. Biol. Chem.* Vol 252, N° 21: 7453-60.
- Wraight, C.A.; Leigh, J.S.; Dutton, P.L. and Clayton, R.K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333: 401.