



Universitat de Girona

ESTUDI DELS CAROTENOIDES EN ESPÈCIES MARRONS DE BACTERIS VERDS DEL SOFRE: DIVERSITAT, ECOFISIOLOGIA I REGULACIÓ

Noemí MALLORQUÍ FERNÁNDEZ

ISBN: 84-688-5455-7

Dipòsit legal: GI-109-2004

<http://hdl.handle.net/10803/7864>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Institut d'Ecologia Aquàtica

Estudi dels carotenoides en espècies
marrons de Bacteris Verds del Sofre:
Diversitat, eco-fisiologia i regulació.

Noemí Mallorquí Fernández
Girona, setembre del 2003



Universitat de Girona

Institut d'Ecologia Aquàtica

Estudi dels carotenoides en espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre: Diversitat, eco- fisiologia i regulació.

Memòria presentada per NOEMÍ MALLORQUÍ FERNÁNDEZ, inscrita en el programa de doctorat de Biotecnologia de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària, Campus Agroalimentari de Girona, Institut d'Ecologia Aquàtica, Departament de Biologia i Departament EQATA, per optar al grau de doctora en Biologia per la Universitat de Girona.

El present treball s'ha realitzat al laboratori de Microbiologia Molecular de l'Institut d'Ecologia Aquàtica de la Universitat de Girona sota la direcció dels Drs. Jesús Garcia-Gil i Carles Borrego Moré.

Vist i plau de,

Directors de tesi
Dr. Jesús Garcia-Gil i Dr. Carles Borrego

Autora
Noemí Mallorquí

Girona, setembre del 2003

A tots els que m'heu ajudat a construir la meua paraula sense decaure...

*Aturada ja la vida,
quiescent, vell i nafrat,
he sentit una gran crida
que a benaurança convida
per un camí no fressat.*

*Com és que m'he desvetllat
en una serra tan alta?
Tot el que miro m'exalta
i parlo com un orat.
Eixemplant la immensitat,
una àguila em sobrevola.
No tinc por de la rossola
ni de la nit feredat.
Qui és que aquí m'ha portat?*

*Adormit davant la taula
de la meua soledat,
m'hi ha portat la paraula.*

Joan Vinyoli
Vers i prosa
L'Estel, Tres i Quatre,
València, 1990

...però especialment als meus pares i a les meves *twins*, Goretti i Tiki

Moltes vegades he pensat en aquest moment, i tot i que em semblava que mai hi arribaria, ara ja hi sóc! Sou molts, moltíssims, els que m'heu ajudat al llarg d'aquests anys de tesi, i tots us mereixeu més espai i temps!!! De tot me'n falta! Moltes gràcies a tots!!!...per vosaltres només tinc paraules d'agraïment:

Als meus directors de tesi els he d'agrair la seva supervisió i suport. Gràcies Jesús per l'oportunitat de formar part d'aquest grup. A tu, Bo, t'he d'agrair tantes coses que no sé per on començar. Gràcies per ser-hi sempre i per suportar-me fins i tot en la distància. Gràcies també per transmetre'm la confiança que a vegades m'ha calgut per tirar endavant...gràcies per cuidar-me!

A tots els micros (Carles, Xavi Vila, Catxo, Geno, Gemma i Joan) i ex-micros dir-vos que sense vosaltres això no hagués estat el mateix. Gràcies per la vostra amistat, sou molt més que companys de feina, sobretot vosaltres, micros de Dalt...Laia, Marta, Triadó i Marga, moltes gràcies per fer-me sentir tan bé entre vosaltres, gràcies per deixar-me compartir amb vosaltres les meves cabòries i mals de cap. Gràcies Xavi Fuentes per seguir amb els crt's quan jo no hi era.

Dels ex-micro també me'n recordo, sobretodo de ti, Juan, que siempre aguantas pacientemente mis dudas y has estado a mi lado en Girona y en Salamanca. A tu, Gich, t'agraeixo molt els ànims en la distància i les hores compartides a espais comuns. Contigo, Rémy, los experimentos de fisiología son mucho más amenos. I sense tu, Javi, els mostratges al Vilar no haguessin estat el mateix.

Se'ns dubte, però, el millor d'aquests anys, a banda de la satisfacció personal d'haver aconseguit doctorar-me, han estat els grans amics que he fet al Pollo! Amics que m'heu ajudat a tirar sempre endavant, a no abandonar en cap moment i a no decaure en els moments difícils.

Gràcies Coffee Girls per fer-me sentir tan estimada....amb vosaltres he passat estones tan fantàstiques que mai oblidaré!!!

Maria, pels teus somriures

n**O**e, per ser tan dolça

Lluís, per la teva tendresa

mar**T**a, per saber com sóc. Ets la twin que fa 3!!!

p**E**p, per les bones estones prop d'un cafè

gi**S**, per la teva bondat

Gorette, per ser com ets i ser-hi sempre

ma**R**ga, per fer-me sentir la teva germana gran

Aнна, per precedir-me i ser un exemple a seguir

vi**C**enç, per estar sempre disposat a ajudar

glor**I**a, per la teva alegria i optimisme

x**E**vi, pel bon rotllo

Sílvia, per ser el clip bioquímic



En aquests moments tampoc puc oblidar-me del grup danès encapçalat per la Dra. Mette Miller. Moltes gràcies foto group per acceptar-me al vostre laboratori! Entre vosaltres, malgrat les diferències, em vaig sentir com una danesa més!

I a la penya de York els dec, no només la seva paciència i ajut al laboratori, sinó també les farres i ganes de gresca! Gràcies a tots, autòctons i forans, pel vostre acolliment.

Als amics de fora el Pollo us he d'agrair les estones tan fantàstiques i genials que hem compartit i el fet d'entendre'm i recolzar-me sense estar dins aquest mundillo. Gràcies Marta Farró, Rosa, família Llenas Elias, nyenyas bio., Nicolau, M^a Àngels, Xavier i Anna, per preocupar-vos de mi. Gràcies Alba, Ruth, Toño i Reynaldo per formar part de la meva vida malgrat els quilòmetres que ens separen. I moltes gràcies Dr. Pla, Marina Paretas i Carme Sunyol per ajudar-me a no prescindir mai de la nostra inseparable i inesgotable amiga.

Finalment, pels meus pares, per a la meva germana i para Mamina són les darreres paraules. Joan, Jose, Goretti, sense vosaltres si que res de tot això hagués estat possible. Gràcies per ser-hi sempre i saber en tot moment com em sento. Gràcies per ser com sou, per entendre'm, per escoltar-me, per estimar-me i confiar en mi més del que jo mateixa confio. Gràcies per tot. Aquesta tesi és se'ns dubte també vostra. No canvieu mai. Us estimo. La vostra Noemi.

Acrònims i abreviatures

Acrònims

APCI-LC/MS/MS: *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

FAPB: *Filamentous Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*

GSB: *Green Sulfur Bacteria*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IPA: *Ion Pairing Agent*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PSB: *Purple Sulfur Bacteria*

Abreviatures

AcNH₄⁺: Acetat d'amoni

AcEt: Acetat d'etil

AcNt: Acetonitril

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ARN: Àcid ribonucleic

BCI: Bacterioclorofil·la

BCI_{eF}: Bacterioclorofil·la *e* esterificada amb farnesil

BCIs: Bacterioclorofil·les

BCIda: Bacterioclorofil·lida

BCIds: Bacterioclorofil·lides

BPhe *e*: Bacteriofeofitina *e*

BPheb *e*: Bacteriofeoforbida *e*

b-Car: beta-Carotè

b-Isr: beta-Isorenieratè

Car: Carotenoides

CR: Centre/s de reacció

Chl: *Chlorobium*

Cbt: Clorobactè

Cl: Clorofil·la

ClS: Clorofil·les

dNTPs: trifosfat de desoxi-nucleòtids

DO: densitat òptica

DCM: Diclorometà

E: Etil

[E,E] BCI_{eF}: 8-etil,12-etil bacterioclorofil·la *e* esterificada amb farnesil

F: Farnesil

PS: Fotosistema

FMO: proteïna Fenna-Matthews-Olson

OH-Cbt: hidroxil-clorobactè

I: Isobutil

Isr: Isorenieratè

l: Longitud d'ona

l_{màx}: Longitud d'ona corresponent a la màxima absorció del pigment

MeOH: Metanol

Mètode EP: mètode HPLC per a extractes pre-purificats

Mètode NP: mètode HPLC per a extractes no pre-purificats

μmols m⁻² s⁻¹ = μmols fotons m⁻² s⁻¹

N: neo-Pentil

Nrp: Neurosporè

Okn: Okenona

pb: parell de bases

Pr: Propil

t_R: Temps de retenció

THF: Tetrahidrofurà

TEA: Trietilamina

Resum

El present treball es centra en l'estudi a diferents nivells dels carotenoides de les espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*). L'objectiu global ha estat el d'esbrinar quina és la funció d'aquests pigments dins l'aparell fotosintètic d'aquests microorganismes i aprofundir en el coneixement de la seva estructura i interaccions amb els altres pigments de l'aparell fotosintètic.

En primer lloc es va dissenyar un nou mètode de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) per analitzar de manera més ràpida i precisa els carotenoides de diferents soques de GSB (Capítol 3). Aquest mètode es basa en una purificació prèvia dels extractes pigmentaris amb columnes d'alúmina per eliminar les bacteriocrofil·les (BCls). Això va permetre analitzar amb una elevada resolució i en tan sols 45 min de carrera cromatogràfica els diferents carotenoides i els seus precursors, així com les configuracions *trans* i *cis* dels seus isòmers. El segon mètode utilitzat va consistir en una modificació del mètode de Borrego i Garcia-Gil (1994) i va permetre la separació precisa de tot tipus de pigments, procedents tant de cultius purs com de mostres de caràcter complex. Un exemple concret foren uns paleosediments de la zona lacustre de Banyoles. En aquests sediments (0,7–1,5 milions d'anys d'antiguitat) es van detectar, entre d'altres pigments, carotenoides específics de les espècies marrons de GSB, la qual cosa va permetre confirmar la presència d'aquests bacteris a la zona lacustre de Banyoles ja des del Pleistocè inferior.

En aquest primer capítol també es van analitzar els carotenoides de *Chlorobium (Chl.) phaeobacteroides* CL1401 mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS/MS), amb l'objectiu de confirmar la seva identificació i el seu pes molecular. A més, també es va avaluar l'efecte de la temperatura, la llum i diferents agents oxidants i reductors en la composició quantitativa i qualitativa dels carotenoides i les BCl d'aquesta espècie. Això va permetre confirmar el caràcter fotosensible de les BCl i que els isòmers *trans/cis* dels diferents carotenoides no són artefactes produïts durant la manipulació de les mostres, sinó que són constitutius de l'aparell fotosintètic d'aquests microorganismes.

El Capítol 4 inclou els experiments de fisiologia duts a terme amb algunes espècies de GSB, a partir dels quals es va intentar esbrinar la dinàmica de síntesi dels diferents pigments de l'aparell fotosintètic (BCl antena, BCl *a* i carotenoides) durant el creixement d'aquestes espècies. Aquestes investigacions van permetre monitoritzar també els canvis en el nombre de centres de reacció (CR) durant el procés d'adaptació lumínica. La determinació experimental del nombre de CR es va realitzar a partir de la quantificació de la BCl₆₆₃, l'acceptor primari en la cadena de transport d'electrons dels GSB. L'estimació del nombre de CR/clorosoma es va realitzar tant a partir de dades estequiomètriques i biomètriques presents a la bibliografia, com a partir de les dades experimentals obtingudes en el present treball. El bon ajust obtingut entre les diferents estimacions

va donar solidesa al valor estequiomètric calculat, que fou, com a promig, d'uns 70 CR per clorosoma.

En aquest capítol de fisiologia també es van estudiar les variacions en les relacions *trans/cis* pels principals carotenoides de les espècies marrons de GSB. Aquestes es van determinar a partir de cultius purs de laboratori i de poblacions naturals de GSB. Pel que fa als valors trobats en cultius de laboratori no es van observar diferències destacades entre el valor calculat a alta intensitat de llum i el calculat a baixa intensitat, essent en ambdós casos proper a 2. En els clorosomes aïllats de diferents soques marrons aquest quocient prengué un valor similar tant pels isòmers de l'isorenieratè (Isr) com pels del β -isorenieratè (β -Isr). En poblacions naturals de *Chl. phaeobacteroides* aquesta relació va ser també de 2 isòmers *trans* per cada isòmer *cis*, mantenint-se constant tant en fondària com al llarg del temps.

Finalment, en el Capítol 5 es presenta un marcador molecular que permet la identificació específica d'espècies marrons de GSB. Malgrat que inicialment aquest marcador fou dissenyat a partir d'un gen implicat en la síntesi de carotenoides (*crtY*, el qual codifica per a una licopè ciclase) la seqüència final a partir de la qual s'han aconseguit els encebadors selectius està relacionada amb la família de proteïnes de les Policètid-ceto-sintases (PKT). Tot i així, l'eina dissenyada pot ser de gran utilitat per a la discriminació d'espècies marrons de GSB respecte les verdes en poblacions mixtes com les que es troben en ambients naturals i obre la porta a futurs experiments d'ecologia microbiana utilitzant tècniques com la PCR en temps real, que permetria la monitorització selectiva de les poblacions d'espècies marrons de GSB en ecosistemes naturals.

Resumen

El presente trabajo se centra en el estudio a partir de distintos niveles de los carotenoides de las especies marrones de Bacterias Verdes del Azufre (GSB, del inglés *Green Sulfur Bacteria*). El objetivo global ha sido el de averiguar cual es la función de estos pigmentos en estos microorganismos así como ampliar los conocimientos de su estructura y interacciones con los otros pigmentos del aparato fotosintético.

En primer lugar se diseñó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para analizar de forma más precisa y rápida los carotenoides de distintas cepas de GSB (Capítulo 3). Este método se caracteriza por una purificación previa de los extractos pigmentarios mediante columnas de alúmina para eliminar las bacterioclorofilas (BCIs). Esto permitió analizar con una elevada resolución y en tan sólo 45 min de carrera cromatográfica los distintos carotenoides y sus precursores, así como las configuraciones *trans* y *cis* de sus isómeros. El segundo de los métodos utilizado consistió en una modificación del método de Borrego y Garcia-Gil (1994) y permitió la separación precisa de todo tipo de pigmentos, procedentes tanto de cultivos puros como de muestras de carácter complejo. Un ejemplo concreto fueron los sedimentos antiguos de la zona lacustre de Banyoles. En estos sedimentos (0,7–1,5 millones de años de antigüedad) se detectaron, entre otros pigmentos, carotenoides específicos de las especies marrones de GSB, lo que permitió confirmar la presencia de estas bacterias en la zona lacustre de Banyoles ya des del Pleistoceno inferior.

En este primer capítulo también se analizaron los carotenoides de *Chlorobium (Chl.) phaeobacteroides* CL1401 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), con el objetivo de confirmar su identificación y su peso molecular. Además, también se analizó el efecto de la temperatura, la luz y distintos agentes oxidantes y reductores sobre la composición cuantitativa y cualitativa de los carotenoides y las BCIs de esta especie. Estos experimentos permitieron confirmar el carácter fotosensible de las BCIs y que los isómeros *trans/cis* de los distintos carotenoides no son artefactos producidos durante la manipulación de las muestras sino que son constitutivos del aparato fotosintético de estos microorganismos.

El Capítulo 4 incluye los experimentos de fisiología realizados con algunas especies de GSB, centrados en elucidar los mecanismos en la dinámica de síntesis de los distintos pigmentos (BCI antena, BCI *a* i carotenoides) durante el crecimiento de estas especies. Estas investigaciones permitieron monitorizar también las variaciones en el número de CR durante el proceso de adaptación lumínica. A partir de la cuantificación de la BCl₆₆₃, el aceptor primario en la cadena de transporte de electrones en GSB, se calculó el número de CR. La estimación de la relación CR/clorosoma se llevó a cabo, primero a partir de datos estequiométricos y biométricos presentes en la bibliografía, y luego a partir de los datos experimentales de este trabajo. El buen ajuste entre

las distintas estimaciones dio solidez al valor estequiométrico calculado, el cual fue, como promedio, de unos 70 CR por clorosoma.

En este capítulo de fisiología también se estudiaron las variaciones en las relaciones *trans/cis* entre los principales carotenoides de las especies marrones de GSB. Estas se determinaron a partir de cultivos puros de laboratorio y a partir de poblaciones naturales de GSB. Las relaciones calculadas para los cultivos no presentaron diferencias destacadas en función de las condiciones de iluminación de estos. En las dos condiciones estudiadas, alta y baja intensidad de luz, el valor de la relación *trans/cis* fue aproximadamente de 2. En clorosomas aislados de distintas cepas marrones de GSB la relación también fue aproximadamente de 2, tanto para el isorenierateno (Isr) como para el β -isorenierateno (β -Isr). En poblaciones naturales de *Chl. phaeobacteroides* esta relación fue también de 2 isómeros *trans* por cada isómero *cis*, manteniéndose constante tanto en profundidad como a lo largo del tiempo.

Finalmente, en el Capítulo 5 se presenta un marcador molecular que permitió la identificación específica de especies marrones de GSB. A pesar que su diseño inicial fue a partir de un gen implicado en la síntesis de carotenoides (*crtY*, que codifica para una licopeno ciclasa) la secuencia final a partir de la cual se han obtenido los cebadores selectivos está relacionada con la familia de proteínas de las Policétido-ceto-sintasas (PKT). A pesar de todo, la nueva herramienta puede ser de gran utilidad para la discriminación de especies marrones de GSB respecto a las verdes en poblaciones mixtas como las que se encuentran en ambientes naturales y abre las puertas a futuros experimentos de ecología microbiana utilizando técnicas como la PCR en tiempo real, que permitiría la monitorización selectiva de las poblaciones de especies marrones de GSB en ecosistemas naturales.

Summary

This study is focused on the composition, distribution and function of carotenoids in the photosynthetic antenna of brown-coloured species of Green Sulfur Bacteria (GSB).

The first part of the work has focused on the development of two different reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) methods to study the diversity of carotenoids from different species of GSB (Chapter 3). We also introduced a pre-treatment of samples that provides a better resolution on the separation of all carotenoids including the all-*trans* and *cis* isomers, in a run time of 45 min. For complex pigment samples, such as untreated extracts or sediment pigment samples where a high diversity of pigments is suspected, we modified an existing method (Borrego and Garcia-Gil, 1994) to achieve the complete separation of all carotenoids as well as all the different bacteriochlorophylls (BChls) homologues and algal pigments. This modification was successfully applied for the detection and identification of pigments in ancient sediments (0.7–1.5 million years-old) from a quarry located in the lacustrine area of Banyoles. The detection of signature pigments for brown-coloured GSB confirmed the presence of GSB in the lacustrine area of Banyoles at least since mid-Pleistocene.

In this first part we also analyzed the carotenoids from *Chlorobium (Chl) phaeobacteroides* CL1401 by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) to confirm their identification and determine their molecular mass. Besides, several experiments were done to evaluate the effect of temperature, light and different oxidising and reducing chemical agents in the quantitative and qualitative composition of carotenoids and BCIs in *Chl. phaeobacteroides* CL1401. These results confirmed that BCIs are easily photodamaged and that the all-*trans* and *cis* isomers are constitutive components of the photosynthetic apparatus of GSB and then they are not artefacts produced during sample manipulation.

Chapter 4 compiles a series of experiments carried out to elucidate the dynamics of pigment synthesis during growth of several species of GSB under different light conditions. Also these investigations allowed us to monitor the changes in the number of reaction centers (RC) during the light adaptation process. The number of RC was determined from the chromatographic quantification of BChl₆₆₃, the primary acceptor in the electron transport chain in GSB. The estimation of RC per chlorosome was done according to both previous pigment stoichiometries and biometric values and from the experimental data obtained in this work. An average value of 70 RC per chlorosome was obtained. This value agrees with current models of pigment composition in the photosynthetic apparatus of GSB.

In this chapter the study of the evolution of *trans/cis* ratios for the main carotenoids in GSB during light adaptation is also included. This ratio was calculated for different strains and chlorosomes of

VIII

GSB and also from natural populations of *Chl. phaeobacteroides* thriving in a meromictic lake. No differences were found for the *trans/cis* ratio between cultures grown at saturating and limiting light conditions (*trans/cis* ratio of 2). Furthermore, similar values were found in isolated chlorosomes of different brown-coloured strains of GSB and in natural populations. In this case the *trans/cis* ratio remained fairly constant throughout the water column and also along the studied growth period of the population.

Finally, in Chapter 5 we present a new molecular marker for the specific detection of brown-species of GSB. Although the designed primers originally targeted a gene involved in the biosynthetic pathway of carotenoids (*CrtY* that encodes a lycopene cyclase), final sequence retrieved matches with a gene related to the Polyketide ketosynthases protein family. The precise function of this protein in GSB remains hitherto unknown. However, the availability of this molecular tool opens the door for future investigations on the microbial ecology of brown-coloured species of GSB using techniques as Real-time PCR to selectively monitor populations of these microorganisms in their natural habitats.

Llistat de Taules

Capítol 1. Introducció

Taula 1.1. Característiques dels Bacteris Verds del Sofre	7
Taula 1.2. Principals característiques de les bacterioclороfil·les	9
Taula 1.3. Carotenoides dels bacteris fotosintètics	13

Capítol 2. Material i Mètodes

Taula 2.1. Soques de bacteris fotosintètics del sofre utilitzades durant l'estudi.....	20
Taula 2.2. Coeficients d'extinció molar de pigments fotosintètics	29
Taula 2.3. Principals productes de degradació de la bacterioclороfil·la <i>e</i>	36
Taula 2.4. Agents oxidants i reductors emprats en aquest treball.....	38
Taula 2.5. Composició dels gels de DGGE	54
Taula 2.6. Soques font utilitzades pel disseny d'encebadors degenerats pel gen <i>crtY</i>	56
Taula 2.7. Encebadors emprats per a l'amplificació d'inserts al vector p-GEM	59

Capítol 3. Mètodes d'aïllament i caracterització dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre

Taula 3.1. Contribució dels grups funcionals a la $\lambda_{\text{màx}}$ dels carotenoides	67
Taula 3.2. Mètodes de HPLC fase reversa per la separació de carotenoides.....	71
Taula 3.3. Temps de retenció pels diferents pigments identificats amb els mètodes de HPLC desenvolupats.....	78
Taula 3.4. Pes molecular dels principals carotenoides de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401.....	91
Taula 3.5. Relacions <i>trans/cis</i> dels carotenoides d'un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 després de 12 h a $80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i després de 12 h a les fosques	101
Taula 3.6. Percentatge de pèrdues de bacterioclороfil·les i carotenoides després de mantenir 2 h i a les fosques un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 amb agents oxidants i reductors.....	103
Taula 3.7. Relacions <i>trans/cis</i> dels carotenoides d'un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 després de mantenir-lo 2 h a les fosques amb agents oxidants i reductors.....	104
Taula 3.8. Percentatge de pèrdues de bacterioclороfil·les i carotenoides després de mantenir 2 h i a $80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 amb agents oxidants i reductors.....	106
Taula 3.9. Relacions <i>trans/cis</i> dels carotenoides d'un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 després de mantenir-lo 2 h a $80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ amb agents oxidants i reductors	106
Taula 3.10. Composició i temps de retenció pels grups de carotenoides identificats als sediments estudiats	109
Taula 3.11. Temps de retenció de la BCl <i>e</i> i derivats identificats als sediments.....	113
Taula 3.12. Percentatge dels principals carotenoides dels bacteris verds del sofre estudiats	116

Capítol 4. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica

Taula 4.1. Relacions molars entre els pigments fotosintètics de dues soques de <i>Chl. phaeobacteroides</i>	135
Taula 4.2. Relacions molars entre els pigments fotosintètics de dues espècies verdes de Bacteris Verds del Sofre	137
Taula 4.3. Relacions molars entre els isòmers dels carotenoides d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre	140
Taula 4.4. Relacions molars entre els isòmers dels carotenoides d'espècies verdes de Bacteris Verds del Sofre	140
Taula 4.5. Nombre específic de centres de reacció a diferents soques de Bacteris Verds del Sofre	148
Taula 4.6. Relacions molars entre els diferents pigments fotosintètics i els centres de reacció a dues soques de <i>Chl. phaeobacteroides</i>	149
Taula 4.7. Relacions molars entre els diferents pigments fotosintètics i els centres de reacció a dues espècies verdes de Bacteris Verds del Sofre	149
Taula 4.8. Percentatge de cada carotè als clorosomes de tres soques marrons de Bacteris Verds del Sofre	157
Taula 4.9. Relacions molars <i>trans/cis</i> per a l'Isr a les mostres de camp	165
Taula 4.10. Relacions molars <i>trans/cis</i> pel β -Isr a les mostres de camp	165
Taula 4.11. Proporció Isr/ β -Isr a les mostres de camp	166
Taula 4.12. Proporció BCl <i>e</i> /Car a les mostres de camp	167
Taula 4.13. Relacions molars entre els carotenoides i la BCl <i>a</i> de la làmina basal.....	170
Taula 4.14. Mesures biomètriques del clorosoma	176
Taula 4.15. Relacions CR/clorosoma calculades a partir de dades teòriques.....	178
Taula 4.16. Estimació experimental de la relació CR/clorosoma a $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	180
Taula 4.17. Estimació experimental de la relació CR/clorosoma a $1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	180
Taula 4.18. Comparació de relacions entre pigments per a mostres de camp i de laboratori	186

Capítol 5. Disseny d'un marcador molecular per a la detecció específica de Bacteris Verds del Sofre de coloració marró

Taula 5.1. Encebadors degenerats per a l'amplificació del gen <i>crtY</i>	199
Taula 5.2. Encebadors específics per a l'amplificació del gen <i>crtY</i>	203

Llistat de Figures

Capítol 1. Introducció

Figura 1.1. Arbre filogenètic dels principals regnes bacterians.....	4
Figura 1.2. Esquema de l'estructura de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre	8
Figura 1.3. Models d'empaquetament de les molècules de bacterioclороfil·la	10
Figura 1.4. Estructura química de les bacterioclороfil·les.....	11

Capítol 2. Material i Mètodes

Figura 2.1. Espectre d'absorció d'una fracció clorosòmica pura.....	24
Figura 2.2. Programes dels gradients dels mètode d'HPLC emprats en el treball.....	27
Figura 2.3. Localització de la bòbila de can Ordis	32
Figura 2.4. Sediments de la bòbila de can Ordis	34
Figura 2.5. Mètode d'HPLC fase reversa per l'anàlisi de BCl <i>e</i> i derivats.....	35
Figura 2.6. Mapa batimètric del Vilar	41
Figura 2.7. Sistema de mostratge utilitzat.....	42

Capítol 3. Mètodes d'aïllament i caracterització dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre

Figura 3.1. Estructura química del fitoè.....	66
Figura 3.2. Estructura fina d'un carotenoide tipus.....	68
Figura 3.3. Estructura química dels principals carotenoides dels Bacteris Verds del Sofre	69
Figura 3.4. Cromatograma pigments de <i>Chl. limicola</i>	79
Figura 3.5. Espectre d'absorció del Clorobactè.....	80
Figura 3.6. Cromatograma pigments de <i>Chl. vibrioforme f. thiosulfatophilum</i>	81
Figura 3.7. Cromatograma pigments de <i>Chl. tepidum</i>	82
Figura 3.8. Cromatograma pigments de <i>Pelodictyon clathratiforme</i>	83
Figura 3.9. Cromatograma pigments de <i>Chl. phaeobacteroides</i>	84
Figura 3.10. Espectre d'absorció de l'Isorenieratè.....	85
Figura 3.11. Cromatograma pigments de <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	86
Figura 3.12. Espectre d'absorció de l'Okenona.....	87
Figura 3.13. Cromatograma d'un extracte de carotenoides de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401.....	90
Figura 3.14. Espectre de masses del all- <i>trans</i> Isorenieratè	92
Figura 3.15. Espectre de masses del 15- <i>cis</i> Isorenieratè	93
Figura 3.16. Espectre de masses del all- <i>trans</i> β-Isorenieratè	94
Figura 3.17. Espectre de masses del 15- <i>cis</i> β-Isorenieratè	95
Figura 3.18. Espectre de masses del all- <i>trans</i> β-Carotè	96
Figura 3.19. Espectre de masses del 15- <i>cis</i> β-Carotè	97
Figura 3.20. Concentració de pigments després d'exposar un extracte de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 12 h a una intensitat lumínica de 80 μmols m ⁻² s ⁻¹	100

Figura 3.21. Concentració de pigments després d'exposar un extracte de <i>Chl.phaeobacteroides</i> CL1401 a condicions de foscor durant 12 h.....	100
Figura 3.22. Relacions molars <i>trans/cis</i> dels carotenoides durant l'exposició d'un extracte de <i>Chl.phaeobacteroides</i> CL1401 a 80 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i a condicions de foscor durant 12 h.....	102
Figura 3.23. Concentració de pigments després de mantenir un extracte de <i>Chl.phaeobacteroides</i> CL1401, durant 12 h, amb una concentració de ditionit sòdic 10 mM	105
Figura 3.24. Concentració de pigments després de mantenir extractes de <i>Chl.phaeobacteroides</i> CL1401, durant 2 h, amb diferents concentracions de ditionit sòdic.....	105
Figura 3.25. Cromatograma de l'extracte dels sediments de la bòbila Ordís	108
Figura 3.26. Espectre d'absorció de l'Auroxantina i altres xantofil·les d'origen algal.....	110
Figura 3.27. Espectre d'absorció dels principals carotenoides dels Bacteris Verds del Sofre	111
Figura 3.28. Cromatograma de la BCl <i>e</i> i derivats detectats als sediments estudiats.....	112
Figura 3.29. Espectre d'absorció de la BCl <i>e</i> i derivats detectats als sediments estudiats.....	113

Capítol 4. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica

Figura 4.1. Esquema de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre	131
Figura 4.2. Corbes de creixement de les espècies de Bacteris Verds del Sofre estudiades.....	133
Figura 4.3. Contingut específic de pigments de les dues soques de <i>Chl. phaeobacteroides</i> estudiades.....	134
Figura 4.4. Contingut específic de pigments de les dues espècies verdes estudiades	136
Figura 4.5. Contingut relatiu dels homòlegs farnesils de les bacterioclorofil·les	138
Figura 4.6. Relacions entre la bacterioclorofil·la <i>e</i> i els carotenoides a <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401	142
Figura 4.7. Relacions entre la bacterioclorofil·la <i>e</i> i els carotenoides a <i>Chl. phaeobacteroides</i> UdG6030	143
Figura 4.8. Relacions entre la bacterioclorofil·la <i>c</i> i els carotenoides a <i>Chl. limicola</i> UdG6038	144
Figura 4.9. Relacions entre la bacterioclorofil·la <i>c</i> i els carotenoides a <i>Prosthecochloris aestuarii</i> CE2404	145
Figura 4.10. Espectre d'absorció de la BCl ₆₆₃	147
Figura 4.11. Fraccions dels gradients de sacarosa.....	150
Figura 4.12. Espectres d'absorció, concentració de pigments i relacions molars per les fraccions dels clorosomes de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401	152
Figura 4.13. Espectres d'absorció, concentració de pigments i relacions molars per les fraccions dels clorosomes de <i>Chl. phaeobacteroides</i> 2430 ^T	153
Figura 4.14. Espectres d'absorció, concentració de pigments i relacions molars per les fraccions dels clorosomes de <i>Chl. phaeobacteroides</i> 2631 ^T	154
Figura 4.15. Fraccions de clorosomes purs mitjançant gradients de flotació	156
Figura 4.16. Perfil vertical dels paràmetres fisico-químics al Vilar.....	159
Figura 4.17. Perfil vertical dels pigments fotosintètics al Vilar.....	160
Figura 4.18. Perfil vertical de la concentració de Bacteris Verds del Sofre i del contingut específic de bacterioclorofil·la <i>e</i> i dels carotenoides d'aquest grup bacterià	161
Figura 4.19. Perfil vertical de la concentració de Bacteris Vermells del Sofre	163
Figura 4.20. Concentració de Bacteris Verds i Vermells del Sofre al Vilar durant el període estudiat.....	164
Figura 4.21. Ruta de síntesi predita per les molècules de bacterioclorofil·la a <i>Chl. tepidum</i>	171
Figura 4.22. Esquema àrea superficial d'un clorosoma tipus.....	176
Figura 4.23. Projectió amb STEM del complex CR + FMO.....	177
Figura 4.24. Reconstrucció en 3D de la unitat funcional 1CR + 2FMO.....	178

Figura 4.25. Paràmetres per calcular l'àrea superficial d'una cèl·lula de <i>Chlorobium</i>	182
Figura 4.26. Abundàncies relatives de la BCl <i>e</i> i els Car a poblacions naturals i a cultius d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre	188

Capítol 5. Disseny d'un marcador molecular per a la detecció específica de Bacteris Verds del Sofre de coloració marró

Figura 5.1. Ruta de síntesi dels carotenoids	191
Figura 5.2. Gens implicats en la biosíntesi de carotenoides a <i>Rhodobacter capsulatus</i>	193
Figura 5.3. Ruta de síntesi dels carotenoides als Bacteris Verds del Sofre	194
Figura 5.4. Alineament de les seqüències d'aminoàcids de les soques font emprades pel disseny d'encebadors degenerats	198
Figura 5.5. Productes de PCR obtinguts per les soques font amb els encebadors degenerats	200
Figura 5.6. Productes de PCR obtinguts per les soques de Bacteris Verds del Sofre amb els encebadors degenerats	201
Figura 5.7. Productes de PCR clonats al p-GEM	202
Figura 5.8. Clon de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 utilitzat pel disseny dels encebadors PKT.....	203
Figura 5.9. Seqüències d'aminoàcids del clon de <i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401 utilitzada pel disseny dels encebadors PKT	203
Figura 5.10. Amplificacions obtingudes amb els encebadors específics	204
Figura 5.11. Amplificacions obtingudes amb els encebadors específics amb cua GC	205
Figura 5.12. DGGE de les mostres prèviament amplificades amb els encebadors PKT	206
Figura 5.13. Seqüències de nucleòtids amb major homologia amb la seqüència consens estudiada.....	207
Figura 5.14. Seqüències d'aminoàcids amb major homologia amb la seqüència consens estudiada.....	208
Figura 5.15. Alineament entre la seqüència del clon emprada pel disseny dels encebadors PKT i la seqüència consens_PKT.....	210
Figura 5.16. Disseny sonda <i>Taqman</i>	211

Contingut

1. Introducció

1.1. Els bacteris fotosintètics	3
1.1.1. <u>Els Bacteris Vermells</u>	5
1.1.2. <u>Els Bacteris Verds</u>	5
1.2. Estructura i organització de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre	6
1.2.1. <u>Complex antena: els clorosomes</u>	6
1.2.1.1. <i>Composició dels clorosomes</i>	8
1.2.2. <u>Pigments fotosintètics als Bacteris Verds del Sofre</u>	9
1.2.2.1. <i>Bacterioclороfil·les</i>	9
1.2.2.2. <i>Carotenoides</i>	12
1.2.3. <u>Proteïnes</u>	14
1.2.4. <u>Centres de Reacció</u>	15
1.3. Objectius i estructura de la tesi	16

2. Material i Mètodes

2.1. Equipament i reactius	19
2.1.1. <u>Equipament</u>	19
2.1.2. <u>Reactius</u>	20
2.2. Mètodes d'aïllament i cultiu de Bacteris Verds del Sofre	20
2.2.1. <u>Preparació de medi mineral Pfennig</u>	21
2.3. Aïllament i anàlisi de clorosomes	23
2.4. Anàlisi per cromatografia líquida d'alta resolució: Instrumental i metodologia	25
2.4.1. <u>Extracció de pigments fotosintètics</u>	25
2.4.2. <u>Instrumental de la cromatografia líquida d'alta resolució i mètodes analítics</u>	25
2.4.3. <u>Anàlisi qualitativa i quantitativa de les mostres</u>	28
2.4.4. <u>Pre-purificació de carotenoides bacterians amb columnes d'alúmina</u>	29
2.4.4.1. <i>Pre-purificació per separació de fases</i>	30
2.4.4.2. <i>Preparació de les columnes d'alúmina</i>	31
2.4.5. <u>Anàlisi de pigments en sediments lacustres antics</u>	32
2.4.5.1. <i>Zona d'estudi</i>	32
2.4.5.2. <i>Mostratge i caracterització de les mostres</i>	33
2.4.5.3. <i>Extracció dels pigments</i>	33
2.4.5.4. <i>Obtenció d'estàndards externs per a la identificació dels derivats de bacterioclороfil·la e</i>	35

2.5. Identificació dels carotenoides de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> CL1401 per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses.....	37
2.6. Variacions en les relacions molars <i>trans/cis</i> dels carotenoides de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> CL1401 sota diferents condicions d'il·luminació i potencial redox	37
2.7. Disseny experimental i processament de les mostres pels experiments d'adaptació lumínica.....	39
2.7.1. <u>Presa de mostres</u>	39
2.7.2. <u>Processament de les mostres</u>	40
2.7.2.1. <i>Determinació de la concentració de proteïnes</i>	40
2.8. Mètodes de Camp.....	41
2.8.1. <u>Zona d'estudi</u>	41
2.8.2. <u>Mostratge</u>	42
2.8.3. <u>Anàlisis químiques</u>	43
2.8.4. <u>Anàlisis biològiques</u>	43
2.8.4.1. <i>Extracció i anàlisis de pigments</i>	43
2.8.4.2. <i>Recompte de poblacions de bacteris fotosintètics mitjançant citometria de flux</i>	44
2.9. Mètodes de biologia molecular	46
2.9.1. <u>Extracció d'ADN genòmic a partir d'un cultiu bacterià</u>	46
2.9.2. <u>Neteja i purificació d'ADN</u>	48
2.9.2.1. <i>Precipitació amb etanol</i>	48
2.9.2.2. <i>Recuperació de bandes d'ADN de gels d'agarosa</i>	49
2.9.2.3. <i>Neteja de productes de PCR</i>	50
2.9.3. <u>Mètodes de determinació de la concentració d'ADN</u>	51
2.9.3.1. <i>Determinació espectrofotomètrica</i>	51
2.9.3.2. <i>Determinació fluoromètrica</i>	51
2.9.4. <u>Reacció en cadena de la polimerasa: PCR</u>	52
2.9.5. <u>Electroforesi en gel d'agarosa</u>	52
2.9.6. <u>Electroforesi en gel de poliacrilamida. Separació de productes de PCR mitjançant gel en gradient desnaturalitzant</u>	53
2.9.7. <u>Estudis sobre el gen <i>crtY</i></u>	56
2.9.7.1. <i>Disseny d'encebadors degenerats</i>	56
2.9.7.2. <i>Amplificacions específiques dels fragments d'interès (possibles <i>crtY's</i>)</i>	58
2.9.7.3. <i>Reacció de seqüenciació</i>	61

3. Mètodes d'aïllament i caracterització dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre

3.1. Introducció

3.1.1. Perspectiva històrica	65
3.1.2. Estructura molecular	66
3.1.3. La cromatografia líquida en l'anàlisi dels carotenoides	69
3.1.4. L'espectrometria de masses en l'estudi dels carotenoides	72
3.1.5. Efecte de les condicions d'oxido-reducció en la composició quantitativa i qualitativa d'extractes pigmentaris de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	73
3.1.6. Estudis paleolimnològics	74

3.2. Resultats

3.2.1. Identificació dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre per cromatografia líquida d'alta resolució	77
3.2.1.1. <u>Anàlisi cromatogràfica de carotenoides en extractes pre-purificats amb columnes d'alúmina</u>	77
3.2.2. Identificació dels carotenoides de <i>Chlorobium phaeobacteroides</i> CL1401 per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses	89
3.2.3. Variacions quantitatives en el contingut d'isòmers dels carotenoides de les espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre	99
3.2.4. Aplicacions del mètode desenvolupat. Anàlisi pigmentària en sediments lacustres antics de la zona de Banyoles	107

3.3. Discussió

3.3.1. Separació de carotenoides de Bacteris Verds del Sofre per cromatografia líquida d'alta resolució	114
3.3.2. Efecte de la llum i diferents agents químics sobre les relacions molars <i>trans/cis</i> dels carotenoides de les espècies marrons de bacteris verds del sofre	117
3.3.2.1. <u>Fotosensibilitat</u>	118
3.3.2.2. <u>Sensibilitat a agents oxidants i reductors</u>	119
3.3.3. Anàlisi de pigments fòssils en sediments	120

4. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica

4.1. Introducció

- 4.1.1. Funcions dels carotenoides a l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre 127
- 4.1.2. Estequiometries de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre 130

4.2. Resultats

- 4.2.1. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica en Bacteris Verds del Sofre 132
- 4.2.1.1. Variacions en la composició pigmentària de diferents soques de Bacteris Verds del Sofre durant el creixement a diferents intensitats de llum..... 132
- 4.2.1.2. Variacions en el nombre de centres de reacció de diferents soques de Bacteris Verds del Sofre creixent sota limitació lumínica 146
- 4.2.2. Variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides dels clorosomes d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre 150
- 4.2.3. Variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre procedents de mostres naturals..... 157

4.3. Discussió

- 4.3.1. Adaptació a diferents condicions d'il·luminació i dinàmica de síntesi dels pigments fotosintètics en Bacteris Verds del Sofre 167
- 4.3.1.1. Dinàmica de síntesi durant el creixement 167
- 4.3.1.2. Estequiometria de l'aparell fotosintètic 173
- 4.3.1.3. Estimació del nombre de centres de reacció per clorosoma 174
- 4.3.2. Diferències en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides dels clorosomes d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre 183
- 4.3.3. Variacions en el contingut de carotenoides en poblacions naturals de Bacteris Verds del Sofre 185

5. Disseny d'un marcador molecular per a la detecció específica de Bacteris Verds del Sofre de coloració marró

- 5.1. Introducció 191

5.2. Resultats**5.2.1. Disseny d'encebadors 197****5.2.2. Comprovació de l'especificitat dels encebadors 199****5.3. Discussió 208****6. Discussió general..... 215****7. Conclusions 221****8. Bibliografia 227**

1. Introducció

1. Introducció

1.1. Els bacteris fotosintètics

Els organismes fotosintètics es caracteritzen per ser capaços de convertir l'energia lumínica en energia química a través d'una sèrie de reaccions electroquímiques que tenen lloc en aparells fotosintètics especialitzats. Pel que fa al tipus de fotosíntesi que porten a terme, els bacteris fotosintètics es divideixen en dos grans grups: els cianobacteris, que realitzen la fotosíntesi oxigènica (es produeix oxigen com a producte residual, derivat de la hidròlisi de l'aigua) i els bacteris fotosintètics anoxigènics (BFA), que fan fotosíntesi anoxigènica, en la qual no es genera oxigen. Ambdós grups, a més, presenten diferències tant en el tipus de pigments com en les seves característiques fisiològiques i ecològiques (Stanier *et al.*, 1981). Malgrat aquestes diferències, els dos grups utilitzen complexos antena especialitzats per absorbir l'energia lumínica i transferir-la als centres de reacció (CR), en els quals comença la transferència de càrregues i la resta de reaccions químiques de la fotosíntesi.

Els cianobacteris, que realitzen la fotosíntesi oxigènica, presenten un fotosistema estructuralment similar al de les plantes superiors. Els complexos fotosintètics, anomenats ficobilisomes, són complexos extramembranosos constituïts per subunitats proteiques associades a pigments del grup de les ficocianines i de les ficoeritrines (Bryant *et al.*, 1979; Gantt, 1986). Els màxims d'absorció d'aquests pigments es situen entre els 615–620 nm en el cas de la ficocianina i entre els 495–565 nm en el cas de la ficoeritrina (McColl i Guard-Friar, 1987).

Els BFA, en canvi, es caracteritzen per realitzar una fotosíntesi anoxigènica, on el poder reductor no s'obté de la hidròlisi de l'aigua sinó de la de compostos reduïts del sofre, generalment sulfhídric (H_2S), o bé en alguns casos de l'hidrogen (H_2). Alguns BFA, com els bacteris verds filamentosos, també poden obtenir el poder reductor a partir de compostos orgànics.

En el grup de BFA, la síntesi de pigments fotosintètics és inhibida per la presència d'oxigen, tot i que algunes espècies marines, aeròbiques, com és el cas d'*Erytrobacter longus*, són una excepció. Aquests bacteris presenten bacterioclorofil·la (BChl) però no són capaços de créixer sota condicions anaeròbiques, essent, per tant, bacteris anoxigènics aerobis (Shimada, 1995).

Tenint en compte característiques morfològiques, fisiològiques i filogenètiques el grup de BFA és extremadament heterogeni. Està format per tres subgrups: els Bacteris Vermells, els Bacteris Verds i els Heliobacteris (Imhoff, 1995). D'acord amb propietats fenotípiques es distingeixen diferents tipus bacterians dins els dos primers subgrups. Així tenim que dins el subgrup dels bacteris vermells es distingeixen els Bacteris Vermells del Sofre i els Bacteris Vermells No del Sofre, mentre que dins el subgrup dels bacteris verds tenim els Bacteris Verds del Sofre i els Bacteris Fotosintètics Anoxigènics Filamentosos.

En base als estudis filogenètics duts a terme amb l'anàlisi del gen del 16S rRNA la classificació dels bacteris fotosintètics varia respecte l'esmentada anteriorment. En aquest cas s'estableixen els següents grups: els Cianobacteris o fotosintètics oxigènics, els Bacteris Verds del Sofre, els Bacteris Fotosintètics Anoxigènics Filamentosos, els Bacteris Vermells i relacionats i els Heliobacteris, aquests darrers dins el grup d'Eubacteris grampositius (Woese, 1985; Woese, 1987; Beer-Romero *et al.*, 1988). Estudis filogenètics a partir de seqüències del gen del 23S rRNA (Stackebrandt, 1996) han corroborat aquesta classificació basada en el 16S rDNA. En la Figura 1.1 es mostra un arbre filogenètic amb els grups de bacteris inclosos dins del domini Bacteria (eubacteris).

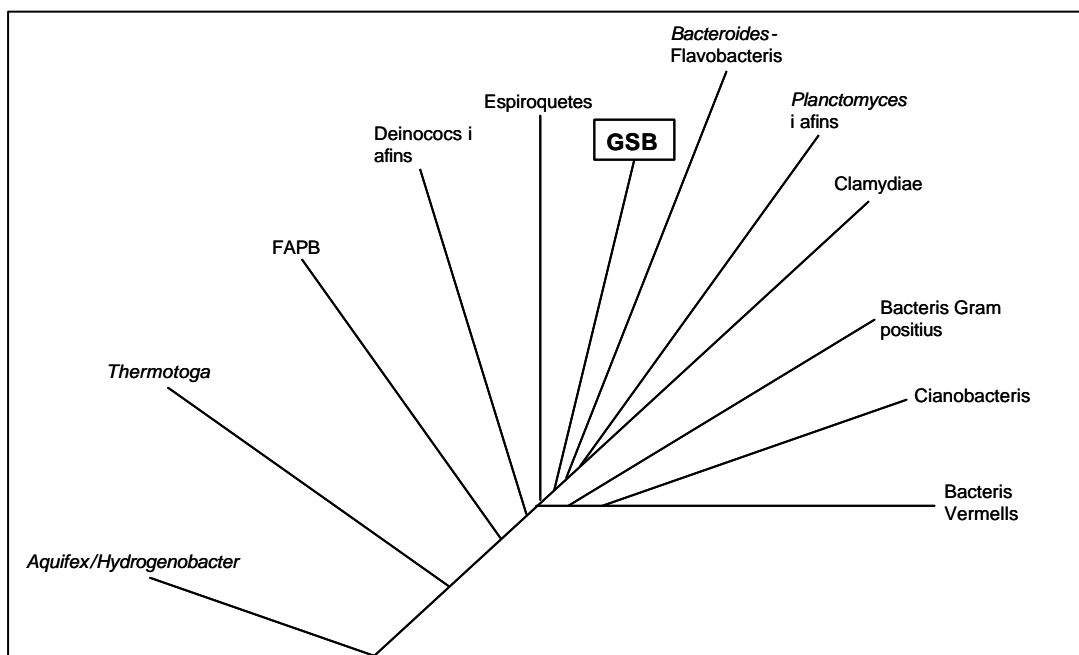


Figura 1.1. Arbre filogenètic dels principals regnes d'eubacteris basat en la comparació de seqüències del 16S rRNA. La longitud de les branques és proporcional a les distàncies evolutives calculades entre grups (Madigan *et al.*, 1997).

Figure 1.1. Phylogenetic tree of eubacteria kingdoms according to 16S rRNA sequences comparison. The length of the branches is proportional to evolutionary distances calculated between groups (Madigan *et al.*, 1997).

1.1.1. Els Bacteris Vermells

Com a característica comuna d'aquest grup bacterià destaca el tipus d'aparell fotosintètic. Es tracta de sistemes membranosos intracitoplasmàtics en els quals es localitzen els pigments fotosintètics, BCl *a* o *b* i carotenoides de la sèrie de l'espíril·loxantina, la rodopina, l'esferoidè o l'okenona (Schmidt, 1978).

D'acord als estudis filogenètics amb el gen del 16S rRNA els Bacteris Vermells es divideixen en Bacteris Vermells del Sofre (del grup γ -Proteobacteria), els quals comprenen dues famílies: la *Chromatiaceae* i la *Ectothiorhodospiraceae* i en Bacteris Vermells No del Sofre, inclosos en els grups α i β -Proteobacteria, els quals comprenen una sola família, la *Rhodospirillaceae*. El sofre resultant de l'oxidació del sulfhídric, en el cas dels Bacteris Vermells del Sofre, es diposita en forma de glòbuls a l'interior de les cèl·lules (Família *Chromatiaceae*) o bé a l'exterior de les mateixes (Família *Ectothiorhodospiraceae*).

1.1.2. Els Bacteris Verds

Dins aquest grup s'inclouen els Bacteris Verds del Sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*) i els Bacteris Fotosintètics Anoxigènics Filamentosos (FAPB, de l'anglès *Filamentous Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*). Malgrat que aquests dos grups de bacteris verds no estant relacionats filogenèticament, i difereixen en trets fenotípics, com ara la composició pigmentaria i el tipus de metabolisme, conserven un complex antena similar, els clorosomes, unes vesícules intracitoplasmàtiques dins les quals s'empaqueten els pigments fotosintètics (veure Apartat 1.2.1).

Pel que fa a la fixació del carboni, els GSB utilitzen el cicle reductiu de l'àcid tricarbòxilic, o cicle d'Arnon, (Sirevag *et al.*, 1977), mentre que els FAPB fixen el CO₂ mitjançant la via metabòlica del 3-hidroxiopropionat (Pierson i Castenholz, 1995). Cal destacar que els FAPB, a diferència dels GSB, també són capaços de créixer heterotròficament utilitzant diferents substrats orgànics com a font de carboni (Pierson i Castenholz, 1992a; 1992b).

El grup de GSB inclou una única família, la de les *Chlorobiaceae*. La majoria de gèneres d'aquesta família es caracteritzen per l'absència de mobilitat, amb l'excepció de *Pelodictyon* sp., *Ancalochloris* sp. i *Chloroherpeton* sp. que són mòbils per vacúols de gas. A la Taula 1.1 es recullen les principals característiques de les *Chlorobiaceae*, un tàxon filogenèticament compacte dins la branca dels Eubacteris, a diferència dels FAPB que

constitueixen un grup molt més heterogeni (Gibson *et al.*, 1985; Woese, 1987), la principal família dels quals és les *Chloroflexaceae* (Pfennig, 1989). Recentment, a partir d'anàlisis filogenètiques amb quatre soques d'*Oscillochloris trichoides*, s'ha descrit una altra família, la *Oscillochlororidaceae*, dins el grup de FAPB (Keppen *et al.*, 2000).

1.2. Estructura i organització de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre

1.2.1. Complex antena: els clorosomes

L'aparell fotosintètic dels GSB, com en tots els bacteris fotosintètics, es troba constituït per tres components bàsics: el complex antena, els centres de reacció (CR) i la cadena de transport electrònica.

Una característica comuna dels dos grups de Bacteris Verds és l'empaquetament de l'antena. A diferència del que succeeix en els Bacteris Vermells, els pigments antena es localitzen dins unes estructures vesiculars peculiars, unides a la cara interna de la membrana plasmàtica, que reben el nom de clorosomes i que foren descrites per primera vegada com a vesícules de *Chlorobium* (Cohen-Bazire *et al.*, 1963). La longitud i amplada d'aquestes vesícules és variable en funció de l'espècie i també de les condicions de creixement, sobretot de la intensitat lumínica (Foidl *et al.*, 1994). La longitud varia entre 70 i 180 nm, mentre que l'amplada oscil·la entre els 30 i 60 nm (Staehelin *et al.*, 1980; Oelze i Golecki, 1995 i Olson, 1998).

En GSB, els clorosomes es troben connectats amb els CR de la membrana a través de les proteïnes Fenna-Matthews-Olson (FMO). En els FAPB, tot i que també presenten clorosomes, aquestes proteïnes FMO són absents (Figura 1.2). A més, els clorosomes dels FAPB són més petits i presenten també diferències en quant a composició polipeptídica (Trüper i Pfennig, 1992; Pierson i Castenholz, 1992a) respecte els clorosomes dels GSB. Això demostra que malgrat les diferències existents entre els dos grups de Bacteris Verds, *Clorobiàcies* i *Cloroflexàcies*, i d'acord a estudis filogenètics realitzats amb el gen que codifica per la fracció 16S rRNA (Gibson *et al.*, 1985; Woese, 1987), el complex antena s'ha mantingut en els dos grups durant la seva divergència evolutiva. Alguns autors han vist en aquesta característica comuna un exemple concret de transferència lateral de gens entre microorganismes (Pierson i Olson, 1989).

Taula 1.1/*Table 1.1.* Principals característiques dels GSB (modificat de Borrego, 1996). *Main features of GSB (modified from Borrego, 1996).*

Espècie	Morfologia	Diàmetre cel·lular (mm)	Color	BCI	Car	Vacúols de gas	1 % NaCl
<i>Chlorobium</i>							
<i>limicola</i>	bacil	0,7–0,1	verd	c-d	Cbt, Nrp	–	–
<i>vibriforme</i>	vibri	0,5–0,7	verd	c-d	Cbt	–	+
<i>chlorovibrioides</i>	vibri	0,3–0,4	verd	c-d	Cbt	–	+
<i>tepidum</i>	bacil	0,6–0,8	verd	c	Cbt	–	–
<i>phaeobacteroides</i>	bacil	0,6–0,8	marró	e	Isr, β -Isr	–	–
<i>phaeovibrioides</i>	vibri	0,3–0,4	marró	e	Isr, β -Isr	–	+
<i>Pelodyction</i>							
<i>luteolum</i>	ovoide	0,6–0,9	verd	c	Cbt	+	–
<i>clathratiforme</i>	bacil ^(*)	0,7–1,2	verd	d	Cbt	+	–
<i>phaeum</i>	vibri	0,6–0,9	marró	e	Isr, β -Isr	+	+
<i>phaeoclathratiforme</i>	bacil ^(*)	0,6–0,9	marró	e	Isr, β -Isr	+	–
<i>Prosthecochloris</i>							
<i>aestuarii</i>	coc	0,5–0,7	verd	c	Cbt	–	+
<i>phaeoasteroidea</i>	coc	0,4–0,6	marró	e	Isr, β -Isr	–	+
<i>Ancalochloris</i>							
<i>perfilievii</i>	coc	0,5–1,0	verd	c?	Cbt?	+	–
<i>Chloroherpeton</i>							
<i>talassium</i>	bacil	1	verd	c	γ -carotè	+	+

De totes les espècies mencionades, només *Chlorobium tepidum*, *Chloroherpeton talassium* i el gènere *Prosthecochloris* són bentòniques, tota la resta són planctòniques. ^(*)Espècies amb divisió ternària (estructures en forma de xarxes).

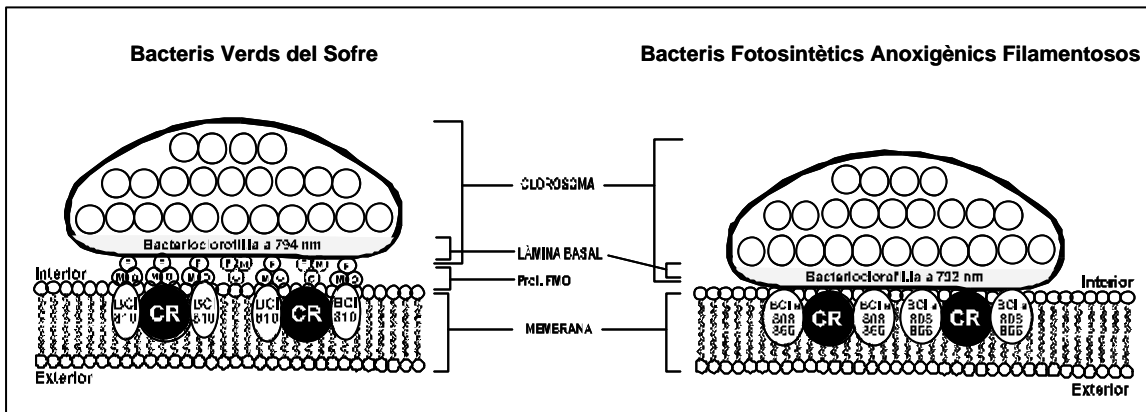


Figura 1.2. Esquema de l'estructura de l'aparell fotosintètic dels GSB en comparació amb el dels FAPB (modificat de Blankenship *et al.*, 1995).

Figure 1.2. Schematic representation of the photosynthetic apparatus in GSB (left) and in FAPB (right) (modified from Blankenship et al., 1995).

1.2.1.1. Composició dels clorosomes

En els clorosomes hi tenen lloc els processos físics de la fotosíntesi, és a dir, l'absorció de la llum i la transferència de l'excitació captada fins al CR, integrat dins la membrana (Olson, 1998). Tot i semblar estructures relativament simples, els clorosomes són vesícules bastant complexes des del punt de vista estructural, ja que estan compostos per:

- (a) **Bacterioclorofil·les** (BCIs) (Apartat 1.2.2.1): que fan les funcions d'antena i que són del tipus *c*, *d* o *e*.
- (b) **Làmina basal** (BCL *a*): actua d'intermediària en la transferència d'energia cap al CR. En aquesta part del clorosoma, nexe d'unió amb els CR de la membrana cel·lular, també s'hi troben associades proteïnes CsmA i suposadament carotenoides.
- (c) **Carotenoides**: presumiblement tant amb funció estructural com protectora (Apartat 1.2.2.2).
- (d) **Lípids**: constituint una envolta monocapa que limita el clorosoma, formada bàsicament per glicolípid. D'aquests, el monogalactòsid diglicèrid és el més abundant, tant a GSB com a FAPB (Knudsen *et al.*, 1982). La seva localització al clorosoma suggereix, d'una banda, una possible funció estructural (Uehara *et al.*, 1994) i d'altra banda, sembla ser que la seva presència podria afavorir l'organització dels pigments, responsables del caràcter hidrofòbic de l'interior del

clorosoma (Miller *et al.*, 1993a; 1993b). Un altre tipus de lípid, present també a la membrana dels clorosomes, són els fosfolípids (Schmidt, 1980).

- (e) Polipèptids: de diferents tipus i ubicats la majoria en l'envolta. Aquests polipèptids pertanyen a la família de proteïnes Csm (veure Apartat 1.2.3).

1.2.2. Pigments fotosintètics als Bacteris Verds del Sofre

Segons la seva pigmentació, els GSB es divideixen en :

Espècies verdes: amb BCl *c* i/o *d* i carotenoides del grup del clorobactè (Cbt) i de l'hydroxi-clorobactè (OH-Cbt) (Gloe *et al.*, 1975; Schmidt, 1978).

Espècies marrons: caracteritzades per la presència de BCl *e*, i isorenieratè (Isr) i beta-isorenieratè (β -Isr) com a carotenoides (Liaaen-Jensen, 1965).

1.2.2.1. *Bacterioclороfil·les*

Les espècies de GSB presenten, com a pigments antena, diferents tipus de BCIs amb característiques estructurals i funcionals diverses, tal i com es mostra a la Taula 1.2.

Taula 1.2. Principals característiques de les BCIs (segons Scheer, 1991; Imhoff, 1995; Senge i Smith, 1995).

Table 1.2. Main characteristics of BCHls (from Scheer, 1991; Imhoff, 1995; Senge i Smith, 1995).

Tipus	Alcohol esterificat	Funció	Presència
BCI <i>a</i> (C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₆ Mg)	Farnesol (F) (C ₂₀ H ₄₀ O), Geranil-geraniol (Gg) (C ₂₀ H ₄₃₄ O)	Antena + CR	Bacteris Vermells, GSB
BCI <i>b</i> (C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg)	F, Gg, Fitodienol (FE)	Antena + CR	Bacteris Vermells ⁽¹⁾
BCI <i>c</i>	F, Estearol (S), altres ⁽²⁾	Antena	GSB (espècies verdes)
BCI <i>d</i>	F	Antena	GSB (espècies verdes)
BCI <i>e</i>	F	Antena	GSB (espècies marrons)
BCI <i>g</i> (C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg)	F, Gg	Antena + CR	Heliobacteris

⁽¹⁾Només en algunes espècies de bacteris vermells: *Rhodopseudomonas viridis*, *R. sulfoviridis*, *Thiocapsa pfennigii*, *Ectothiorhodospira halochlororis* i *E. abdelmalekii*.

⁽²⁾Alcohols diversos trobats a *Chl. limicola* (Cagle *et al.*, 1978): tetrahydrogeranil-geraniol, *cis*-9-hexadecen-1-ol, 4 undecil 2-furanmetanol.

Aquests pigments antena es troben densament empaquetats a dins la matriu hidrofòbica del clorosoma, donant lloc a estructures de forma tubular d'uns 10 nm de diàmetre i uns 100-200 nm de llargada (Staehelin *et al.*, 1980). Cada unitat fotosintètica conté entre 10 i 30 dels esmentats cossos cilíndrics (Figura 1.3). Aquests es formen gràcies a la capacitat que tenen les molècules de BCl d'interaccionar entre elles i formar agregats, una propietat que ha estat observada tant *in vivo* (Brune *et al.*, 1987; 1988; Hildebrandt *et al.*, 1994) com *in vitro* (Krasnovsky *et al.*, 1966; Olson i Pedersen, 1988; 1990; Uehara i Olson, 1992; Miller *et al.*, 1993a; Chiefari *et al.*, 1995).

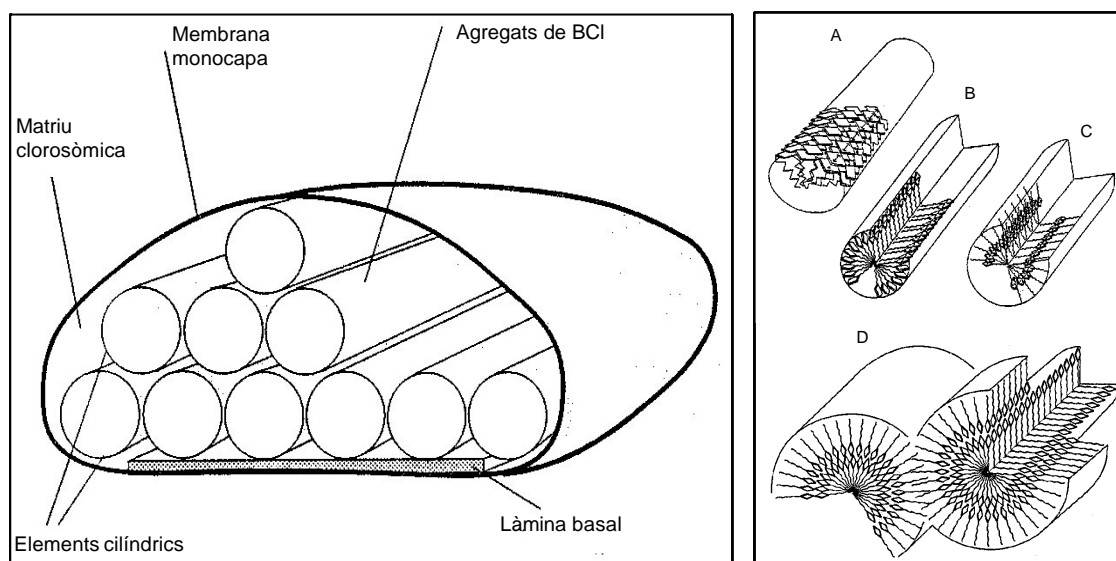


Figura 1.3. A la figura de l'esquerra s'esquematitza l'estructura interna d'un clorosoma a partir d'una secció transversal. Al quadre de la dreta apareixen diferents models proposats per explicar l'ordenació i orientació de les molècules de BCl en els elements cilíndrics: (A) Matsuura *et al.* (1993); (B) Nozawa *et al.* (1993); (C) Nozawa *et al.* (1994) i (D) Model actual, Steensgaard *et al.* (2000).

Figure 1.3. Schematic view of the internal structure of chlorosomes (left). Proposed models for organization of BChl molecules in the rod elements of chlorosomes, according to: (A) Matsuura *et al.* (1993); (B) Nozawa *et al.* (1993); (C) Nozawa *et al.* (1994) and (D) present model, Steensgaard *et al.* (2000) (right).

Pel que fa a la seva estructura, les BCl són molècules formades a partir d'un anell porfirínic constituït per una estructura planar de quatre anells pirròlics coordinats amb un àtom central de magnesi. En tots els casos l'anell porfirínic presenta un alcohol esterificat a la posició C-17 (Figura 1.4).

Fins al moment, s'han proposat molts models per a l'agregació i correcta orientació de les BCl, un fet clau a l'hora d'optimitzar i canalitzar el flux d'excitació cap als CR. Tots els models coincideixen en el fet que el grup 13¹-ceto i l'àtom central de magnesi són claus

per l'agregació entre els monòmers de BCl (Chieffari *et al.*, 1995; Senge i Smith, 1995). És clar, per tant, que les interaccions establertes entre els diferents pigments que constitueixen l'antena no requereixen de la intervenció de proteïnes (Wullink *et al.*, 1991).

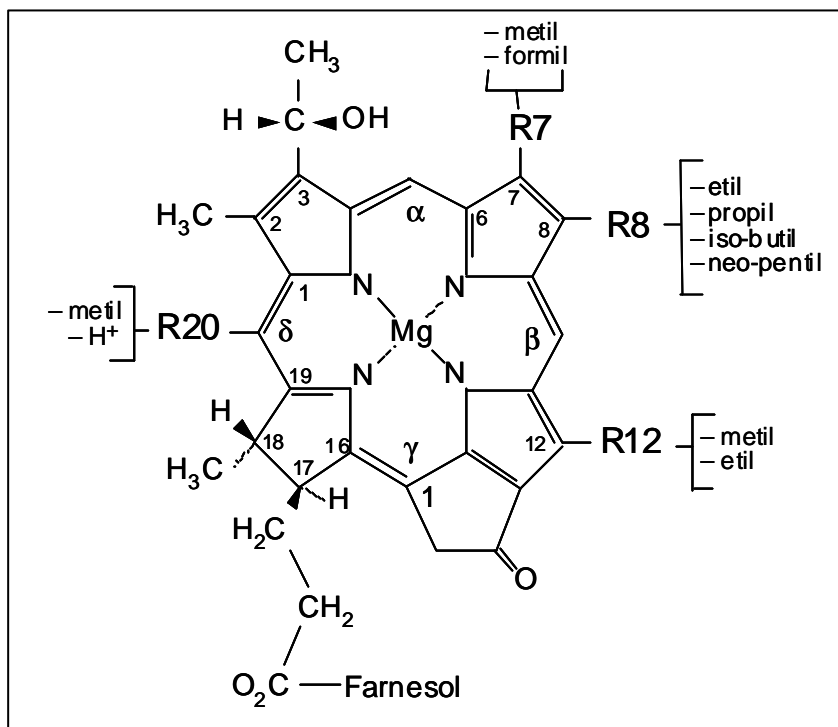


Figura 1.4. Estructura química de les BChls. En les BChls *c, d* i *e*, els substituents R7, R8 i R12 tenen una elevada variabilitat. El farnesol és el principal alcohol esterificat en els GSB però poden trobar-se d'altres (Caple *et al.*, 1978).

Figure 1.4. Chemical structure of BChls. In BChl *c, d* and *e*, the R7, R8 and R12 substituents are highly variable. Farnesol is the primary esterifying alcohol in GSB but other types of alcohols can also be found (Caple *et al.*, 1978).

Estudis recents duts a terme per Steensgaard *et al.* (1999 i 2000) amb clorosomes de *Chl. limicola* UdG6040, una soca amb un contingut mixt de pigments (BChl *c* i BChl *d*) han permès deduir que la distribució dels elements cilíndrics de BChl antena no és a l'atzar sinó que segueix una ordenació i orientació determinada que optimitza la transferència d'energia i, per tant, augmenta l'eficiència del sistema.

A més, els tres tipus de BChl (*c, d* i *e*) es troben a l'interior dels clorosomes, no com a formes moleculars úniques, sinó com a mescla de diferents homòlegs estructurals, els quals poden diferir en l'alcohol esterificat que presenten al C-17, així com en els radicals que presenten al C-7, al C-8 i al C-11. L'alcohol esterificat al C-17 varia en funció del tipus de BChl. En el cas de la BChl *c, d* i *e* sol ser el farnesol, mentre que a la BChl *a* i *b* sol ser el fitol

o el geranil-geraniol (Gloe i Pfennig, 1974; Senge i Smith, 1995). D'aquesta manera, totes les BCl presenten un patró d'homòlegs característic que pot ser identificat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (Borrego i Garcia-Gil, 1994), tot i que l'esmentat patró pot variar en funció de l'edat del cultiu (Caple *et al.*, 1978) i de les condicions d'il·luminació (Borrego i Garcia-Gil, 1995).

Pel que fa a la BCl *a*, aquesta es troba present a les cèl·lules en quantitats molt inferiors respecte la BCl antena (*c*, *d* o *e*). Representa tan sols un 3 % de la BCl antena del clorosoma. D'aquesta, a l'entorn d'un 1 % es troba formant part de la làmina basal del clorosoma, actuant com a intermediari en la transferència d'energia cap als CR, i el 2 % restant es troba associat als complexos FMO i als CR de la membrana plasmàtica. Aquests percentatges han estat determinats en treballs previs per a diferents espècies de GSB, concretament per *Chlorobium (Chl) limicola* (Gerola i Olson, 1986) i per *Chl. phaeovibroides* i *Chl. vibrioforme* (van Noort *et al.*, 1994).

1.2.2.2. Carotenoides

Malgrat que aquesta memòria ha estat centrada en els carotenoides dels GSB, cal tenir present que aquests pigments es troben àmpliament distribuïts a la natura, i són presents tant en teixits fotosintètics de plantes superiors com en microorganismes fotosintètics (veure Introducció Capítol 3. Apartat 3.1).

En els clorosomes dels GSB també s'hi troben diferents quantitats de carotenoides, i tot i que aquests pigments ja hagin estat descrits com a antena accessòria (Liaaen-Jensen *et al.*, 1964; Liaaen-Jensen *et al.*, 1965), la seva localització i funció exacta no es coneix encara amb precisió. Segons Frank i Cogdell (1996) aquestes molècules poden dur a terme fins a cinc funcions diferents dins el procés fotosintètic: (1) absorbir i transferir energia lumínica (Cogdell *et al.*, 1994), actuant així com a antena accessòria i ampliant el rang de longituds d'ona a les quals absorbeixen les BCl, a través d'un estat de transferència d'energia *singlet*, (2) fotoprotègir les BCl, extingint la fluorescència dels estadis *triplet* de les mateixes, (3) protegir davant la formació de radicals lliures d'oxigen, (4) dissipar l'excés d'energia, i (5) estabilitzar estructuralment els clorosomes. Assumint totes aquestes funcions és apropiat considerar que la localització dels carotenoides, a l'aparell fotosintètic, ha de ser propera a les BCl a les quals han de transferir l'energia i, tot i que

aquesta condició de proximitat sigui totalment necessària, no és suficient per assegurar l'eficàcia de la transferència d'energia (Frank i Cogdell, 1996).

A la introducció del Capítol 4 de la present memòria es descriuen amb detall les hipòtesis i l'estat actual de la recerca en relació a les funcions dels carotenoides als GSB. Aquestes funcions, a l'igual que en bacteris vermells del sofre (Fraser *et al.*, 2001) estarien relacionades, d'una banda, amb la fotoprotecció i estabilització de l'aparell fotosintètic i, d'altra banda, amb funcions de caràcter més estructural.

A la Taula 1.3. es recullen els principals carotenoides presents als diferents grups de bacteris fotosintètics. Els detalls sobre l'estructura molecular d'aquests pigments, així com els aspectes relacionats amb la seva anàlisi es recullen a la introducció del Capítol 3 de la memòria.

Finalment, al Capítol 5 s'introdueixen aspectes relacionats amb la ruta de síntesi dels carotenoides i la utilitat dels enzims que codifiquen per la seva síntesi com a marcadors moleculars.

Taula 1.3. Carotenoides majoritaris dels bacteris fotosintètics anoxigènics (Schmidt, 1978).

Table 1.3. Main carotenoids of anoxygenic photosynthetic bacteria (Schmidt, 1978).

Grup biosintètic	Components principals	Famílies
Sèrie normal de l'espíril-loxantina	Licopè, Rodopina i Espíril-loxantina	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Chromatiaceae</i> , BFVNS*
Sèrie del rodopinal	Licopè, Licopenal, Licopenol, Rodopina, Rodopinal i Rodopinol	<i>Ectothiorhodospiraceae</i> , <i>Chromatiaceae</i> , BFVNS
Sèrie alternativa de l'espíril-loxantina	Hidroxineurosporè, Esferoidè i Esferoidenona	BFVNS
Sèrie de l'okenona	Okenona	<i>Chromatiaceae</i> BFVNS
Sèrie de l'isorenieratè	β -Carotè i Isorenieratè	<i>Chlorobiaceae</i>
Sèrie del clorobactè	γ -Carotè i Clorobactè	<i>Chlorobiaceae</i>

*BFVNS: Bacteris Fotosintètics Vermells No del Sofre

1.2.3. Proteïnes

El paper funcional de totes les proteïnes dins els clorosomes dels GSB no es coneix amb exactitud. Les hipòtesis plantejades es troben relacionades amb dos tipus de funcions. D'una banda, actuarien com a estabilitzadores de l'estructura del clorosoma, i de l'altra, serien proteïnes transportadores de diferents molècules (pigments i precursors dels mateixos) des de la membrana plasmàtica fins a la matriu clorosòmica (Oelze i Golecki, 1995; Bryant, 2003 (<http://www.bmb.psu.edu/faculty/bryant/lab/>)).

En el cas de *Chl. tepidum*, el representant més estudiat del grup de GSB, s'han descrit, concretament, deu polipèptids diferents: CsmA, CsmB, CsmC, CsmD, CsmE, CsmF, CsmH, CsmI, CsmJ i CsmX. Totes aquestes proteïnes, a banda de la proteïna CsmA de la làmina basal, es situen a l'envolta del clorosoma. A més, tot i que encara no es coneix amb precisió la funció d'alguna d'aquestes proteïnes, sembla ben establert que cap d'aquestes intervé en la formació dels agregats de BCl *c* (Smith *et al.*, 1983; Holzwarth *et al.*, 1992; Tamiaki *et al.*, 1996 i Bryant *et al.*, 2002). Segons aquests treballs, es pot assumir que les funcions d'aquestes proteïnes estarien relacionades, tal com s'ha mencionat anteriorment, a processos d'estabilització de la membrana del clorosoma, així com a transport de molècules, la qual cosa es recolza amb l'estructura secundària que presenten aquestes proteïnes.

Menció a part mereixen les proteïnes FMO (Fenna-Matthews-Olson), les quals formen part d'uns complexos pigment-proteïna, situats entre la làmina basal del clorosoma i els CR de la membrana plasmàtica dels GSB. Aquests complexos estant constituïts per tres subunitats proteiques, a cadascuna de les quals s'associen 7 molècules de BCl *a* (Thornber i Olson, 1968; Olson, 1971; 1978; Fenna *et al.*, 1974). La funció d'aquesta BCl *a*, a diferència de les BCl's que constitueixen l'antena, és actuar d'intermediari en la transferència d'energia entre els pigments antena del clorosoma i els CR de la membrana plasmàtica (van Dorssen *et al.*, 1986). En els FAPB, degut a l'absència de les esmentades proteïnes, la transferència d'energia procedeix directament des de la làmina basal fins als complexos antena de la membrana plasmàtica.

1.2.4. Centres de Reacció

En ambdós grups de Bacteris Verds, els CR es troben situats a la membrana plasmàtica, tot i que les molècules associades són diferents en GSB i FAPB. En GSB, la BCl *a* associada a aquests complexos absorbeix a 810 nm (BCl *a* 810) mentre que en els FAPB es tracta d'un complex mixt que absorbeix a 808 i 866 nm (BCl *a* 808–866). Els components de la cadena de transport d'electrons, així com el mateix CR, són també diferents en els dos grups. En els GSB els CR són del Tipus I o de tipus Fe-S, equiparables als CR dels Heliobacteris i al fotosistema (PS) I dels organismes fotosintètics oxigènics (Nitschke i Rutherford, 1991; Büttner *et al.*, 1992a; 1992b; Liebl *et al.*, 1993; Hauska *et al.*, 2001; Rémygy *et al.*, 2002). Els FAPB, en canvi, tenen un CR de Tipus II o de tipus Quinona, estructuralment similar al dels Bacteris Vermells i al PSII de les plantes superiors (Bruce *et al.*, 1982; Pierson i Thornber, 1983; Feick i Fuller, 1984; Rémygy *et al.*, 2002).

La transferència d'energia, en el cas dels GSB s'inicia amb el flux d'electrons des de la BCl antena fins a la BCl *a* de la làmina basal del clorosoma (BCl *a* 795). D'aquí l'energia és transmesa cap a la BCl *a* associada a les proteïnes FMO (BCl *a* 810) i d'aquesta cap a la BCl *a* associada als CR (BCl *a* 840). El nucli dels CR als GSB és homodimèric, constituït per dues subunitats idèntiques de proteïnes PscA. El donador primari d'electrons, P840, està constituït per un parell de molècules de BCl *a*, mentre que l'acceptor primari d'electrons és una molècula de BCl₆₆₃, una molècula de Cl *a* esterificada amb Δ^2 -6 fitadienol (Kobayashi *et al.*, 2000). Pel que fa als donadors secundaris d'electrons esmentar que en GSB són citocroms del tipus *b* i *c* i proteïnes Fe-S similars a les del PSI (Blankenship, 1985; Büttner *et al.*, 1992a; 1992b; Golbeck, 1993; Meyer i Donohue, 1995).

1.3. Objectius i estructura de la tesi

El present treball de recerca està centrat en l'estudi de la diversitat i funció dels carotenoides a l'aparell fotosintètic dels GSB, especialment de les espècies marrons. Una de les preguntes inicials fou la d'esbrinar el per què tenen un contingut de carotenoides tan alt, especialment si es compara amb el de les espècies verdes. Les hipòtesis i conclusions recollides en aquesta memòria són el fruit d'un seguit d'aproximacions experimentals, a diferents nivells, que s'han estructurat en tres blocs independents. Malgrat la independència de cadascuna d'aquestes parts, que en facilita la lectura, la memòria inclou una introducció general comuna (Capítol 1), així com una discussió i conclusions generals (Capítols 6 i 7, respectivament). El segon capítol, d'altra banda, inclou el material i els mètodes emprats per a la realització dels experiments que formen part de cadascun dels blocs esmentats.

El primer dels blocs (Capítol 3) es centra en les anàlisis realitzades per a la identificació i caracterització dels carotenoides bacterians objecte d'estudi. Aquesta primera part inclou, d'una banda, la identificació d'aquests carotenoides mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució, així com les aplicacions de la mateixa en l'estudi d'uns sediments fòssils en els quals es detectaren carotenoides específics de les espècies marrons de GSB. D'altra banda, també s'inclouen els resultats de l'anàlisi d'aquests mateixos pigments mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS/MS), així com un seguit d'experiments realitzats per tal d'estudiar canvis en la composició d'isòmers *trans* i *cis* dels carotenoides analitzats.

En el segon bloc (Capítol 4) s'estudia l'adaptació de diferents cultius i soques de col·lecció, així com poblacions naturals de GSB, que creixen sota diferents condicions d'il·luminació. Aquest segon bloc analitza, doncs, aspectes relacionats amb les funcions dels pigments dins l'aparell fotosintètic dels GSB, i es fa especial èmfasi en les relacions que s'estableixen entre els diferents tipus de pigments.

Finalment, el darrer bloc experimental (Capítol 5) inclou la caracterització i seqüenciació d'un gen potencialment implicat en la síntesi de carotenoides a les espècies marrons de GSB. Aquest va ser utilitzat com a eina molecular per a la identificació específica de les espècies marrons de GSB en comunitats mixtes d'ambients naturals.

La memòria finalitza amb el recull de les referències bibliogràfiques consultades i citades al text per a l'elaboració del treball.

2. Material i Mètodes

2. Material i Mètodes

2.1. Equipament i Reactius

2.1.1. Equipament

L'equipament utilitzat per a la realització d'aquest treball de recerca es llista a continuació:

Agitadors magnètics Mivar ALC
Autoclaus Selecta Autotester, models 437-G i 437-P
Balances AND HR-60 i AND EW -600G
Banyos termostàtics Selecta tectron, models R200D i PTI200
Bomba peristàtica pharmacia Biotech. P-1
Cambra d'anaerobiosi Heraeus WA6100
Campana de flux laminar TELSTAR AV-100
Centrifugadora d'alta velocitat refrigerada SORVALL RC-5B (rotors SS-34 i GSA)
Centrifugadora de sobretaula Selecta Centromix
Centrifugadora Hettich Mikro 12-24
Citòmetre de flux (descriu a la secció 2.8.4.2)
Clarificadora Westfalia separator, model CLP100
Espectrofluorímetre Perkin Elmer LS 50B
Espectrofotòmetre MILTON ROY MR3000
Espectreradiòmetre LI-COR 1800-1W
Instrumental HPLC (descriu a la secció 2.4.2)
Lupa binocular Nikon SMZ-1
Microscopi Zeiss-Axioscop HDIC
pH-metre CRISON Basic 20
Premsa de French SLM-AMINCO
Rotoevaporador Heidolph VV2000
Seqüenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)
Sonda multiparamètrica HYDROLAB DS-3
Sonicador Braun T-Labsonic 2000
Termocicladors d'Applied Biosystems (models 9700 i 2700)
Transil·luminador UV Herolab UVT-20M
Ultracentrifugadora SORVALL OTD 75B (rotor TH-641)
Vortex Technokartell TK3S

2.1.2. Reactius

Els productes químics utilitzats rutinàriament durant la investigació varen ser reactius de grau analític de les companyies comercials Merck, Panreac i Scharlau. Els reactius utilitzats en Biologia Molecular (veure secció 2.9) es mencionen a l'apartat en el qual es detalla el seu ús.

2.2. Mètodes d'aïllament i cultiu de Bacteris Verds del Sofre

Els experiments que integren aquesta memòria de recerca han estat realitzats amb cultius purs de diferents soques de Bacteris Fotosintètics del Sofre (veure Taula 2.1).

Taula 2.1. Soques de bacteris fotosintètics utilitzades durant l'estudi. Totes elles pertanyen a la col·lecció oficial de la Universitat de Girona, excepte (1) cedides pel Dr. J. Overmann (University of Munich) , (2) cedides per la Dra. M. Miller (University of Southern Denmark, Campus d'Odense, Dinamarca) i (3) cedides pel Dr. R.Guyoneaud (Université de Pau et des Pays de l'Adour, França).

Table 2.1. Strains of photosynthetic bacteria used in this work. All of them belong to the University of Girona collection, except (1) provided by Dr. J. Overmann (University of Munich), (2) provided by Dr. M. Miller (University of Southern Denmark, Campus of Odense, Denmark) and (3) provided by Dr. R.Guyoneaud (Université de Pau et des Pays de l'Adour, France).

Espècie/Species	Soca/Strain	Origen/Origin
Bacteris Verds del Sofre		
Espècies marrons		
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	CL1401	Llac Sisó
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	2430 ^T	(1)
<i>Chlorobium phaeovibrioides</i>	2631 ^T	(1)
Espècies verdes		
<i>Chlorobium limicola</i>	UdG6038	Florida (EEUU)
<i>Chlorobium vibrioforme f. thiosulfatophilum</i>	NCIB8327	(2)
<i>Chlorobium tepidum</i>	ATCC49652	(2)
<i>Pelodictyon clathratiforme</i>	UdG7504	Estanyol Coromina
Cromatiàcies		
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	5811	(3)

El protocol seguit per l'aïllament d'espècies d'ambients naturals va consistir en un enriquiment de la mostra, seguit de la tècnica d'aïllament de dilucions en agar. L'enriquiment a partir de les mostres naturals va consistir en incubar l'aigua de les fondàries d'interès en ampolles de vidre de 100 ml, tancades hermèticament, utilitzant bombetes incandescentes de 100 W com a font lumínica. Prèviament es va addicionar H₂S 1

mM als enriquiments com a font de poder reductor pels bacteris fotosintètics objecte d'estudi. La tècnica de dilucions en agar va consistir en una dilució seriada, a partir d'un inòcul de l'enriquiment, en una sèrie de 6 tubs amb 7 ml de medi Pfennig (preparat d'acord a l'apartat 2.2.1) i 3 ml d'agar tou al 3 %, d'acord al mètode descrit per Van Niel (1971) i modificat posteriorment per Trüper i Pfennig (1992). El creixement dels microorganismes es va manifestar en forma de colònies. Aquestes s'obtenien de la matriu d'agar aspirant amb una pipeta Pasteur estèril. Posteriorment les colònies es ressuspèien en un petit volum de medi Pfennig (0,5–1 ml) per comprovar la seva puresa al microscopi abans de ser utilitzades com a inòcul en medi mineral fresc. Per a assegurar l'obtenció de cultius en estat pur es realitzava una segona sèrie de dilucions en agar a partir de les colònies obtingudes de la primera sèrie. Finalment, les colònies procedents de les segones sèries, un cop comprovat el seu estat al microscopi, ja podien ser inoculades en medi mineral fresc.

2.2.1. Preparació de medi mineral Pfennig

En el cas dels bacteris verds del sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*) el medi de cultiu emprat va ser el medi mineral de Pfennig modificat segons Trüper i Pfennig (1992). Es tracta d'un medi mineral suplementat amb una solució de micronutrients i vitamina B₁₂ (20 mg l⁻¹). La composició, per 1 l de medi, es detalla a continuació:

Solució de sals minerals:

Aigua destil·lada.....	1000 ml
KH ₂ PO ₄	0,34 g
NH ₄ Cl.....	0,40 g
KCl.....	0,34 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O.....	0,50 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O.....	0,05 g
Solució de micronutrients (SL 10)....	1 ml

Composició SL 10 (per 1 l d'aigua destil·lada): HCl 37 % (8,5 ml), FeCl₂ · 4H₂O (1,5 g), H₃BO₃ (6 mg), CoCl₂ · 6H₂O (190 mg), MnCl₂ · 4H₂O (100 mg), ZnCl₂ (70 mg), Na₂MoO₄ · 2H₂O (36 mg), NiCl₂ · 6H₂O (24 mg) i CuCl₂ · 2H₂O (2 mg).

Solució de carbonat: es van dissoldre 3 g de NaHCO_3 (per 2 l de medi) en 20 ml d'aigua continguts a una ampolla de sèrum, hermèticament tancada, sota atmosfera de CO_2 .

Solució de sulfhídric: es van dissoldre 1,2 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 5 ml d'aigua. La concentració final al medi fou de 1 mM afegint 2 ml de l'esmentada solució per 2 l de medi. En aquest cas s'utilitzaren tubs roscats, tancats hermèticament, sota atmosfera de nitrogen.

Una vegada dissoltes les sals el següent pas consistia en autoclavar les solucions anteriorment descrites, juntament amb les ampolles de cultiu necessàries. Després de l'esterilització es deixava refredar el medi, sota pressió de CO_2 , fins que assolía temperatura ambient. A continuació, al medi fred, s'addicionava la solució de carbonat, la de sulfhídric i 1 ml, per litre de medi, de vitamina B_{12} , esterilitzada per filtració abans d'afegir-se al medi. Finalment el pH s'ajustava a 6,7 afegint estèrilment NaOH 1 M o HCl 1 M.

La solució de sulfhídric emprada pel manteniment de les soques durant el creixement (solució de *refeeding*) es preparava desgasificant l'aigua per ebullició durant 15 minuts, deixant-la refredar a temperatura ambient sota atmosfera de CO_2 . A continuació es dissolien les sals (6 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ i 2,3 g de NaCO_3 anhidre en 250 ml d'aigua per una concentració final de S^{2-} 100 mM) i es repartia la solució en tubs de vidre hermèticament tancats, els quals eren posteriorment esterilitzats a l'autoclau.

2.3. Aïllament i anàlisi de clorosomes

Els clorosomes analitzats en aquesta memòria es van obtenir a partir de soques marrons de GSB: *Chlorobium (Chl) phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* 2430^T i *Chl. phaeovibroides* 2631^T, totes elles crescudes en 10 litres de medi mineral Pfennig tal i com s'ha descrit anteriorment (veure Apartat 2.2.1) amb l'objectiu d'analitzar la composició d'isòmers dels carotenoides als clorosomes d'aquestes espècies. Una vegada crescuts, la totalitat dels cultius es va centrifugar en una clarificadora. El sediment cel·lular obtingut era de nou centrifugat durant 20 min a $23.000 \times g$. Per cadascuna de les soques, el sediment de centrifugació es va netejar mitjançant la seva ressuspensió en 20 ml de tampó Tris HCl 50 mM (pH 8,0) sonicant en fred en 3 tandes de 30 segons, per ser finalment centrifugat durant 20 min a $27.000 \times g$, amb la prèvia addició d'ascorbat sòdic 10 mM per evitar l'oxidació. El sediment cel·lular obtingut d'aquesta segona centrifugació es va ressuspensar en 15 ml de tampó Tris HCl (pH 8,0) i es va passar tres vegades per una premsa de French operant a una pressió de 20.000 psi. El material obtingut es centrifugava a $27.000 \times g$ durant 15 min per eliminar les restes cel·lulars (membranes i cèl·lules no trencades). Els clorosomes, constituents principals del sobrenedant, eren congelats a -30 °C fins al moment del seu ús.

La purificació dels clorosomes es va realitzar centrifugant el sobrenedant enriquit en clorosomes a $197.000 \times g$ durant 12 hores carregat en gradients de densitat de sacarosa (del 30 al 50 % de sacarosa en tampó Tris HCl 50 mM, Tiocianat sòdic, NaSCN, 2 M). El gradient de sacarosa es creava en cadascun dels tubs de la ultracentrifugadora, a partir de 4,5 ml de cada solució de sacarosa, mitjançant una bomba peristàtica. Posteriorment es carregaven 2 ml de la mostra rica en clorosomes a cadascun dels tubs. Després de l'esmentada centrifugació a $197.000 \times g$, els clorosomes es van dipositar a l'entorn del 20 % de sacarosa, formant una banda de color marró intens. La identificació de les fraccions es va fer mitjançant l'espectre d'absorció, que va mostrar els pics característics de la bacterioclorigil·la (BCl) *e*, especialment en el cas de la fracció més pura (Figura 2.1).

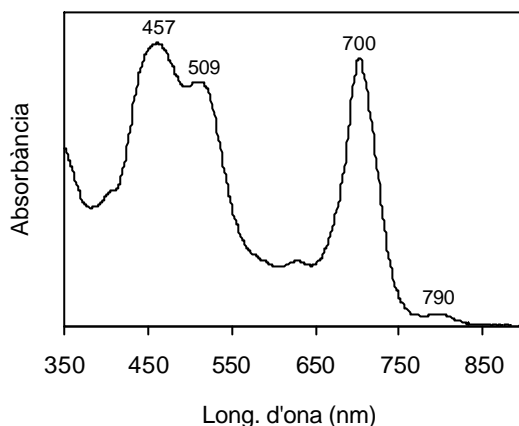


Figura 2.1. Espectre d'absorció de la fracció pura dels clorosomes de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 després dels gradients de densitat de sacarosa.

Figure 2.1. Absorption spectrum of pure chlorosomes of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 after the sucrose density gradients.

Amb l'objectiu de purificar les fraccions de clorosomes aïllades, eliminant restes de BCl *a* associada a proteïnes FMO i als centres de reacció (CR) de la membrana plasmàtica, les bandes clorosòmiques més pures obtingudes en el primer gradient es van carregar en gradients de flotació, d'acord amb el mètode de Steensgaard *et al.* (1997). En aquest cas el gradient de densitat de sacarosa fou del 10 al 50 % i es va crear seguint el protocol que ha estat explicat anteriorment, mitjançant una bomba peristàltica. La mostra, prèviament ajustada a una concentració del 40 % de sacarosa, es carregava sobre un volum de 2 ml de solució de sacarosa al 50 %. A continuació, sobre la mostra, es realitzava el gradient que finalitzava amb un 10 % de sacarosa a la part més superficial dels tubs. Després d'aquesta segona ultracentrifugació els clorosomes es localitzaren a l'entorn d'una concentració d'entre el 10 i el 20 % de sacarosa.

2.4. Anàlisi per cromatografia líquida d'alta resolució: Instrumental i metodologia

2.4.1. Extracció de pigments fotosintètics

En tots els experiments inclosos en aquesta memòria l'extracció dels pigments fotosintètics es va dur a terme utilitzant una barreja d'acetona: metanol (7:2, v:v) com a solvent d'extracció. A partir d'un volum determinat de cultiu prèviament centrifugat per obtenir el sediment de centrifugació (cèl·lules), s'afegia un volum d'acetona: metanol (7:2, v:v) per extreure els pigments. Tot seguit es sonicaven les mostres en fred durant tres tandes de 30 segons, mantenint-se posteriorment a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant un mínim de 24 hores per tal de facilitar l'extracció. Posteriorment les mostres eren centrifugades de nou a $715 \times g$ i el sobrenedant obtingut va ser l'extracte objecte d'estudi.

El volum de mostra injectat variava entre 100 i 250 μl en funció de la concentració de pigments esperada. Abans de l'anàlisi s'afegia un 10 % d'acetat d'amoni 1 M, emprat com a parell iònic d'acord amb Mantoura i Lewellyn (1983) i Borrego i García-Gil (1994), amb l'objectiu de millorar la resolució en la separació dels pigments.

2.4.2. Instrumental de la cromatografia líquida d'alta resolució i mètodes analítics

Per tal de millorar la resolució en l'anàlisi dels carotenoides dels GSB es varen desenvolupar dos mètodes diferents. L'aplicació d'un o altre va dependre de la complexitat de la mostra, així com del tractament previ al qual eren sotmeses les mostres abans de ser injectades.

El sistema de cromatografia líquida utilitzat estava compost per dues bombes Waters model 510 (controlades per un Mòdul de Control Waters), un detector de fotodiodes (PDA) Waters model 996 i un injector automàtic Waters model 717 plus. Tot el sistema estava sota el control d'un ordinador personal (Digital PC5000) equipat amb el programari Millennium 2032 Chromatography Manager (Waters-Millipore), específic per a l'adquisició i processament de les dades.

La separació dels pigments es va dur a terme en una columna analítica Waters Nova-Pack C-18 60 Å (partícules de sílice de 4 µm de diàmetre) de 250 mm de longitud i 4,6 mm de diàmetre, protegida amb un cartutx Waters Spherisorb S5 ODS2 (partícules de sílice de 5 µm de diàmetre) de 30 mm de longitud i 4,6 mm de diàmetre. Els solvents orgànics emprats eren de qualitat HPLC (Scharlau, HPLC grade). Amb l'objectiu d'eliminar possibles impureses els solvents eren filtrats, abans de la seva utilització en filtres de nylon MSI de 47 mm de diàmetre i un diàmetre de porus de 0,45 µm. A continuació eren desgasificats amb heli (Qualitat N₅₀) utilitzant un condicionador de solvents Pharmacia LKB 2256.

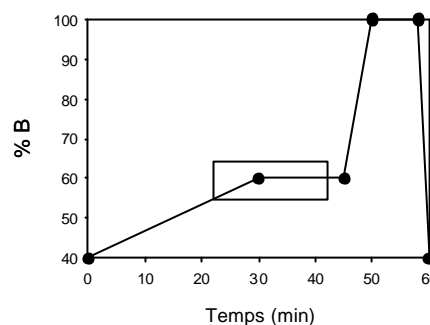
Els dos mètodes d'HPLC de fase reversa dissenyats en aquest estudi van permetre l'anàlisi de carotenoides bacterians procedents de mostres amb diferent grau de complexitat. D'una banda, es van obtenir extractes de carotenoides pre-purificats, és a dir, mostres en les quals les BCl_s foren eliminades mitjançant un protocol de separació amb columnes d'alúmina (veure Apartat 2.4.4) i es va dissenyar un mètode (EP) que permetia una completa separació entre els diferents carotenoides presents a la mostra. Aquest mètode permetia discriminar clarament entre els isòmers *trans* i *cis* per un determinat carotenoide en un temps de carrera relativament curt (45 min). El gradient cromatogràfic així com la fase mòbil d'aquest mètode es van dissenyar d'acord amb treballs previs (veure Taula 32. Capítol 3).

Pel **Mètode EP**, la fase mòbil consistia en un solvent A (acetonitril: aigua, 90:10, vol:vol) i un solvent B (acetat d'etil). Abans de la injecció de les mostres es deixava equilibrar la columna mantenint el gradient en les condicions inicials. El programa d'elució consistia en un increment lineal de solvent B del 40 al 60 % en 30 min, seguit d'una fase de manteniment al 60 % durant 15 min. A continuació es donava un nou increment lineal de solvent B, del 60 al 100 %, en 5 min, seguida de 2 min al 100 % de B (Figura 2.2). Aquest augment en l'apolaritat de la fase mòbil, allargant el temps de carrera fins al min 58, va ser necessari per assegurar l'elució dels compostos de caràcter més apolar, malgrat que tots els carotenoides assajats foren eluïts abans del minut 45. Finalment, amb 2 min, es retornava a les condicions inicials de carrera (40 % de B), mantenint-les durant 15 min per tal de re-equilibrar la columna i preparar-la per la propera injecció. El flux utilitzat va ser de 0,5 ml min⁻¹.

D'altra banda, per l'estudi de mostres pigmentàries complexes, en les quals interessava identificar no només els carotenoides sinó tota la resta de pigments fotosintètics, es va aplicar el **mètode NP** que consistia en un allargament de 15 min de la fase d'elució apolar del mètode dissenyat per Borrego i Garcia-Gil (1994). Aquest allargament va millorar la resolució de la separació dels carotenoides. Amb aquesta modificació, el temps total de carrera fou de 75 min (Figura 2.2).

Mètode EP

Temps (min)	% B	Flux (ml min ⁻¹)
0	40	0,5
30	60	0,5
45	60	0,5
50	100	0,5
58	100	0,5
60	40	0,5



Mètode NP

Temps (min)	% B	Flux (ml min ⁻¹)
0	50	0,5
40	100	0,5
74	100	0,5
75	50	0,5
90	50	0,5

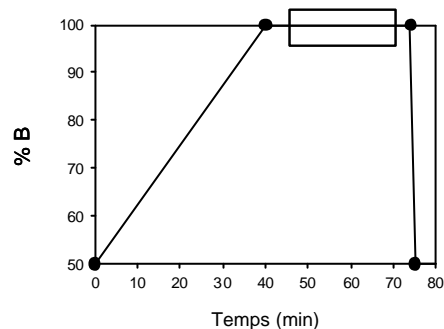


Figura 2.2. Gradients d'elució utilitzats seguint el mètode EP o NP d'HPLC fase reversa. Les zones marcades als gràfics indiquen el període d'elució de la majoria de carotenoides assajats amb ambdós mètodes.

Figure 2.2. Reversed-phase HPLC gradients used for the separation of carotenoids by two different methods. The boxes show the elution period of the carotenoids detected with both methods.

L'avantatge de la utilització del mètode EP fou poder estudiar els carotenoides bacterians, molt més apolars que les BCl_s, a través d'un mètode de cromatografia líquida capaç de proporcionar una bona resolució amb temps de retenció (t_R) relativament curts, inferiors a 45 min per tots els carotenoides assajats (Taula 3.3. Capítol 3). El mètode NP, en canvi, oferia l'avantatge que, si bé el temps total de carrera fou més llarg (75 min) no es perdia resolució en l'anàlisi de les BCl_s, ja que aquestes s'elueïen sota les mateixes condicions que en el mètode original (Borrego i Garcia-Gil, 1994). Aquest segon mètode, doncs, oferia un rendiment òptim en mostres complexes on interessa un anàlisi complet de tots els pigments presents a la mostra, BCl_s, Cls eucariotes o carotenoides. Aquest mètode va ser aplicat en l'estudi d'unes mostres de sediments antics, tal i com es descriu a la corresponent secció de resultats, així com a les mostres que varen ser analitzades durant la realització dels experiments de fisiologia (Capítol 4). En el cas de l'anàlisi dels paleosediments es va realitzar una segona modificació del mètode original (Borrego i García-Gil, 1994) per tal de facilitar la identificació dels derivats de BCl *e*. A més, la presència de traces d'aquest pigment i de derivats del mateix, va crear la necessitat d'obtenir estàndards artificials d'aquests pigments per tal de facilitar la seva posterior identificació a les mostres de sediments. Per obtenir aquests estàndards es va dur a terme una degradació artificial de BCl *e*, procedent d'un cultiu de *Chl. phaeobacteroides*, l'extracte del qual va ser obtingut segons el procediment descrit a l'apartat 2.4.1.

A la Taula 2.3 (veure Secció 2.4.5.4 de Material i Mètodes) es recullen els tipus de productes de degradació, derivats de la BCl *e*, identificats en els sediments objecte d'estudi.

2.4.3. Anàlisi qualitativa i quantitativa de les mostres

Els pigments presents a les diferents mostres es van identificar en base al seu espectre d'absorció i al corresponent t_R . Una vegada identificats, els diferents pigments es van quantificar integrant l'àrea definida pel pic en qüestió a la longitud d'ona corresponent a la màxima absorció del pigment. Les concentracions de cada pigment es van calcular a partir de les equacions i els coeficients d'extinció molar recollits a la Taula 2.2.

Taula 2.2. Equacions i coeficients d'extinció molar (ϵ) emprats pel càlcul de la concentració dels diferents pigments fotosintètics.

Taula 2.2. Equations and molar extinction coefficients (ϵ) used to calculate the concentration of the different photosynthetic pigments.

Pigment	Equació*	r^2	ϵ (l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
BCI a	[BCI a] (nmols) = $A_{771} (V \cdot s) / 4,4$	$r^2 = 0,9990$	62 (etanol absolut); Connolly <i>et al.</i> , 1982
	[BCI a] (nmols) = $A_{365} (V \cdot s) / 4,2$	$r^2 = 0,9990$	
BCI c	[BCI c] (nmols) = $A_{434} (V \cdot s) / 9,8$	$r^2 = 0,9990$	69 (metanol 100 %); Connolly <i>et al.</i> , 1982
	[BCI c] (nmols) = $A_{668} (V \cdot s) / 6,8$	$r^2 = 0,9990$	
BCI d	[BCI d] (nmols) = $A_{429} (V \cdot s) / 7,5$	$r^2 = 0,9994$	65 (metanol 100 %); Connolly <i>et al.</i> , 1982
	[BCI d] (nmols) = $A_{656} (V \cdot s) / 4,6$	$r^2 = 0,9996$	
BCI e	[BCI e] (nmols) = $A_{473} (V \cdot s) / 14,7$	$r^2 = 0,9996$	35 (metanol 100 %); Borrego <i>et al.</i> , 1999
	[BCI e] (nmols) = $A_{656} (V \cdot s) / 3,3$	$r^2 = 0,9999$	
Cl a	[Cl a] (nmols) = $A_{434} (V \cdot s) / 7,3$	$r^2 = 0,9977$	82,6 (acetona 100 %); Smith i Benitez, 1955
	[Cl a] (nmols) = $A_{663} (V \cdot s) / 6,1$	$r^2 = 0,9967$	
Cbt	[Cbt] (nmols) = $A_{463} (V \cdot s) / 16,5$	$r^2 = 0,9998$	152 (etanol absolut); Britton, 1995
Isr	[Isr] (nmols) = $A_{453} (V \cdot s) / 11,1$	$r^2 = 0,9991$	107 (metanol 100 %); Borrego <i>et al.</i> , 1999
Okn	[Okn] ($\mu\text{g ml}^{-1}$) = $A_{487} (V \cdot s) / 1,464$	$r^2 = 0,9990$	134 (èter de petroli); Britton, 1995

* Concentració injectada de cada pigment (en nmols o μg) en front de l'àrea total (en V·s) determinada per cada pigment a la longitud/s d'ona indicada.

2.4.4. Pre-purificació de carotenoides bacterians amb columnes d'alúmina

Es va posar en pràctica un protocol senzill i relativament ràpid de pre-purificació de carotenoides bacterians, per tal d'obtenir extractes pigmentaris lliures de BCl facilitant així llur posterior separació i anàlisi. Consistia en separar els pigments fotosintètics de les mostres, en base a les seves diferències de polaritat, mitjançant una columna cromatogràfica farcida de partícules d'alúmina. Les BCls, molècules molt més polars que els carotenoides, eren retingudes per les partícules de la fase estacionària, mentre que els carotenoides eren eluïts de la columna. Abans de la càrrega a la columna, l'extracte pigmentari era pre-purificat mitjançant separació de fases, amb l'objectiu d'eliminar en el major grau possible els pigments més polars, tal i com es descriu a continuació.

2.4.4.1. Pre-purificació per separació de fases

Partint de l'extracte d'acetona: metanol (7:2, vol:vol) de la mostra es va realitzar una separació de fases per mitjà d'un embut de decantació. La fase apolar (epifase) es va generar utilitzant èter de petroli, mentre que la fase polar (hipofase) consistia en una solució aquosa de NaCl 1 M.

Per la creació de les fases, la mostra (extracte d'acetona: metanol) es carregava a l'embut, afegint a continuació un volum aproximadament equivalent d'èter de petroli. Després d'homogeneïtzar la barreja es va obtenir una sola fase. Tot seguit s'afegia un volum de la solució aquosa de NaCl 1 M, equivalent al volum de mostra més èter de petroli prèviament addicionat, i es tornava a mesclar el contingut de l'embut agitant-lo vigorosament. Les dues fases eren clarament diferenciables gràcies a l'addició de la sal (interfase).

El següent pas consistia en eliminar l'hipofase, on quedaven retingudes les molècules de caràcter més hidrofílic (BCIs). A continuació es tornava a addicionar un volum de NaCl 1 M, solució aquosa equivalent a l'anterior, es repetia l'agitació de l'embut i s'eliminava de nou la fase inferior. Aquest procés de rentat es repetia una altra vegada, per tal d'assegurar l'eliminació dels pigments més polars.

Finalment, abans d'eliminar l'epifase que retenia les molècules de caràcter més apolar (carotenoides), les tres hipofases recollides eren carregades conjuntament a l'embut, el qual era novament agitat. L'objectiu d'aquest darrer rentat va ser evitar la possible pèrdua dels carotenoides de caràcter més polar amb alguna de les hipofases anteriorment rebutjades. Després d'eliminar aquesta darrera hipofase es recollia l'epifase en un matràs Erlenmeyer i es dessecava sota flux de nitrogen.

Durant tota la manipulació es va treballar a temperatura ambient i preservant les mostres de la llum directa per evitar la fotooxidació. Un cop dessecada es guardava a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de ser carregada a la columna d'alúmina.

2.4.4.2. Preparació de les columnes d'alúmina

Es tractava d'una columna cromatogràfica construïda amb una pipeta Pasteur que es va deixar actuar sota pressió atmosfèrica. La fase estacionària estava formada per partícules d'alúmina (Al_2O_3 , Panreac). Per l'elució es va utilitzar una mescla de petroli i èter dietílic (73:27, vol:vol).

L'empaquetament de la columna es va realitzar mitjançant la mescla no homogènia de les partícules d'alúmina amb èter de petroli. Abans de realitzar l'esmentada barreja va ser necessària l'activació de l'alúmina, procés que s'aconsegueix afegint 60 μl d'aigua a 1 g d'alúmina abans d'addicionar l'èter de petroli.

Una vegada preparada la columna es va procedir a carregar la mostra, prèviament redissolta en èter de petroli: diclorometà (9:1, vol:vol). Immediatament després de la seva càrrega es va observar l'aparició d'un anell de color verd intens format per BCl_s, a l'inici del revestiment de la columna. Això era degut, malgrat la prèvia pre-purificació per separació de fases, a restes de BCl que podien haver quedat retingudes a la fase apolar en forma d'agregats. A continuació es podia visualitzar una banda de tonalitat groguenca corresponent als carotenoides. Per facilitar l'elució d'aquesta banda específica en carotenoides s'utilitzà com a fase mòbil èter de petroli: èter dietílic (73:27, vol:vol), solució que va ser carregada a la columna després de l'aparició de l'esmentada banda groguenca. Durant tot el procés cromatogràfic les mostres es van preservar de la llum per evitar la fotooxidació dels pigments alhora que les manipulacions es van dur a terme a temperatura ambient.

El flux estimat d'elució era d'aproximadament 200 $\mu\text{l min}^{-1}$, i segons el volum de mostra carregada, després d'aproximadament 20 min, s'aconseguia la completa elució dels carotenoides. Aquests eren dessecats amb nitrogen i guardats a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ fins al moment de la seva anàlisi.

Abans de la injecció a l'HPLC els pigments dessecats eren redissolts en acetona: metanol (7:2, vol:vol) que s'utilitzava com a solvent d'injecció. Els diferents pics es van identificar en base al seu espectre d'absorció i al seu t_R , comparant-los amb els obtinguts en treballs anteriors (Borrego i Garcia-Gil, 1994).

2.4.5. Anàlisi de pigments en sediments lacustres antics

En aquest treball es van estudiar els pigments fotosintètics presents a uns sediments, lacustres antics, datats entre 0,7 i 1,5 milions d'anys d'antiguitat (Bech, 1970; Leroy, 1988). El material geològic del qual es van extreure els pigments correspon a l'era quaternària, concretament a una etapa del període Interglacial del Pleistocè Inferior anomenada Waalià (Leroy, 1986).

2.4.5.1. Zona d'estudi

Les mostres de sediments es van obtenir en una antiga pedrera (bòbila), actualment no explotada, d'una fàbrica de rajoles. Aquesta bòbila es troba situada al Km 16,2 de la carretera Banyoles-Olot, zona propera a l'estany de Banyoles (Bech, 1970) (Figura 2.3).

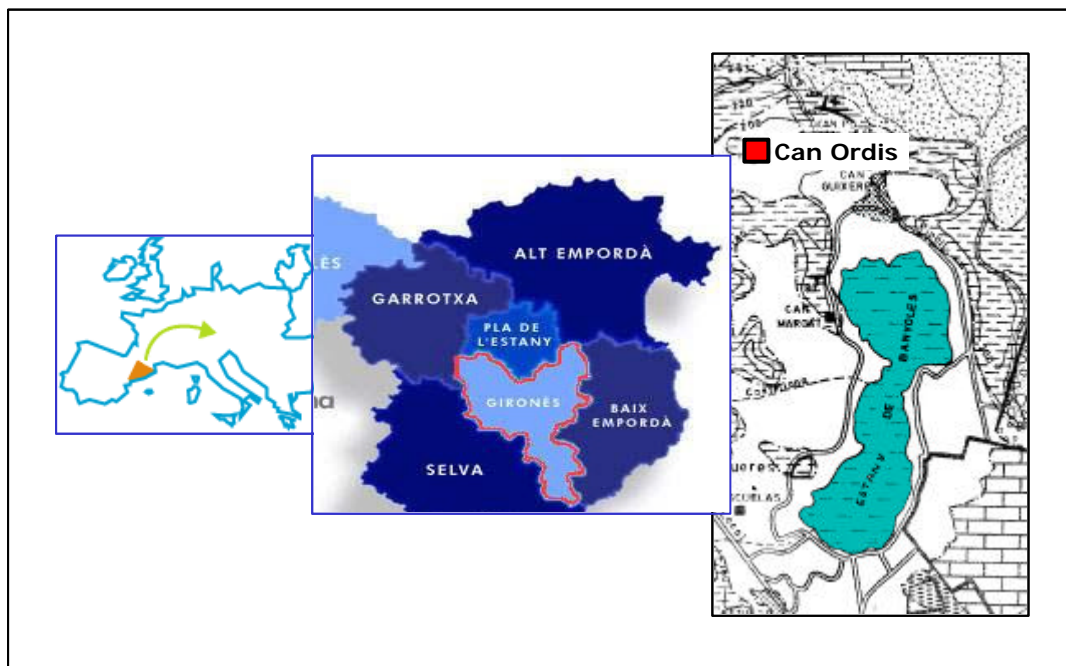


Figura 2.3. Localització de la bòbila de Can Ordis, d'on es van recol·lectar els sediments estudiats (modificat de Julià, 1980).

Figure 2.3. Location of the quarry where the studied sediments were collected (modified from Julià, 1980).

2.4.5.2. *Mostratge i caracterització de les mostres*

El material es va obtenir d'una gran paret, d'uns 50 m d'alçada, amb una amplada d'aproximadament 200 m, formada a partir d'un material compacte i negrós, de caràcter argilós i sense una clara continuïtat lateral (Bech, 1970).

El color negre d'aquest material és degut segurament a processos de reducció en condicions anaeròbiques, amb formació de sulfurs i a restes de carbonització (formació de lignit i turba). Aquest indret va ser originat a partir d'un succés pantanós local i no a partir d'un fenomen lacustre global, el qual hauria estat responsable de la formació del llac de Banyoles (Bech, 1970).

Els blocs recollits, d'aproximadament 20–30 cm³ es van obtenir després de perforar la paret amb una pala, essent descartats els primers 30–50 cm de profunditat per tal d'evitar la contaminació dels sediments amb vegetació i amb material oxidat de la superfície (Figura 2.4 A). Immediatament després de la seva obtenció el material recollit es va traslladar al laboratori preservat de la llum. Fins al moment de ser utilitzades les mostres es varen dipositar en recipients de plàstic hermèticament tancats i es van guardar en una cambra d'anaerobiosi Heraeus WA6100, per evitar l'oxidació de la mostra. Les mostres que no havien de ser ràpidament emprades es mantingueren a –80 °C.

2.4.5.3. *Extracció dels pigments*

Per l'obtenció dels extractes s'utilitzaren les parts internes dels blocs de material recollit, tallant amb una espàtula per rebutjar les parts més perifèriques del bloc (Figura 2.4 B). D'aquesta manera es van recollir 20 g de sediment, tallat en petites i fines làmines, i es van dipositar en tubs de 50 ml preservats de la llum amb paper d'alumini. A continuació es van afegir 30 ml d'acetona: metanol (7:2, vol:vol). La barreja s'homogeneïtzava a la foscor, per evitar la degradació dels pigments. L'homogenat, de consistència pastosa, es guardava durant 12 hores a –20 °C.

Passat aquest període la mescla es centrifugava durant 20 min a 17.210 × g. El sobrenedant que s'obtenia era d'un color groguenc, fet que indicava la presència de pigments fotosintètics, especialment carotenoides. Atès que el sediment de centrifugació encara podia presentar pigments, es va repetir l'extracció dues vegades més, per assegurar-ne la

completa extracció. Finalment, els tres sobrenedants recollits es van barrejar i dessecar mitjançant un rotoevaporador treballant a 40 °C. Els pigments dessecats es van guardar a – 80 °C, sota atmosfera de nitrogen, fins al moment de l'anàlisi.



Figura 2.4. Blocs de sediments de la bòbila Ordis (A) i interior d'un dels blocs a partir del qual es va obtenir mostra per a realitzar l'extracció de pigments (B).

Figure 2.4. Sediments from the Ordis quarry (A) and section of one sediment fragment. Pigments extract was obtained from this section (B).

L'anàlisi qualitativa i quantitativa dels pigments també fou realitzada seguint el que ha estat descrit en l'Apartat 2.4.3. El mètode d'HPLC emprat per l'anàlisi dels carotenoides fou el mètode NP, mentre que per la BCl *e* i els seus derivats s'utilitzaren lleugeres modificacions del gradient per facilitar l'anàlisi dels pics corresponents als derivats de la BCl *e*, sobretot les bacterioclorofil·lides (BClds). Aquesta modificació (Figura 2.5) consistia en retardar la sortida de les BClds i d'altres derivats de la BCl *e*, de caràcter molt més polar que els carotenoides, aconseguint que les condicions d'inici de la carrera cromatogràfica fossin més polars (Mètode DB). El programa d'elució consistia en un augment lineal del solvent B del 0 al 100 %, aconseguit en 30 min, seguit de 44 min al 100 % de B. Amb 1 min s'assolia el 50 % de B, condicions en les quals finalitzava la carrera.

Mètode DB

Temps (min)	% B	Flux (ml min ⁻¹)
0	0	0,5
30	100	0,5
74	100	0,5
75	50	0,5
90	50	0,5

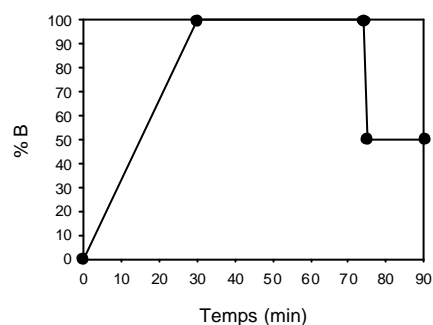


Figura 2.5. Programa del gradient d'HPLC (mètode DB).

Figure 2.5. HPLC gradient (method DB).

2.4.5.4. Obtenció d'estàndards externs per a la identificació dels derivats de BCl *e*

La presència de traces de BCl *e* i de derivats de la mateixa als sediments objecte d'estudi va crear la necessitat d'obtenir estàndards artificials d'aquests pigments per tal de facilitar la seva posterior identificació a les mostres de sediments. Per obtenir aquests estàndards es va dur a terme una degradació artificial de BCl *e*, procedent d'un cultiu de *Chl. phaeobacteroides*, l'extracte del qual va ser obtingut segons el procediment descrit a l'apartat 2.4.1.

A la Taula 2.3 es recullen els tipus de productes de degradació, derivats de la BCl *e*, identificats en els sediments estudiats.

Taula 2.3. Descripció dels principals productes de degradació de la BCl *e*.

Table 2.3. Description of the main degradation products from BChl e.

Molècula	Descripció
BCl ϵ_F	Bacterioclorofil-la <i>e</i> esterificada amb farnesil (C ₂₀ H ₄₀ O)
BClds	Porfirines de BCl (Bacterioclorofil·lides): molècules de BCl sense l'alcohol esterificat al C-17
BPhe	Bacteriofeofitina: molècula de BCl on l'àtom de Mg ²⁺ de l'anell tetrapirròlic es troba substituït per un H ⁺
BPheb	Porfirines de BPhe (Bacteriofeoforbides): molècules de BPhe sense l'alcohol esterificat al C-17 i on l'àtom de Mg ²⁺ de l'anell tetrapirròlic es troba substituït per un H ⁺

Per a l'obtenció dels estàndards es va realitzar un tractament amb KOH (1 %) en metanol al qual foren sotmesos diferents extractes procedents de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 crescut en medi Pfennig (Apartat 2.2.1). La reacció es va deixar actuar durant tota la nit, a la foscor i a temperatura ambient, per tal d'assegurar la digestió dels alcohols per part del KOH-metanol. Amb aquest primer tractament s'obtingueren les molècules lliures de l'alcohol, és a dir les BClds. Per l'obtenció de les BPheb, d'altra banda, és a dir, per l'eliminació de l'àtom de Mg²⁺ de l'anell tetrapirròlic, va ser necessària l'addició de HCl 1 M sobre els extractes prèviament digerits amb KOH-metanol. Aquests estàndards, al igual que l'extracte dels sediments, es van injectar amb el mètode DB d'HPLC fase reversa descrit a l'apartat anterior (2.4.5.3).

2.5. Identificació dels carotenoides de *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses

La identificació dels carotenoides de les espècies marrons de GSB mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS/M) es va dur a terme d'acord amb el mètode descrit per Airs *et al.* (2001).

La mostra analitzada va ser un extracte pigmentari de la soca *Chl. phaeobacteroides* CL1401, el cultiu de la qual va ser incubat sota la il·luminació de dues làmpades Phillips SL25 en condicions anaeròbiques, tal i com s'ha detallat a l'apartat 2.7. Les cèl·lules es van obtenir per centrifugació del cultiu després de dues setmanes de creixement. L'extracció dels pigments fotosintètics (BCIs i carotenoides) es va dur a terme utilitzant una barreja d'acetona: metanol (veure Secció 2.4.1). L'extracte obtingut es va assecar utilitzant un rotoevaporador i tot seguit es va realitzar una extracció selectiva dels carotenoides presents a la mostra mitjançant l'addició d'hexà. L'extracte d'hexà va ser posteriorment carregat en un embut de decantació en el qual es varen dur a terme dos rentats consecutius amb aigua destil·lada saturada amb clorur sòdic per tal de separar la fase aquosa on s'acumulaven les traces de BCIs de la fase apolar (hexà) rica en carotenoides. Una vegada purificat, l'extracte d'hexà es dessecava amb nitrogen gas i posteriorment es congelava a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de ser analitzat.

2.6. Variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides de *Chl.*

***phaeobacteroides* CL1401 sota diferents condicions d'il·luminació i potencial redòx**

L'obtenció dels extractes dels cultius de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 es va realitzar d'acord al que s'ha descrit a l'Apartat 2.4.1. L'experiment va consistir en analitzar el mateix extracte de l'esmentada espècie després de diferents temps d'exposició a la llum ($80\text{ }\mu\text{mol s}^{-2}\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) amb l'objectiu d'estudiar possibles canvis en el contingut de pigments, fent especial èmfasi en l'evolució de les relacions entre els isòmers *trans/cis* dels carotenoides. Els temps d'exposició analitzats foren de: 0, 30, 60, 90, 120, 240, 480 i 720 minuts. Les mostres que no podien ser immediatament analitzades al temps corresponent, és a dir, al minut al qual eren retirades de la llum, es mantenien a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de ser injectades.

De forma paral·lela, un extracte de la mateixa espècie marró va ser incubat durant 24 h a les fosques i se'n prengueren mostres en els mateixos temps que per l'extracte exposat a la llum. També en aquest cas, les mostres que no podien ser injectades immediatament es mantingueren a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de l'anàlisi.

D'altra banda, per avaluar la influència del caràcter oxidant o reductor del medi, l'extracte va ser tractat amb agents oxidants (peròxid d'hidrogen i dimetilsulfòxid) i reductors (àcid ascòrbic i ditionit sòdic) per avaluar com afecten aquests a la composició qualitativa de pigments. L'obtenció i processament de les mostres per ser analitzades mitjançant HPLC ja s'ha descrit a la Secció 2.4.1 de Material i Mètodes.

La concentració final a la qual es van utilitzar aquests agents fou de 10 mM, amb excepció del ditionit sòdic pel qual també s'assajaren d'altres concentracions (veure Apartat 3.2.3). A la Taula 2.4 es llisten tots els agents utilitzats, així com les concentracions a les quals foren emprats.

Taula 2.4. Compostos químics emprats com a agents oxidants i reductors i concentracions assajades.

Table 2.4. Oxidising and reducing chemicals used and concentrations assayed.

Compost	Caràcter	Concentracions assajades (mM)
Dimetilsulfòxid	oxidant	10
Peròxid d'hidrogen	oxidant	10
Àcid L-(+) ascòrbic	reductor	10
Ditionit sòdic	reductor	5, 10, 20 i 40

2.7. Disseny experimental i processament de les mostres pels experiments d'adaptació lumínica

Les soques utilitzades per a la realització dels experiments de fisiologia foren *Chl. phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* UdG6030, *Chl. limicola* UdG6038 i *Prosthecochloris aestuarii* CE2404. En tots els casos es partí d'un cultiu dens de cada soca, pre-adaptat a les condicions lumíniques testades, a partir del qual s'inocularen, per duplicat, les corresponents ampolles de cultiu (inòcul final del 10 %). Els dos tractaments lumínics aplicats, $1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, s'aconseguien amb la il·luminació contínua proporcionada per una làmpada fluorescent de 25 W (Philips SL-25). La intensitat lumínica a l'interior de la cambra d'incubació fou mesurada amb un espectreradiòmetre. Les dues intensitats de llum es van aconseguir variant la posició de les ampolles respecte la font de llum a l'interior de l'incubador.

El disseny experimental que es detalla a continuació és vàlid per totes les soques estudiades i pels dos tractaments lumínics realitzats. La principal diferència entre les soques i sobretot entre les dues condicions lumíniques assajades fou la freqüència de mostratge, ja que les taxes de creixement foren diferents en cada cas (veure Capítol 4).

2.7.1. Presa de mostres

Durant el creixement dels cultius es van anar prenent mostres a diferents intervals de temps. A cada temps es realitzava un espectre d'absorció *in vivo* (350-900 nm) amb un espectrefotòmetre, així com observacions amb microscopi òptic per determinar l'estat cel·lular dels diferents cultius al llarg del creixement. Després de cada mostratge s'afegia nitrogen gas al cultiu, mitjançant una xeringa estèril, per evitar l'oxigenació del cultiu i, per tant, evitar-ne el possible efecte tòxic sobre les cèl·lules. També s'afegia sulfhídric a una concentració final de $100 \mu\text{M}$ per assegurar les condicions reductores del medi i proporcionar una font de poder reductor pel creixement.

Una vegada presa la mostra es procedia segons el que es descriu a continuació.

2.7.2. Processament de les mostres

Cada mostra consistia en 10 ml del cultiu que eren centrifugats a $23.000 \times g$ durant 30 min. A partir del sediment de centrifugació es realitzava l'extracció dels pigments fotosintètics, afegint 5 ml d'acetona: metanol (7:2, vol:vol) i sonicant durant 2 min. A continuació l'homogenat era guardat a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 24 hores per assegurar una completa extracció dels pigments. Després d'aquest interval, els extractes eren centrifugats a $23.000 \times g$ durant 30 min per eliminar les restes cel·lulars. L'extracció es repetia fins que el sediment de centrifugació esdevenia incolor. Per evitar la fotooxidació dels pigments totes les manipulacions de les mostres es dugueren a terme preservant-les de la llum i a temperatura ambient.

2.7.2.1. *Determinació de la concentració de proteïnes*

Per a la determinació de la concentració de proteïnes es va utilitzar el mètode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), consistent en l'estimació de la proteïna present en una mostra en base al seu contingut en aminoàcids aromàtics. La reacció final és una combinació de reaccions. D'una banda, una reacció Biuret de les proteïnes amb el coure i, d'altra banda, la reducció de l'àcid fosfomolibdic-fosfotúngstic del reactiu de Folin per part dels residus aromàtics dels aminoàcids tirosina i triptòfan de les proteïnes.

Els sediments de centrifugació, lliures de pigments, eren sotmesos a una digestió bàsica ressuspenent-los en un determinat volum de NaOH 1 M, mitjançant sonicació suau. Posteriorment eren col·locats en un bany a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. A una alíquota de cada mostra digerida, prèviament refredada a temperatura ambient, s'afegien 5 ml de Reactiu A (100 ml de Na_2CO_3 al 2 % + 1 ml de CuSO_4 a l'1 % + 1 ml de tartrat NaK al 2 %). A continuació la mescla era agitada amb un vòrtex i es deixava reposar durant 10 min. Transcorregut aquest període s'afegia 0,5 ml de Reactiu B (reactiu de Folin-Ciocalteu) agitant simultàniament amb el vòrtex. Les mostres problema eren llegides a l'espectrofotòmetre (A_{663}) després de 30 minuts.

La concentració de proteïna fou calculada mitjançant una recta patró realitzada a partir de dilucions seriades d'una solució d'albumina de sèrum boví d'1 mg ml^{-1} . La patró es preparava abans de cada anàlisi.

2.8. Mètodes de Camp

2.8.1. Zona d'estudi

Amb l'objectiu de realitzar anàlisis comparatives entre cultius purs i mostres de camp, es va escollir un ecosistema aquàtic, concretament l'estanyol del Vilar, dins el sistema càrstic de Banyoles, per obtenir mostres de camp amb presència d'espècies marrons de GSB. L'estanyol del Vilar ha estat considerat com a meromíic eutròfic (Abellà, 1980). Es troba situat al SW de l'eix longitudinal de l'estany de Banyoles (42°07' latitud Nord, 2°45' longitud Est) i presenta dues cubetes circulars, conegudes com Vilar-I i Vilar-II, de 10 i 9 m, respectivament, amb entrada d'aigua subterrània i sediment en suspensió. Tots els mostratges varen ser realitzats a la primera cubeta (Vilar-I) (Figura 2.6).

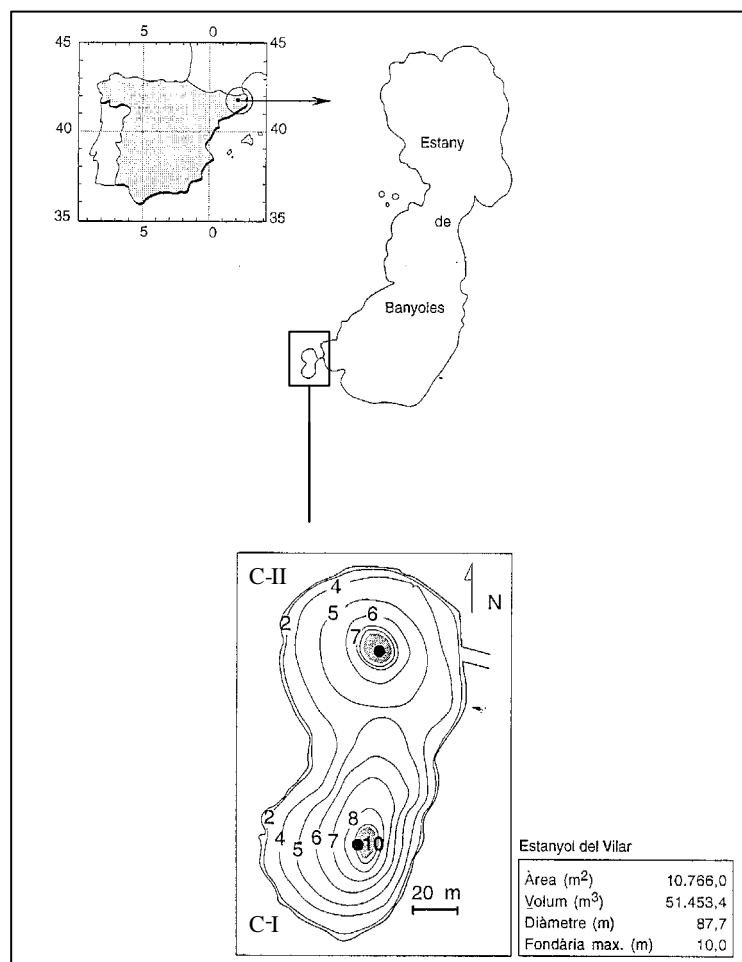


Figura 2.6. Localització i mapa batimètric de l'estanyol del Vilar (modificat de Bañeras, 1996).

Figure 2.6. Bathymetric map of Lake Vilar (modified from Bañeras, 1996).

2.8.2. Mostratge

Els mostratges a la cubeta I del Vilar es van realitzar amb una periodicitat aproximada d'uns 15 dies, durant el període d'estratificació tèrmica estival. Els primers mostratges foren realitzats al maig del 2000 i el darrer correspon al setembre del mateix any.

La presa de mostres es duia a terme sobre el punt de màxima fondària de l'estanyol i es realitzava amb el sistema de bombeig descrit per Jørgensen *et al.* (1979). Aquest sistema consistia en un doble conus de metacrilat unit a un tub de goma i connectat a una bomba impel·lent, la qual era alimentada per una bateria de 12 V (Figura 2.7). Amb aquest sistema s'assegurava l'obtenció de l'aigua sense el trencament de l'estratificació de les poblacions de bacteris fotosintètics estudiades, que es disposen en làmines molt denses però de molt pocs centímetres de gruix. Gràcies a aquest sistema l'extracció de l'aigua seguia un flux laminar, imprescindible alhora de mostrejar a la zona del gradient sense pertorbar-la en excés.

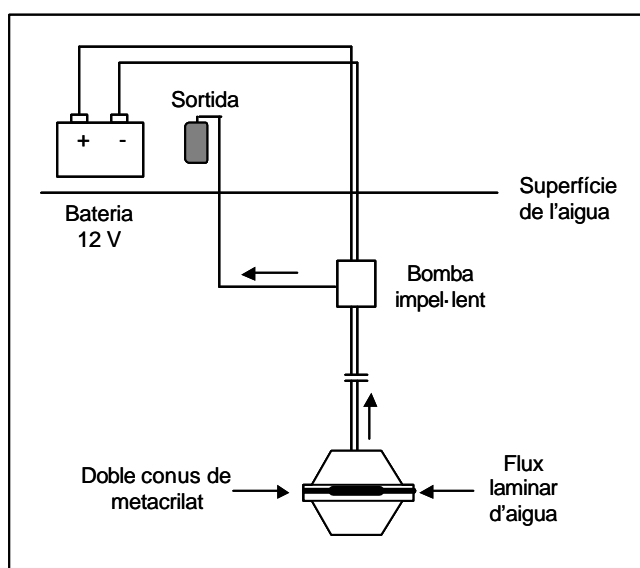


Figura 2.7. Sistema de doble conus utilitzat pel mostreig d'aigua de diferents fondàries (modificat de Borrego, 1996).

Figure 2.7. Sampling device used to collect water samples from different depths (modified from Borrego, 1996).

Durant cada mostratge, i previ a la presa de mostres de les fondàries d'interès, es mesuraven in situ un seguit de paràmetres físics (temperatura i conductivitat) i químics (pH, potencial d'oxidoreducció i oxigen dissolt) per tal de localitzar exactament la zona de gradient físico-químic i la interfase O₂/H₂S. Aquestes mesures es van realitzar amb una sonda multiparamètrica equipada amb un agitador magnètic per trencar gradients durant la lectura de la concentració d'oxigen.

2.8.3. Anàlisis químiques

Per l'anàlisi de sulfhídric es va utilitzar el mètode colorimètric del blau de leucometilè (Pachmayr, 1960) modificat segons Brock *et al.* (1971). Aquest mètode es basa en la capacitat del sulfur, sota condicions àcides, de reaccionar amb sulfat fèrric amònic i formar blau de leucometilè. Aquesta reacció és específica pel sulfhídric. Les mostres, corresponents a les fondàries d'interès, eren fixades al camp amb NaOH 1 M i acetat de zinc 1 M. Les concentracions de sulfhídric es van calcular a partir d'una recta patró realitzada amb concentracions conegudes de H₂S a partir de dilucions seriadades d'una solució 100 mM de H₂S.

2.8.4. Anàlisis biològiques

Les mostres d'aigua, transportades en fred i en condicions de foscor al laboratori, eren filtrades per a la posterior extracció de pigments. Prèviament se'n guardaven alíquotes per a una observació directa al microscopi òptic i una altra part era centrifugada per posteriorment realitzar extracció d'ADN, segons el protocol descrit a l'Apartat 2.9.1.

2.8.4.1. *Extracció i anàlisis dels pigments*

Per a l'extracció de pigments en mostres de camp es va utilitzar el mètode descrit per Guerrero *et al.* (1985). Es filtrava un volum conegut de cada mostra, a través de filtres de nitrat de cel·lulosa Supor-450, de 0,45 µm de diàmetre de porus, prèviament coberts amb un petit volum de MgCO₃ al 2,5 % per evitar el col·lapsament del filtre i la degradació àcida dels pigments (Humphrey i Wooton, 1966; Montesinos, 1982). El material retintut es ressuspenia en un volum conegut d'acetona: metanol (7:2) i la resta de l'anàlisi es realitzava seguint el que ha estat prèviament descrit als Apartats 2.4.1–2.4.3.

2.8.4.2. Recompte de poblacions de bacteris fotosintètics mitjançant citometria de flux

Pel recompte de les poblacions fotosintètiques presents a les mostres de camp es va utilitzar la citometria de flux. El citòmetre emprat en aquest treball fou un Becton Dickinson *FACSCalibur*, el sistema del qual estava sota el control d'un ordinador Apple Macintosh Quadra 950 amb sistema operatiu Mac-OS 7.1. L'adquisició de les dades fou mitjançant el programari *CellQuest*TM (Becton Dickinson) i l'anàlisi de les mateixes gràcies al programari *Paint-A-Gate*^{PRO}TM (Becton Dickinson).

Les mostres analitzades eren prèviament fixades al camp amb una concentració final de tampó de fixació de l'1 %. La composició del tampó fou paraformaldehid al 10 % i glutaraldehid al 0,5 %. Per un volum de 500 ml s'afegien 50 g de paraformaldehid, 2,5 ml de glutaraldehid i 1,5 ml de NaOH 1 M. Per facilitar la completa dissolució del paraformaldehid (en uns 400 ml d'aigua destil·lada) l'agitació s'alternava amb el manteniment de la solució en un bany a 55–65 °C. Un cop dissolt es deixava refredar a temperatura ambient i s'afegien 50 ml de PBS 10× a pH 7,2. Finalment s'ajustava el pH a 7,2–7,4 amb HCl concentrat i s'enrasava fins a un volum final de 500 ml. El tampó es mantenia a –20 °C, prèviament distribuït en tubs de 10 ml, fins al moment de ser utilitzat.

L'anàlisi de les mostres es feia durant la primera setmana després de la fixació per a minimitzar les pèrdues de fluorescència degudes a l'efecte del fixador (Gasol i Giorgio, 2000).

Pel recompte de les mostres va ser necessària la utilització d'un estàndard intern consistent en una solució de boletes fluorescents de polipropilè, d'1 µm de diàmetre (Molecular Probes), la qual s'afegia, a concentració coneguda, juntament a la mostra en el tub del citòmetre, just abans de l'anàlisi, en una proporció 1:500 (1 µl de boletes en 0,5 ml de mostra). En cas que la mostra presentés una concentració de microorganismes molt elevada es partia de 0,5 ml d'una dilució 1:10 o 1:100 respecte la mostra original.

La solució de boletes es preparava d'acord al següent protocol (Cristina, 2000):

1. Sonicar la solució original de boletes (aprox. 6×10^5 boles/ml) durant 5 min al bany sonicador (ULTRASONS, 50 Hz, Selecta).
2. Rensusprendre 10 μ l de la solució original de boletes en 990 μ l d'aigua MilliQ estèril.
3. Barrejar durant uns segons i mantenir a 4 °C fins al moment del seu ús.

El recompte de la solució de boletes es feia seguint els següents passos (Cristina, 2000):

1. Preparar la rampa de filtració.
2. Posar sobre la rampa un filtre de nitrocel·lulosa (0,45 μ m, 25 mm, Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich., USA) i a sobre el filtre de tipus *nucleopore* (0,22 μ m, MSI).
3. Filtrar 2,5 μ m de boletes, de la solució prèviament preparada, en 1 ml d'aigua MilliQ estèril per assegurar una dispersió homogènia sobre el filtre.
4. Treure el filtre i deixar-lo assecat sobre un paper secant.
5. Muntar el filtre sobre un portaobjectes aplicant una gota de glicerol o oli d'immersió a sobre i a sota del filtre i tancar amb un cobreobjectes (24 \times 60 mm).
6. Observar la mostra al microscopi d'epifluorescència (a 1000 \times) utilitzant un filtre específic per fluoresceïna (excitació blava, emissió blau-verd) o per Cy3 (excitació verda, emissió taronja).
7. Recomptar un mínim de 20 camps.
8. Calcular el nombre de boletes aplicant la següent fórmula:

$$[\text{Boletes/ml}] = X * (A/C) * 400$$

X = mitjana de boletes per camp contat

A = àrea de filtració ($2,37 \times 10^{-2}$ mm² en una torreta de filtració Afora mod.5808/2)

C = àrea del camp d'observació (1×10^{-2} μ m²) (a 1000 \times)

400 = 1/0,0025 ml, volum filtrat

2.9. Mètodes de biologia molecular

2.9.1. Extracció d'ADN genòmic a partir d'un cultiu bacterià

L'extracció d'ADN genòmic a partir de cultius de GSB es va fer d'acord amb el protocol descrit pel *WizardTM Genomic DNA purification kit* (Promega) amb lleugeres modificacions pel que fa a alguns temps d'incubació.

Els passos a seguir varen ser els que es llisten a continuació:

1. Centrifugar 1 ml de cultiu a 10.000 rpm durant 10 min en un *ependorf* estèril.
2. Afegir 600 µl de solució per a la lisi dels àcids nucleics. Agitar suaument amb la punta de la pipeta automàtica.
3. Incubar a 80 °C durant 20 min i deixar refredar a temperatura ambient.
4. Afegir 3 µl de solució ARNasa. Barrejar suaument per inversió.
5. Incubar a 37 °C durant 60 min i deixar refredar a temperatura ambient.
6. Afegir 200 µl de solució per a la precipitació de proteïnes. Barrejar fortament amb el vòrtex durant uns 20 s.
7. Deixar reposar en gel durant 5 min.
8. Centrifugar a 13.000–16.000 rpm durant 3 min.
9. Transferir el sobrenedant a un altre *ependorf* estèril.
10. Afegir 600 µl d'isopropanol. Barrejar per inversió fins que es vegi una massa d'ADN.
11. Deixar precipitar l'ADN (2 h, com a mínim, o *overnight* a –20 °C).
12. Centrifugar a 13.000–16.000 rpm durant 2 min.
13. Eliminar el sobrenedant (amb trompa d'aigua o amb pipetes pasteur). Deixar assecar l'*ependorf*.
14. Afegir 600 µl d'etanol 70 %. Barrejar per inversió.
15. Centrifugar a 13.000–16.000 rpm durant 2 min.
16. Eliminar el sobrenedant (amb trompa d'aigua o amb pipetes pasteur). Deixar assecar l'*ependorf* uns 10-15 min a temperatura ambient.
17. Afegir 100 µl d'aigua destil·lada estèril. Agitar suaument amb la punta de la pipeta automàtica.
18. Incubar perquè es rehidrati (1 h a 65 °C o *overnight* a temperatura ambient).
19. Mantenir la mostra a –20 °C fins al moment de ser utilitzada.

Per a l'extracció d'ADN de mostres naturals i de volums de cultiu superiors a 1 ml (massa cel·lular provinent de 20–50 ml de cultiu) el protocol emprat fou el següent:

1. Ressusprendre les cèl·lules en 20 ml de tampó S (100 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1 % CTAB). Les cèl·lules s'obtenien prèviament per centrifugació (a 15.000 rpm durant 20 min, rotor SS34 de la Sorvall RC-5B) a partir de 50 ml de cultiu.
2. Afegir 100 µl de proteinasa K (10 µg/µl) i vortejar per desfer els grumolls.
3. Afegir 20 ml de SDS 20 % i barrejar suaument per inversió. Incubar a 65 °C durant 5 h tot barrejant per inversió cada 30 min. Deixar refredar durant uns 5 min.
4. Afegir 10 ml de fenol i 10 ml de Cl (Cloroform: alcohol isoamílic, 24:1) i barrejar per inversió durant 5–10 min.
5. Centrifugar a 15.000 rpm durant 10 min (rotor SS34. Sorvall RC-5B). Recollir la fase aquosa (queda situada a la part superficial del tub, per sobre la interfase lipídica i la fase orgànica situada al fons del tub) i transferir-la a un nou tub estèril.
6. Afegir 20 ml de Cl i barrejar per inversió durant 5 min.
7. Centrifugar a 15.000 rpm durant 10 min (rotor SS34. Sorvall RC-5B) i transferir de nou la fase aquosa a un nou tub estèril.
8. Afegir 0,6 vol. d'isopropanol i barrejar per inversió. Deixar overnight a –20 °C.

2.9.2. Neteja i purificació d'ADN

Per poder treballar amb l'ADN extret de les diferents mostres calia, en funció de la utilització d'aquestes, un tractament previ de neteja i/o purificació. A continuació es detallen els mètodes utilitzats en cada cas.

2.9.2.1. *Precipitació amb etanol*

El mètode més emprat per a la concentració de l'ADN és la precipitació amb etanol i sals (Sambrook *et al.*, 1989) seguida d'una neteja amb etanol al 70 % i una precipitació per centrifugació (Shapiro, 1981). Aquest protocol va ser emprat després de les etapes finals de l'extracció, prèviament a la quantificació de l'ADN. Els passos a seguir foren els següents:

1. Mesclar 1 vol. de la solució aquosa amb 0,1 vol. d'acetat sòdic 3 M (pH 5,2) i 2 vol. d'etanol absolut fred.
2. Deixar reposar 10 min a temperatura ambient.
3. Precipitar l'ADN centrifugant 10 min a 12.000 rpm.
4. Aspirar el sobrenedant amb compte de no ressuspèndre el sediment de centrifugació.
5. Afegir 700 µl d'etanol al 70 %.
6. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm.
7. Aspirar l'etanol al 70 % amb compte de no ressuspèndre el sediment de centrifugació.
8. Deixar evaporar l'etanol a temperatura ambient.
9. Dissoldre el sediment de centrifugació d'ADN amb el volum desitjat (25–50 µl) d'aigua Milli-Q estèril.

2.9.2.2. Recuperació de bandes d'ADN de gels d'agarosa

Els productes amplificats per PCR que presentaven les bandes d'interès (amb un nombre de parell de bases esperat) juntament a bandes corresponents a amplificacions inespecífiques, fruit de la utilització d'encebadors degenerats (veure Capítol 5), eren separats mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa a l'1,5 %. El gel es deixava córrer durant 1 h a 80 V i les bandes d'interès s'extreien del gel retallant-les mitjançant un bisturí estèril.

Per a l'extracció de l'ADN de les bandes d'agarosa es va utilitzar el *ConcertTM purification kit*. Els passos que es següen foren els següents:

1. Pesar cadascuna de les bandes retallades en un *ependorf* estèril prèviament tarat.
2. Afegir 30 µl de tampó de solubilització del gel (L1) per cada 10 mg de gel.
3. Deixar fondre l'agarosa en un bany a 50 °C durant 15 min. Barrejar cada 5 min per assegurar la completa dissolució del gel.
4. Dipositar cada mostra dins una columna Concert, prèviament col·locades dins els tubs de 2 ml.
5. Centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min i descartar l'efluent.
6. Afegir 500 µl del tampó L1 a la columna. Incubar 1 min a temperatura ambient.
7. Centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min i descartar l'efluent.
8. Afegir 700 µl del tampó de rentat (L2) a la columna i incubar durant 5 min a temperatura ambient.
9. Centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min i descartar l'efluent. Centrifugar per segona vegada, també durant 1 min, per eliminar restes del tampó de rentat.
10. Dipositar les columnes en *ependorfs* estèrils i afegir-hi 50 µl de tampó TE atemperat a 70 °C al centre de la columna. Incubar durant 1 min a temperatura ambient.
11. Centrifugar a 14.000 rpm durant 2 min i guardar l'efluent, que conté l'ADN, a -20 °C.

2.9.2.3. Neteja de productes de PCR

Per la neteja de fragments curts (400–600 pb) d'ADN doble cadena, obtinguts d'amplificacions per PCR, es van utilitzar *Columnes QIAquick* (Qiagen). Aquest sistema permetia l'eliminació de sals, encebadors i dNTPs sobrants, quelcom d'especial interès per a la posterior realització de reaccions de seqüenciació. Aquestes columnes, de sílica-gel, han estant dissenyades per permetre l'adsorció de l'ADN en presència d'elevades concentracions de sal.

El protocol seguit fou el següent:

1. Afegir 5 vol. d'amortidor PB (Qiagen) per cada volum de producte de PCR i barrejar.
2. Dipositar la mostra dins la columna QIAquick, prèviament col·locada dins un *ependorf* de 2 ml.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min.
4. Descartar l'efluent i mantenir la columna dins el mateix tub.
5. Afegir 750 μ l d'amortidor PE (Qiagen) a la columna, amb l'objectiu de rentar l'ADN i centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min. Descartar l'efluent.
6. Centrifugar de nou la columna a 14.000 rpm durant 1 min per eliminar les restes d'amortidor PE.
7. Dipositar la columna QIAquick a un nou *ependorf* estèril.
8. Dipositar 50 μ l d'aigua Milli-Q estèril sobre la membrana de la columna per recuperar l'ADN. Deixar reposar 1 min i centrifugar a 14.000 rpm durant 1 min.
9. Mantenir l'efluent recuperat, el qual conté l'ADN, a -20 °C.

2.9.3. Mètodes de determinació de la concentració d'ADN

2.9.3.1. *Determinació espectrofotomètrica*

Per a determinar la concentració i la puresa de l'ADN extret es realitzava un espectre d'absorció entre 220 i 320 nm. La concentració es va calcular multiplicant el valor d'absorbància a 260 nm per un factor de 50, assumint que una unitat de D.O. a aquesta longitud d'ona (màxim d'absorció de les bases nitrogenades) correspon a una concentració d'ADN doble cadena de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Sambrook *et al.*, 1989). L'estimació analítica de la puresa fou determinada mitjançant la relació d'absorbàncies A_{260}/A_{280} (Sambrook *et al.*, 1989). Si la relació era entre 1,8 i 1,9 l'ADN es considerava pur (Gallagher, 1989). Quan més elevada era l'esmentada relació A_{260}/A_{280} (valors superiors a 2,2) més pur es podia considerar l'ADN i més elevat, per tant, el grau de desproteïnitació.

2.9.3.2. *Determinació fluoromètrica*

Per a les mostres de les quals es disposava de poc volum, la quantificació d'ADN es va fer d'acord al *PicoGreen[®] dsDNA Quantification Reagent kit*. El reactiu de PicoGreen conté una molècula fluorescent (fluorocrom) que té la capacitat d'intercalar-se als àcids nucleics de doble cadena, de manera que no es mesura fluorescència deguda a ADN de cadena senzilla ni a ARN. Aquest mètode és molt més sensible que la quantificació espectrofotomètrica, ja que permet detectar concentracions d'ADN doble cadena a l'entorn dels 25 pg ml^{-1} (Product Information. Molecular Probes. *PicoGreen[®] dsDNA Quantification Reagent*).

Les solucions utilitzades varen ser tampó TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) i la solució de PicoGreen (dilució 1:40 respecte la solució mare del producte).

El protocol següent fou el següent:

1. Diluir entre 1 i 3 μl de la mostra d'ADN amb 900 μl de tampó TE en un *ependorf* estèril.
2. Afegir 100 μl de la solució 1:40 de PicoGreen a cada mostra.
3. Incubar 10 min a la foscor.
4. Determinar la fluorescència per cada mostra utilitzant com a blanc per a la calibració de l'espectrofluorímetre aigua destil·lada. (λ d'excitació: 460 nm i λ d'emissió: 540 nm).

Com a calibració interna es va utilitzar una solució estàndard d'ADN d'esperma de Salmó (Sigma) (10 µl d'una solució 10 µg ml⁻¹). La mesura és lineal fins 1000 ng ml⁻¹.

2.9.4. Reacció en cadena de la polimersa: PCR

Les bases teòriques de la reacció en cadena de la polimerasa varen ser exposades per primera vegada per Kleppe *et al.* (1971). Posteriorment aquesta tècnica va ser utilitzada per generar moltes còpies a partir d'un sol fragment d'ADN genòmic (Mullis i Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Aquesta reacció consisteix en amplificar, és a dir, en obtenir n còpies, *in vitro*, d'un segment específic d'ADN.

Abans de realitzar la reacció d'amplificació de qualsevol gen, cal tenir en compte una sèrie de paràmetres que afecten l'eficiència de la mateixa. Alguns dels paràmetres que cal avaluar i tenir en compte abans d'iniciar qualsevol amplificació són els següents: puresa dels reactius, longitud, seqüència i complementarietat dels oligonucleòtids, concentració i puresa de l'ADN motllo, concentració de sals i dels dNTPs, temperatures de desnaturalització, d'aparellament i d'extensió del cicle tèrmic, entre d'altres (Innis i Gelfand, 1990).

L'acotament dels esmentats paràmetres i condicions és d'especial interès sobretot a l'hora de treballar amb encebadors degenerats. Amb aquest tipus d'encebadors és important optimitzar les condicions de la reacció per tal de minimitzar l'obtenció de productes inespecífics.

2.9.5. Electroforesi en gel d'agarosa

Per a l'anàlisi dels productes de PCR es va utilitzar l'electroforesi horitzontal en gels d'agarosa (Aaij i Borst, 1972). Els gels utilitzats foren a l'1,5 % d'agarosa (Pronadisa) i el tampó utilitzat va ser TBE (0,5 ×). La composició de la solució 1 ×, fou la següent: 89 mM de base Tris, 89 mM d'àcid bòric i 2 mM d'EDTA a pH 8,4.

Les cubetes d'electroforesi utilitzades eren del model MINI-SUB® CELL GT (Bio-RAD) amb una font d'alimentació Power-PAC 300 (Bio-RAD). Aquests gels de comprovació dels productes de PCR es feien córrer durant 30 min a 100 V (aproximadament 30 mA).

L'agarosa, un cop fosa, es deixava solidificar a les cubetes d'electroforesi, en les quals es col·locaven les pintes corresponents per a l'obtenció de les butxaques. Quan el gel estava solidificat es podia procedir a la càrrega de les mostres. Aquestes es carregaven amb una proporció de mostra:tampó de càrrega de 4:1. La composició d'aquest tampó, que permetia incrementar la densitat de les mostres i seguir la seva migració durant l'electroforesi, era la següent: blau de bromofenol (0,25 %), xilèn cianol FF (0,25 %) i glicerol 30 %, dissolt en aigua Milli-Q. El marcador de pes molecular, carregat amb les mostres per tal de conèixer la grandària dels fragments obtinguts, va ser el 100 bp DNA *ladder* (Promega).

Un cop finalitzada l'electroforesi, l'ADN es tenyia submergint el gel en una solució de bromur d'etidi $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, en un contenidor protegit de la llum, durant uns 10 min. Les bandes es visualitzaven amb un transil·luminador UV a 321 nm i la imatge del gel podia ser emmagatzemada gràcies a un sistema de captació d'imatges per ordinador (Scion image, TDI).

2.9.6. Electroforesi en gel de poliacrilamida. Separació de productes de PCR mitjançant gel en gradient desnaturalitzant

La DGGE (de l'anglès, *Denaturing gradient gel electrophoresis*) és una tècnica que permet separar, en un gel de poliacrilamida, seqüències d'ADN de la mateixa longitud però diferent composició de bases nitrogenades (Muyzer *et al.*, 1993). Aquesta tècnica es basa en la disminució de la mobilitat electroforètica de l'ADN doble cadena parcialment desnaturalitzat, en gels de poliacrilamida amb un gradient desnaturalitzant lineal. D'aquesta manera, molècules de la mateixa grandària però seqüència diferent, fins i tot diferint en un sol parell de bases, presenten una migració diferencial davant l'agent desnaturalitzant, aturant-se en diferents posicions del gel segons la seva composició. Per a obtenir la separació dels diferents fragments és necessari utilitzar, per les amplificacions de l'ADN, un dels encebadors amb cua GC, és a dir, amb una seqüència a l'extrem 5' de citosines i guanines, per permetre que la mostra mantingui parcialment l'estructura de doble cadena i evitar així la pèrdua de les molècules com a conseqüència del voltatge aplicat (Muyzer *et al.*, 1993).

Aquest mètode ha estat àmpliament emprat en estudis de composició i diversitat microbiana en ambients molt diversos (Muyzer *et al.*, 1993; Teske *et al.*, 1996; Ferris i Ward, 1997; Lindström, 1998; Konopka *et al.*, 1999; Overmann *et al.*, 1999; Casamayor *et al.*, 2000).

Per a la realització de les DGGE es va utilitzar un aparell DCode™ System de Bio-RAD. Els vidres emprats, així com els separadors i les pintes es van netejar amb aigua i detergent, esbandint-los amb aigua destil·lada i netejant-los finalment amb etanol per assegurar l'eliminació de possibles brutícies al gel.

El gradient desnaturalitzant d'urea fou del 30 % al 50 % i va ser creat mitjançant un sistema de vasos comunicants connectats a una bomba peristàltica. La composició de les dues solucions a partir de les quals es van preparar els gels es mostra a la Taula 2.5.

Taula 2.5. Composició de les solucions per a la preparació dels gels de DGGE.

Table 2.5. Composition of the denaturing solutions to prepare the DGGE gels.

	Gel al 30 % d'urea	Gel al 50 % d'urea
40 % acri/bis (acrilamida)	3,75 ml	3,75 ml
50 × TAE	0,50 ml	0,50 ml
Formamida	3,00 ml	5,00 ml
Urea	3,15 g	5,25 g
H ₂ O	25 ml	25 ml

— Per evitar polimeritzacions durant la creació del gradient al sistema de vasos comunicants, els últims components afegits a cadascuna de les solucions foren el TEMED (10 µl) i el persulfat amònic (APS) al 10 % (200 µl).

— El gel es deixava polimeritzar durant un mínim de 2 h i un cop solidificat es col·locava a la cubeta d'electroforesi amb 7 litres de tampó TAE 1× (140 ml de TAE 50×) preescalfat a 65 °C.

— Les mostres es carregaven amb una proporció de mostra: tampó de càrrega (4:1) i l'electroforesi es deixava córrer durant 4 h a 200 V, mantenint la temperatura a 60 °C.

— La tinció era equivalent a la realitzada amb els gels d'agarosa, però mantenint-los durant uns 45 min amb la solució de bromur d'etidi.

— Les bandes es retallaven del gel amb un bisturí estèril i es desaven en un vial d'electroelució, col·locat en un *ependorf*, mantenint-se a -20 °C durant un mínim de 12 h abans de realitzar l'electroelució.

— L'electroelució és una tècnica que permet recuperar l'ADN de les bandes del gel de poliacrilamida aprofitant la mobilitat que presenten els fragments d'ADN sotmesos a un camp elèctric. En aquest treball es van utilitzar columnes CENTRICON YM-50 (Millipore), les quals contenen un filtre al seu interior on queda retingut l'ADN i tenen petits orificis als extrems per tal de permetre el pas del corrent elèctric. La concentració de l'ADN recuperat va ser determinada mitjançant el Picogreen (Apartat 2.9.3.2) per ser posteriorment re-amplificat i seqüenciat.

2.9.7. Estudis sobre el gen *crtY*

En aquest Apartat de Material i Mètodes es descriu el protocol realitzat fins a la seqüenciació del potencial gen *crtY*, implicat en la síntesi de carotenoides en GSB.

2.9.7.1. Disseny d'encebadors degenerats

Els encebadors degenerats s'utilitzen, entre d'altres motius, en aquells casos en els quals la seqüència del gen objecte d'estudi no ha estat del tot caracteritzada (Mack i Sninsky, 1988; Nunberg *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 1996; Magnin *et al.*, 1998). Es tracta d'una mescla d'encebadors amb el mateix nombre de bases, és a dir, amb la mateixa longitud, però que varien en la seva seqüència (Compton, 1990). Per cada parella d'encebadors, doncs, es disposa d'una mescla per l'encebador *forward* i d'una mescla per l'encebador *reverse*. Els encebadors degenerats van ser dissenyats a partir de seqüències de *crtY* que pertanyen a espècies que no formen part del grup de GSB (Taula 2.6).

Taula 2.6. Seqüències d'aminoàcids dels diferents microorganismes emprats com a soques font pel disseny dels encebadors degenerats. Aquestes s'obtingueren de la base de dades del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Hirschberg, 1998 i Schmidt-Dannert, 2000).

Table 2.6. Aminoacid sequences of the different source microorganisms, used to design the degenerate primers, were obtained from the NCBI (National Center for Biotechnology Information) Database (Hirschberg, 1998 i Schmidt-Dannert, 2000).

Enzim	Gen	Organisme	Tipus de clon	Número d'accés
Licopè β -Ciclasa	<i>crtY</i>	<i>Erwinia herbicola</i> Eho10	genòmic	M87280; M99707
"	"	<i>Erwinia uredovora</i>	"	D90087
"	"	<i>Erytrobacter longus</i>	"	D83513
"	"	<i>Flavobacterium</i> ATCC21588	"	U62808
"	"	<i>Paracoccus marcusii</i>	"	Y15112
"	"	<i>Streptomyces griseus</i> (JA3933)	"	X95596

Pel disseny dels esmentats encebadors es va fer servir el programa CODEHOP (Rose *et al.*, 1998). Aquest programa (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) permet dissenyar encebadors de PCR a partir de l'alineació de múltiples seqüències proteiques (Figura 5.4. Capítol 5), tenint en compte la freqüència d'utilització dels codons per part de les espècies (*codon usage*).

Els encebadors dissenyats (Taula 5.1. Capítol 5) foren sintetitzats per la casa comercial Roche i d'aquests se'n feren alíquotes a una concentració de 50 μM .

Les condicions per a la reacció de PCR es varen definir segons les pautes descrites per Innis i Gelfand, 1990 i Giovannoni, 1991. Foren les següents:

Temperatura	Durada	Etapa
94 °C	4'	escalfament
94 °C	30''	desnaturalització
50 °C	1'	aparellament
72 °C	2'	extensió
72 °C	7'	extensió final
4 °C	∞	conservació

} $\times 30$ cicles

Els reactius utilitzats (tampó 10 \times , solució de dNTPs i l'ADN Polimerasa) foren de la casa comercial Applied Biosystems. La composició del tampó 10 \times fou la següent: TrisHCl 100 mM (pH 8,8), KCl 500 mM i Tritó \times -100 1 %. La concentració de MgCl_2 va ser 25 mM i la de dNTPs 10 mM. Els encebadors es van utilitzar a una concentració de 50 μM . L'ADN Polimerasa (AmpliTa $q^{\text{®}}$), d'altra banda, és una forma modificada i recombinant de l'enzim procedent de *Thermus thermophilus* expressada en *Escherichia coli* i està a una concentració d'1U/ μl . Els volums de cada reactiu, per un volum final de reacció de 50 μl (en ddH $_2\text{O}$) varen ser els següents: 5 μl de tampó 10 \times , 3 μl de MgCl_2 25 mM, 4 μl de dNTPs 10 mM, 1 μl d'encebador *forward* 50 μM i 1 μl d'encebador *reverse* 50 μM , 0,2 μl de DNA Polimerasa 1U/ μl i un volum d'ADN motllo per una concentració final de 50 ng μl^{-1} .

2.9.7.2. Amplificacions específiques dels fragments d'interès (possibles crtY's)

L'ADN recuperat de les bandes de la grandària d'interès (~ 1000 pb) obtingudes per amplificació amb els encebadors degenerats, es va lligar en un vector de lligació (p-GEM[®] T-easy Vector) per posteriorment ser transformat en cèl·lules d'*Escherichia coli* competents DH5 α , amb l'objectiu d'amplificar específicament els fragments de 1000 pb.

La reacció de lligació es deixava a 4 °C durant un mínim de 12 h. Els volums emprats per cada reacció de lligació foren els següents: 0,8 μ l de vector, 3 μ l d'insert, 5 μ l de tampó 2 \times , 0,7 μ l de lligasa i 0,5 μ l de ddH₂O.

Les etapes de la transformació dels productes resultants de la lligació foren:

1. Descongelar les cèl·lules d'*Escherichia coli* DH5 α competents en gel.
2. Afegir 6 μ l de producte de lligació a les cèl·lules (75 μ l) i incubar en gel 45 min.
3. *Shock* tèrmic de les cèl·lules a 42 °C durant 45 segons.
4. Mantenir en gel 5 min.
5. Afegir 925 μ l de medi LB fresc a les cèl·lules (75 μ l).
6. Incubar durant 1 h a 37 °C. Agitar.
7. Centrifugar les cèl·lules durant 5 min a 10000 rpm.
8. Ressusprendre el pellet en un petit volum de sobrenedant.
9. Plaquejar en LB-Amp.
10. Incubar *overnight* a 37 °C.
11. Recompte de les colònies transformants.

L'extracció de l'ADN dels clons obtinguts, prèviament repicats en LB líquid, es va fer amb el kit d'extracció de QIAGEN. Les etapes d'aquest protocol foren les següents:

1. Centrifugar 2 ml dels cultius de nit a 12.000 rpm durant 5 min.
2. Descartar el sobrenedant i ressuscindre el sediment cel·lular en 250 µl de tampó P1. Agitar amb el vòrtex.
3. Afegir 250 µl de tampó P2 i barrejar per inversió.
4. Afegir 350 µl de tampó N3 i barrejar.
5. Centrifugar a 12.000 rpm durant 10 min.
6. Transferir els sobrenedants obtinguts en les columnes, prèviament acoblades a tubs *ependorfs*.
7. Centrifugar a 12.000 rpm durant 1 min.
8. Afegir 500 µl de tampó PB i centrifugar de nou a 12.000 rpm durant 1 min.
9. Afegir 750 µl de tampó PE i centrifugar a 12.000 rpm durant 1 min. Repetir la centrifugació per assegurar la completa eliminació del tampó PE.
10. Transferir les columnes a tubs *ependorfs* nets.
11. Afegir 50 µl d'aigua Milli-Q estèril i esperar 2 min a temperatura ambient.
12. Centrifugar a 12.000 rpm durant 2 min.

L'amplificació d'aquest ADN obtingut de les *minipreps* es va dur a terme amb el parell d'encebadors dissenyats específicament per l'amplificació dels inserts al vector de clonació p-GEM. La seqüència d'aquests encebadors es mostra a la Taula 2.7.

Taula 2.7. Seqüències dels encebadors emprats per a l'amplificació d'inserts al vector p-GEM.

Table 2.7. Primer sequences used for the amplification of p-GEM products.

ID	Seqüències dels oligonucleòtids
FUP (<i>forward universal plasmid</i>)	GTT TTC CCA GTC ACG AC
RUP (<i>reverse universal plasmid</i>)	AGC GGA TAA CAA TTT CA

A partir d'un dels clons obtinguts es va dissenyar el nou parell d'encebadors específics (PKT) per amplificar espècies marrons de GSB (Taula 5.2. Capítol 5). La grandària del fragment amplificat amb aquests encebadors va ser d'uns 500 pb.

El programa de PCR utilitzat amb aquests encebadors PKT fou el que es detalla a continuació:

Temperatura	Durada	Etapa
94 °C	4'	escalfament
94 °C	1'	desnaturalització
61 °C	45''	aparellament
72 °C	1'	extensió
72 °C	7'	extensió final
4 °C	∞	conservació

} × 30 cicles

Els encebadors PKT es van utilitzar a una concentració de 25 μM , tot i que també s'aliquotaren a una concentració de 50 μM seguint les indicacions del fabricant (Roche). Els volums de cada reactiu, en aquest cas de la casa comercial Biotools, per un volum final de reacció de 50 μl (en ddH₂O) varen ser els següents: 5 μl de tampó 10 ×, 3 μl de MgCl₂ 25 mM, 2 μl de dNTPs 10 mM, 1 μl d'encebador *forward* 25 μM i 1 μl d'encebador *reverse* 25 μM , 0,2 μl de DNA Polimerasa 1U/ μl i un volum d'ADN motllo per una concentració final de 50 ng μl^{-1} .

2.9.7.3. Reacció de seqüenciació

Les reaccions de seqüenciació d'aquest treball es realitzaren amb el kit de seqüenciació ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) a partir dels productes de DGGE netejats segons el protocol descrit a l'Apartat 2.9.6.

La mescla per a cada reacció de seqüenciació, amb un volum final de 10 µl, fou la següent:

ADN motllo (~ 0,2 µg/ml)	1 µl
Terminator mix (BigDye)	3 µl
Encebador 25 µM	1 µl
ddH ₂ O	5 µl

Per a cada mostra es realitzaren dues reaccions, una amb l'encebador *forward* i una altra amb el *reverse*.

El programa del termociclador utilitzat per a la reacció de seqüenciació es detalla a continuació:

pas 1	94 °C	3'	} 25 cicles
pas 2	96 °C	10''	
pas 3	50 °C	5''	
pas 4	60 °C	4'	
pas 5	4 °C	pausa	

El protocol realitzat per a la precipitació dels ddNTPs fluorescents fou el següent:

1. Afegir 80 µl d'una solució d'etanol/acetat de sodi a cada reacció de seqüenciació. Aquesta solució es preparava prèviament a partir de 31,25 ml d'etanol al 95 % i 1,5 ml de NaOAc 3 M pH 4,6 i 14,25 ml de ddH₂O.
2. Agitar breument amb el vòrtex.
3. Mantenir 15 min a temperatura ambient.
4. Transferir les reaccions a tubs *ependorf* de 1,5 ml.
5. Centrifugar durant 20 min a 12.000 rpm.
6. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una trompa de buit.
7. Afegir 250 µl d'etanol al 70 %.
8. Agitar breument amb el vòrtex.
9. Centrifugar durant 5 min a 12.000 rpm
10. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur connectada a una trompa de buit.
11. Assecar les mostres mantenint-les a l'estufa a 30 °C (amb compte de no sobreassecar).
12. Mantenir el sediment de centrifugació a 4 °C i a les fosques fins al moment de ressuspensió de l'ADN.

Finalment, el protocol per a la ressuspensió d'ADN es descriu a continuació:

1. Afegir 30 µl de TSR (Template Suppression Reagent) a l'ADN precipitat.
2. Deixar rehidratar les mostres 20 min a temperatura ambient.
3. Agitar breument amb el vòrtex.
4. Desnaturalització de l'ADN, mantenint les mostres en un bany a 94 °C durant 3 min.
5. Deixar refredar durant 3 min en gel.
6. Agitar breument amb un pols de centrifugació.
7. Transferir els 30 µl a tubs ABI310 de 0,5 ml i tancar-los amb el corresponent septum.
8. Mantenir a 4 °C i en condicions de foscor fins al moment de seqüenciar.

3. Mètodes d'aïllament i caracterització dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre

3. Mètodes d'aïllament i caracterització dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre

3.1. Introducció

3.1.1. Perspectiva històrica

Els carotenoides són pigments àmpliament distribuïts a la natura, presents tant en teixits fotosintètics de plantes superiors com en microorganismes fotoautotròfics. El primer carotenoide aïllat fou carotè de pastenaga per Wackenroder l'any 1831. L'altre gran tipus de carotenoide, les xantofil·les va ser descobert en algues per part de Lubimenko, l'any 1927 i Smith l'any 1930 (Govindje, 1999). Actualment es coneixen més de 600 estructures (Straub, 1987), tenint en compte que els mètodes d'aïllament, purificació i anàlisi han millorat molt amb el pas del temps (veure Apartat 3.1.3).

Els carotenoides, en termes generals, presenten dues grans funcions. D'una banda la funció com a pigments antena i, d'altra banda, la funció fotoprotectora, gràcies a les seves propietats com a antioxidants. A la introducció del Capítol 4 s'aprofundeix sobre els aspectes funcionals d'aquests pigments i sobre l'estat actual de la recerca en relació a les funcions dels carotenoides als bacteris verds del sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*). Pel que fa a la funció fotoprotectora destaca el fet que aquestes molècules siguin capaces de dur a terme aquesta funció tant en organismes fotosintètics com en teixits animals. En humans, concretament, els carotenoides són agents beneficiosos per l'organisme, ja que són inhibidors potencials de processos que poden causar proliferació cel·lular descontrolada, infeccions, o fins i tot desencadenar malalties autoimmunes (Demmig-Adams, 2002). Per aquest motiu actualment nombrosos estudis en el camp de la biologia i la medicina es centren en la importància dels carotenoides a la dieta com a mesura preventiva de determinades malalties (Mares-Perlman, 2002).

3.1.2. Estructura molecular

Estructuralment els carotenoides són una classe d'hidrocarburs que es divideixen en carotens i xantofil·les, aquestes últimes derivats oxigenats dels carotens i per tant de caràcter més polar. Aquests pigments es formen a partir de la unió de vuit unitats d'isoprè (unitats C₅), que donen lloc a una estructura acíclica bàsica (C₄₀H₅₆) a partir de la qual, i mitjançant diferents reaccions d'estructuració de la molècula, com poden ser oxidacions i ciclacions, donen lloc als diferents tipus de carotenoides (Figura 3.1).

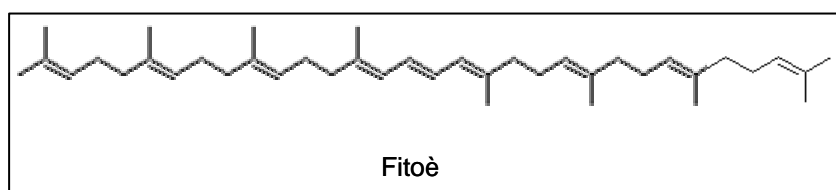


Figura 3.1. Estructura del fitoè, molècula precursora de les rutes de síntesi dels carotenoides.

Figure 3.1. Structure of phytoene, the precursor molecule in the synthetic pathway of carotenoids.

Tots els carotenoides es caracteritzen per absorbir a la regió ultraviolada (180-400 nm) i visible (400-550 nm) de l'espectre electromagnètic. Aquesta absorció és possible gràcies al grup cromòfor, és a dir, la part de la molècula constituïda per un sistema de dobles enllaços conjugats. Es tracta de la zona de l'estructura en la qual existeix una alternança de dobles enllaços amb enllaços simples. A més, l'espectre d'absorció també depèn de la refractivitat del medi en el qual es troba el pigment. Les interaccions dels carotenoides amb d'altres molècules, com ara proteïnes, glúcids o les pròpies molècules del solvent, determinen un entorn que defineix un espectre d'absorció diferent al qual s'obté, per als mateixos pigments, en solvents orgànics. La longitud d'ona ($\lambda_{\text{màx}}$) a la qual absorbeixen els carotenoides ve determinada per la longitud del cromòfor, és a dir, pel nombre de dobles enllaços conjugats, mentre que la intensitat d'absorció depèn de l'estructura i concentració del pigment. En augmentar el nombre de dobles enllaços conjugats, és a dir, en augmentar la longitud del cromòfor, $\lambda_{\text{màx}}$ es desplaça cap a longituds d'ona menys energètiques (desplaçament *batocròmic*, cap al vermell). En aquest sentit, cada doble enllaç de la cadena significa un increment d'aproximadament 10 nm. El nombre i el tipus de grups funcionals terminals de la molècula també contribueixen en l'espectre d'absorció (Taula 3.1).

Taula 3.1. Contribució d'alguns grups funcionals terminals sobre la $\lambda_{\text{màx}}$ de l'espectre d'absorció dels carotenoides.

Table 3.1. Contribution of some terminal functional groups on the location of I_{max} in the absorption spectrum of carotenoids.

Grup funcional	Influència sobre $I_{\text{màx}}$	Carotenoide
Anell β	+ 5 nm	β -carotè
Anell β (3,4-didehidro)	+ 10 nm	3,4-didehidro- β -carotè
Grup acetilènic	- 15 nm	al-loxantina
Grups carbonil		
aldehids	+ 25 nm	retinal
cetones acíclicues	+ 30 nm	espiril-loxantina
cetones cíclicues	+ 10 nm	equinona
Grup hidroxil	cap efecte	zeaxantina
Grup epòxid	+ 10 nm	β - β -carotè-5,6-epòxid

Quan les propietats de simetria d'un carotenoide canvien, a causa de fenòmens de transició electrònica, les bandes d'absorció que generalment no són detectades poden esdevenir característiques de l'espectre, originant dobles enllaços tipus *cis*, responsables d'estats d'excitació detectables (banda d'absorció a l'ultraviolat característica o pic *cis*). La posició central d'un doble enllaç tipus *cis* (15 Z) en un determinat carotenoide és fàcilment identificable gràcies a l'aparició d'un pic *cis* molt aparent, a diferència del que succeeix quan les posicions d'aquests enllaços tipus *cis*, responsables de torsions a l'estructura molecular, es situen als extrems de la molècula. Una altra característica que permet identificar els isòmers tipus *cis* és el desplaçament *hipsocròmic* que presenten respecte a la corresponent forma *trans*. Això significa que el màxim d'absorció de l'isòmer *cis* es situa aproximadament a uns 10 nm a l'esquerra de la $\lambda_{\text{màx}}$ de l'isòmer *trans*, generalment més abundant (Britton, 1995 i referències incloses). Les configuracions *all-trans* són aquelles en les quals no hi ha cap enllaç tipus *cis* i l'estructura de la molècula és, per tant, lineal.

En alguns casos i depenent de l'estructura del carotenoide, l'espectre d'absorció presenta tres pics clarament diferenciats (Figura 3.2). Aquesta estructura correspon a un estat vibracional (conegut com a *estructura fina*) que permet la identificació precisa d'alguns carotenoides. La presència d'anells tipus β a la seva estructura, com és el cas del β -carotè ($C_{40}H_{56}$), per exemple, dificulta la detecció dels tres pics característics de l'estructura fina (Britton, 1995 i referències incloses).

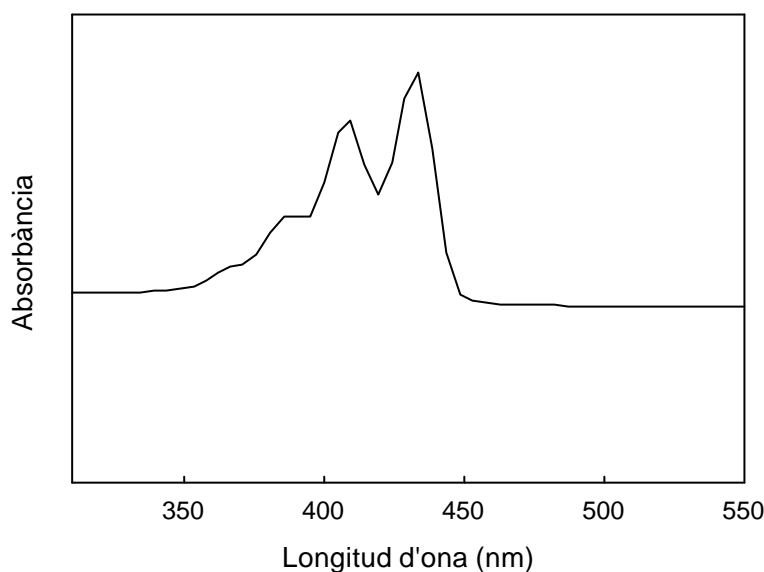


Figura 3.2. Espectre d'absorció característic d'un carotenoide tipus on s'observa l'*estructura fina* del mateix
Figure 3.2. Spectral fine structure of a model carotenoid.

En aquesta tesi, mitjançant els mètodes d'HPLC i espectrometria de masses emprats, va ser possible la identificació dels isòmers *all-trans* i la corresponent configuració *15-cis* per a tots els carotenoides de les espècies de GSB analitzades.

A la Figura 3.3 es presenta l'estructura molecular dels principals carotenoides dels GSB. L'espectre d'absorció del clorobactè (Cbt) i de l'isorenieratè (Isr) tant de l'isòmer amb configuració *all-trans*, com de l'isòmer amb configuració *15-cis*, es mostra a les Figures 3.5 i 3.10, respectivament, de la Secció 3.2.1 del present capítol.

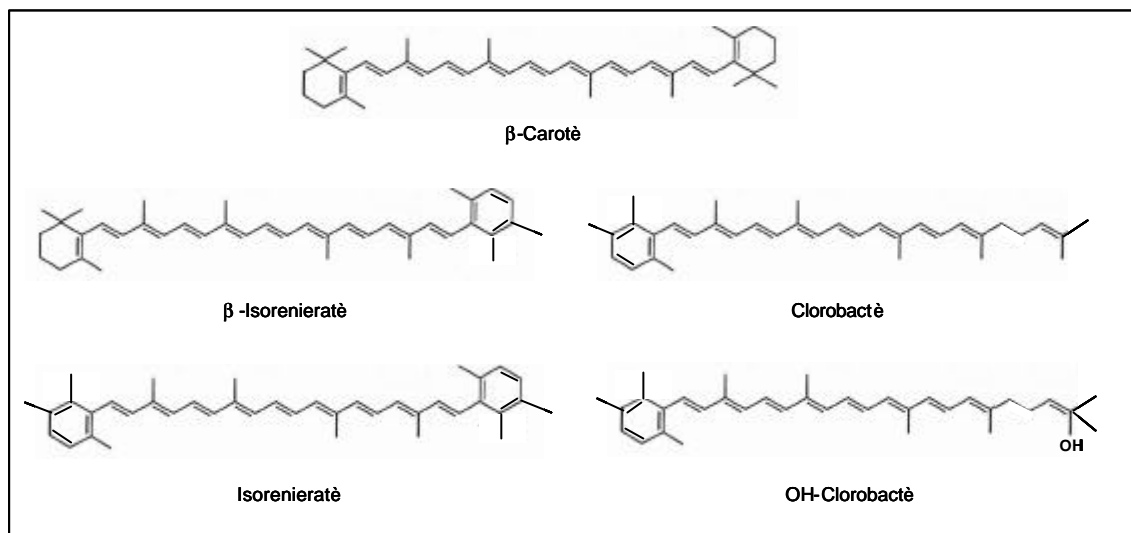


Figura 3.3. Estructura química dels principals carotenoides dels GSB.

Figure 3.3. Chemical structure of the main carotenoids in GSB.

3.1.3. La cromatografia líquida en l'anàlisi dels carotenoides

La cromatografia líquida d'alta resolució és una tècnica aplicable a qualsevol tipus de cromatografia en columna. Es tracta d'una tècnica que permet la separació dels diferents components d'una mescla, aprofitant característiques diferencials dels mateixos (pes molecular, càrrega, polaritat, afinitat per a un determinat substrat) amb l'ajut d'elevades pressions. Per aquest motiu, i tenint en compte que les columnes es comercialitzen ja empaquetades amb partícules d'entre 3 i 10 μm de diàmetre, l'aplicació de sofisticades tècniques a elevades pressions pot reduir molt el temps de carrera cromatogràfica alhora que millora la resolució en la separació dels diferents components (Craft, 1992). A la Taula 3.2 es descriuen alguns dels mètodes d'HPLC fase reversa aplicats en la separació de carotenoides de diferents orígens, així com algunes de les característiques que defineixen aquests mètodes: tipus de columna, el revestiment de la qual caracteritza la fase estacionària, tipus de solvents o fase mòbil, tipus de gradient i durada de la carrera cromatogràfica.

L'instrumental bàsic requereix d'un sistema de bombes, responsable d'aplicar els solvents, o fase mòbil del sistema, i un injector, amb el qual s'introdueixen les mostres a la columna. En aquesta columna es troba la fase estacionària, que pot ser de diferents substrats depenent del tipus de mostra a separar (Oliver, 1989). La columna es troba connectada a un detector de longitud d'ona, gràcies al qual, i per mitjà d'un sistema de control (normalment un ordinador i un programari específic) es poden enregistrar els espectres d'absorció dels diferents components de la mostra, així com obtenir els cromatogrames que relacionen l'absorbància de la mostra amb el temps de carrera cromatogràfica (Pfander, 1994).

La primera separació de carotenoides per HPLC data de l'any 1971, quan Stewart i Wheaton (1971) varen descriure la separació d'una mescla de carotenoides procedents d'un extracte de pell de cítrics. Aquests autors van utilitzar un gradient d'HPLC de fase normal, amb una columna revestida de carbonat de zinc, aconseguint la separació de 23 pics diferents. El temps de carrera cromatogràfica necessari per aquesta separació fou de 5 hores.

Actualment, gràcies als avenços aconseguits en les tècniques d'HPLC la separació de carotenoides, per mitjà de cromatografia líquida, pot dur-se a terme amb temps de carrera que oscil·len entre els 20 i els 40 minuts, utilitzant les columnes prèviament empaquetades per les diferents companyies comercials.

La tècnica de cromatografia líquida més freqüentment utilitzada per a la separació de carotenoides bacterians és la **fase reversa**, on la fase mòbil (solvents) és polar i la fase estacionària (farciment de la columna) és apolar. Això es deu a què és necessària una bona miscibilitat entre la fase mòbil i els solvents emprats en l'extracció dels pigments per assegurar una bona anàlisi. A més, la **fase normal**, on la fase mòbil és apolar, no proporciona una bona resolució en l'anàlisi de mostres heterogènies i les seves fases estacionàries presenten una elevada reactivitat (Roy, 1987).

El present capítol recull les anàlisis dels carotenoides, de procedència diversa, dutes a terme amb els mètodes d'HPLC dissenyats en aquest estudi i prèviament descrits a l'Apartat 2.4.2 de Material i Mètodes.

Taula 3.2. Característiques d'alguns dels mètodes d'HPLC fase reversa descrits a la bibliografia sobre separació de carotenoides .

Table 3.2. Described HPLC methods about carotenoids separation.

Fase estacionària	Fase mòbil	Gradient (min, % B)	Durada (min)	Aplicacions	Referències*
Spherisorb-ODS2 5 µm (250x4,6 mm)	(A) AcEt (B) AcNt: H ₂ O (9:1)	(0,100), (16,40), (30,40), (35,0)	20	Pigments vegetals	[1]
Spherisorb-ODS2 5 µm (250x4,6 mm)	(A) AcEt (B) AcNt: H ₂ O: TEA (90:10:0,1)	(0,100), (15,77), (30,30), (40,0), (45,0)	35	Carotenoides de Bacteris Vermells no del Sofre	[2]
Spherisorb-ODS2 5 µm (250x14,6 mm)	(A) AcNt: H ₂ O: TEA (90:10:0,1) (B) AcEt	(0,0), (16,60), (30,60)	20	Cloroplasts de <i>Phaseolus vulgaris</i>	[1], [3]
Zorbax ODS 5 µm (250x4,6 mm)	AcNt: DCM: MetOH (70:20:10)	isocràtic	28	Carotenoides de sèrum humà i algals	[4]
Zorbax ODS 5 µm	MeOH: AcNt: DCM (50:40:10)-(70:15:15)	isocràtic	8–16	Pigments de <i>Brevibacterium</i> sp. i <i>Rhodomicrobium vannielii</i>	[4], [5], [6], [7]; [8], [9]
ODS-Hypersil 3 µm (100x5 mm)	(A) AcNt:H ₂ O:MetOH: TrisHCl 0,2 M (65:19:15:1) (B) MeOH: hexà (7:1)	(0,0), (15,100), (23,100), (24,0)	20	Pigments de <i>Cichlorium endivia</i> i <i>Picea abies</i> Cloroplasts de <i>Lactuca sativa</i>	[10], [11]
ODS-Hypersil 5 µm (250x5 mm)	(A) MeOH:H ₂ O:IPA (80:10:10) (B) MeOH:Acetona (80:20)	(0,0), (10,100), (12,100)	25	Pigments de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	[12]
Shandom Hypersil 5 µm (120x4 mm)	(A) H ₂ O (B) THF	(0,51), (13,90), (18,51)	15	Pigments de fulles de cibada	[13]
Spherisorb Alltech C-18 (250x4,6 mm)	(A) MeOH:AcNH ₄ ⁺ 1M (70:30) (B) MeOH:AcEt (70:30)	(0,20), (7,60), (12,60), (20,100), (40,100)	40	Pigments algals (carotenoides i productes de degradació de la Cl a)	[14]

* [1] Young i Britton, 1989; [2] Connor i Britton, 1990; [3] Pfander *et al.*, 1994; [4] Nelis i Leenheer, 1983; [5] Nelis i Leenheer, 1989; [6] Foppen, 1991; [7] Liaaen-Jensen, 1978; [8] Schmidt, 1978; [9] Taylor, 1980; [10] Francis *et al.*, 1993; [11] Siefertmann-Harms, 1988; [12] Mantoura i Llewellyn, 1983; [13] Juhler i Cox, 1990 i [14] Yacobi *et al.*, 1996.

3.1.4. L'espectrometria de masses en l'estudi dels carotenoides

Malgrat la identificació mitjançant HPLC dels carotenoides de les espècies bacterianes objecte d'estudi va resultar satisfactòria, es va realitzar també una anàlisi per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses per confirmar-ne la identificació realitzada a partir de les anàlisis per HPLC (Apartat 3.2.1). Treballs recents realitzats amb GSB (Airs i Keely, 2002) han identificat amb precisió els diferents homòlegs de bacterioclorofil·les (BCls), i tot i que no s'ha fet esment als carotenoides d'aquestes espècies, es coneixen molts detalls tant estructurals com químics dels mateixos (Britton, 1995).

L'espectrometria de masses és una tècnica que permet la separació d'ions en funció de la seva relació massa/càrrega. Per tal de dur a terme aquest objectiu és necessària la prèvia vaporització dels components de la mostra, a conseqüència de la qual es produiran els ions que formaran part de la fase gasosa del sistema. Aquestes partícules amb càrrega seran posteriorment separades, en funció de la relació anteriorment esmentada, i detectades per poder dur a terme la seva identificació (Harwood i Claridge, 1997 i referències incloses).

Existeixen diferents mètodes per ionitzar les molècules que han de ser analitzades per espectrometria de masses. Les més freqüentment utilitzades són l'impacte d'electrons, de l'anglès *Electron Impact* (EI) i la ionització química, *Chemical Ionization* (CI). En aquest treball s'ha utilitzat la ionització química sota pressió atmosfèrica, APCI, acrònim de *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, per obtenir els ions a partir de les molècules tèrmicament volatilitzades. El valor de la massa de cada molècula és una unitat superior al pes molecular real d'aquella molècula, ja que s'ha de tenir en compte la unitat aportada pel protó associat a cadascun dels cations obtinguts després de la ionització (Harwood i Claridge, 1997 i referències incloses). La tècnica APCI-MS ha estat utilitzada per l'anàlisi d'una gran varietat de lípids i també ha estat útil en la caracterització de molècules que, per la seva llargada i caràcter neutre, com els carotenoides, són difícils de fragmentar (Byrdwell, 2001).

Nombrosos estudis de caracterització de carotenoides, de procedències diverses, han estat realitzats utilitzant com a tècnica analítica l'espectrometria de masses. Un exemple concret és la detecció, mitjançant APCI-MS, de licopè, α -carotè i β -carotè, en mostres de sèrum (Hagiwara, 1998). La detecció simultània de diferents configuracions (*trans*, *cis*) per una mateixa molècula, també és possible gràcies a la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses. Concretament, all-*trans*, 9-*cis* i 13-*cis* retinol, procedents de pròstata de ratolí, han pogut ser detectats simultàniament amb un mètode de LC-APCI-MS (Wang, 2001).

La tècnica utilitzada per l'anàlisi de l'extracte de carotenoides de *Chlorobium (Chl.) phaeobacteroides* CL1401, els resultats del qual es mostren a l'Apartat 3.2.2 del present Capítol, també va ser APCI-LC-MS/MS. El mètode concret d'anàlisi, que s'indica a l'Apartat 2.5 de Material i Mètodes, va permetre la identificació dels isòmers all-*trans* i 15-*cis* per tots els carotenoides de la mescla.

3.1.5. Efecte de les condicions d'oxido-reducció en la composició quantitativa i qualitativa d'extractes pigmentaris de *Chlorobium phaeobacteroides*

El bloc experimental de l'Apartat 3.2.3 d'aquest capítol es va portar a terme per a confirmar l'origen dels isòmers dels carotenoides dels GSB, tenint en compte que alguns autors han suggerit que els isòmers tipus *cis* podrien ser artefactes formats durant el procés d'extracció dels pigments (Keely, comunicació personal). Aquests experiments han permès, doncs, plantejar hipòtesis sobre la composició d'isòmers *trans/cis* així com les seves variacions durant el creixement de diferents soques de GSB sota diferents condicions lumíniques (veure Capítol 4).

L'efecte que poden provocar agents de caràcter reductor, com el ditionit sòdic i l'àcid ascòrbic, i agents de caràcter oxidant, com el dimetilsulfòxid i el peròxid d'hidrogen, sobre els continguts de pigments, així com sobre les proporcions entre els isòmers *trans/cis* dels carotenoides dels GSB, no ha estat fins al moment objecte d'estudi. Aquests experiments van ser de gran utilitat per confirmar la procedència dels isòmers tipus *cis* dels carotenoides de les espècies marrons de GSB, prèviament detectats i identificats per tècniques de cromatografia i espectrometria de masses.

En l'Apartat 3.2.3 d'aquest capítol es mostren els experiments en els quals s'analitzaren les variacions, *in vitro*, en els continguts de pigments i en les relacions *trans/cis* dels carotenoides de *Chl. phaeobacteroides* CL1401. Els extractes de pigments d'aquesta soca foren sotmesos a diferents agents oxidants i reductors, tant en condicions d'il·luminació com en la foscor durant 12 h. D'una banda s'avaluà el grau de fotosensibilitat de BCIs i carotenoides, i d'altra banda, juntament a alguns dels resultats presentats al Capítol 4, es plantejaren hipòtesis sobre l'origen dels isòmers *cis*.

Tot i que en aquest treball no s'han dut a terme experiments relacionats amb transferència d'energia, l'efecte d'agents amb caràcter oxidant i reductor sobre l'eficiència d'aquest procés ha estat estudiada a diferents espècies de GSB. L'addició de ditionit sòdic, o un reductor equivalent, incrementa, fins a un 100 %, l'eficiència en la transferència d'energia en clorosomes de *Chl. limicola* i *Chl. vibrioforme* (Wang, 1990). Condicions aeròbiques, en canvi, ocasionades per l'addició d'agents oxidants, provoquen una disminució de l'eficiència en la transferència d'energia a l'aparell fotosintètic de les mateixes espècies gràcies a la protecció que ofereix el sistema de quinones (Frigaard *et al.*, 1997; 1998).

3.1.6. Estudis paleolimnològics

El desconeixement sobre les funcions dels carotenoides dins l'aparell fotosintètic dels GSB (veure Introducció Capítol 4) no implica que fins ara no s'hagin dut a terme treballs amb aquests carotenoides. Alguns d'aquests han estat relacionats amb l'àmbit paleolimnològic, utilitzant aquests pigments com a biomarcadors de la presència de GSB en mostres sedimentàries de diferent antiguetat. En el cas de l'Isr i els seus derivats poden ser considerats, al igual que d'altres pigments fotosintètics, marcadors biològics, tenint en compte la seva assignació específica al grup de les espècies marrons dels GSB (Liaaen-Jensen, 1972, 1978). Assumint l'anaerobiosi obligada d'aquests bacteris, que utilitzen sulfhídric com a donador extern d'electrons, la presència de pigments de Clorobiàcies a l'aigua, al sòl o a sediments, s'ha considerat com a indicadora de condicions anòxiques, amb presència de sulfhídric, tant en el moment actual com en el passat. Mesures del contingut en ^{13}C indiquen que els carotenoides com l'Isr, i els seus productes de degradació, es troben enriquits amb aquest isòtop ja que es sintetitzen a partir de la via del cicle reductiu de l'àcid tricarbòxilic (Sirevag *et al.*, 1977). Per tant, utilitzant aquesta tècnica radioisotòpica els carotenoides poden ser emprats com a marcadors moleculars en

sediments fòssils i ser indicadors d'antics episodis d'anòxia fòtica (Summons i Powell, 1986; Sinningh Damsté *et al.*, 1993; Repeta, 1993; Koopmans *et al.*, 1996a; 1996b). Summons i Powell (1986) van trobar productes d'origen diagenètic, derivats de carotenoides aromàtics de GSB, en bosses de petroli del Silurià del llac Michigan, Canadà, i del Devonià de Canadà occidental. Aquestes troballes van permetre deduir l'existència de poblacions de Clorobiàcies a l'era primària (230-570 milions d'anys) als mars existents durant el Paleozoic a la zona estudiada, a més de deduir la procedència dels petrolis extrets en aquestes àrees. Derivats de l'Isr com l'isoprenoid 2,3,6-diaril/ 3,4,5-trimetil, han estat trobats en petrolis de la conca del riu Pripyat a Belorússia (Clifford *et al.*, 1998). De manera similar, aquests resultats van permetre deduir el tipus de poblacions fotosintètiques, existents en el passat, a la zona del riu estudiada, així com determinar l'origen dels petrolis extrets en funció dels productes detectats.

En aquest treball s'analitzaren paleosediments procedents d'una antiga cantera de la zona lacustre de Banyoles. L'objectiu va ser determinar la possible presència, en la zona objecte d'estudi, de poblacions de GSB en el passat. L'estudi de productes de degradació de clorofil·les (CIs) i BCIs presents als sediments objecte d'estudi, pot ajudar a determinar el tipus de poblacions fotosintètiques que dominaven en l'àrea estudiada durant la seva existència com a sistema lacustre. Al llac Kinneret (Israel) les anàlisis de pigments per HPLC han permès associar els productes de degradació de la Cl *a*, concretament clorofil·lida *a*, amb poblacions fitoplanctòniques corresponents a cèl·lules senescents de les tres classes d'algues existents al llac objecte d'estudi: dinofícies, clorofícies i bacilariofícies (Yacobi *et al.*, 1996).

3.2. Resultats

3.2.1. Identificació dels carotenoides de Bacteris Verds del Sofre per cromatografia líquida d'alta resolució

A partir dels mètodes d'HPLC descrits a l'Apartat de Material i Mètodes 2.4.2 es varen analitzar tant extractes pigmentaris procedents de cultius purs de diferents espècies de GSB com de mostres més complexes, procedents d'extractes obtinguts de paleosediments d'un antic sistema lacustre.

3.2.1.1. Anàlisi cromatogràfica de carotenoides en extractes pre-purificats amb columnes d'alúmina

Els extractes de pigments prèviament pre-purificats (veure Apartat 2.4.4), van ser analitzats amb el mètode EP, desenvolupat i presentat en l'Apartat 2.4.2. Aquest mètode va permetre l'anàlisi d'extraccions de carotenoides, lliures de BCIs, en tan sols 45 minuts de carrera cromatogràfica.

Els resultats que segueixen mostren les diferències en l'anàlisi dels extractes pre-purificats i els extractes no-prepurificats, procedents de les mateixes espècies, injectats amb el mètode NP. A la corresponent discussió d'aquesta part del treball es comenten les avantatges i inconvenients d'un i altre mètode (Apartat 3.3.1).

Els extractes pigmentaris analitzats es van obtenir de cultius purs de les següents soques de GSB: *Chl. limicola* UdG6038, *Chl. vibrioforme* f. *thiosulfatophilum* NCBI8327, *Chl. tepidum* ATTC49652 i *Pelodictyon (Pld.) clathratiforme* UdG7504, totes elles espècies verdes dins el grup de GSB i *Chl. phaeobacteroides* CL1401, dins el grup d'espècies marrons.

Malgrat que la resolució entre ambdós mètodes fou similar, les anàlisis realitzades amb el mètode EP van permetre constatar que no calien 60 min per separar els carotenoides bacterians de forma independent a la resta de pigments fotosintètics, tal com es pot apreciar en les Figures 3.4 i 3.6–3.9. A la Taula 3.3 es recull el llistat de pigments identificats amb ambdós mètodes amb el corresponent t_R . També s'inclouen en la taula els carotenoides identificats per a una espècie de Bacteris Vermells del Sofre, concretament *Thiocapsa roseopersicina* 5811, el principal carotenoide de la qual fou l'okenona (Figures 3.11 i 3.12).

Taula 3.3. Temps de retenció (min) i desviació estàndard pels diferents pigments analitzats.*Table 3.3. Retention time (min) ± standard deviation of the different pigments analyzed.*

Carotenoide	t _R (Mètode EP)	t _R (Mètode NP)	Espècie
derivat all- <i>trans</i> Okn	11,1±0,00	41,0±0,50	(6)
derivat 15- <i>cis</i> Okn	11,8±0,00	42,2±0,00	(6)
all- <i>trans</i> Okn	14,6±0,00	46,2±0,00	(6)
15- <i>cis</i> Okn	15,1±0,00	47,1±0,00	(6)
derivat all- <i>trans</i> OH-Cbt	15,3±1,00	50,5±2,99	(2) i (3)
derivat 15- <i>cis</i> OH-Cbt	17,5±3,85	51,5±3,20	(2) i (3)
precursor espiriloxantina	17,5±0,00	47,6±0,00	(6)
all- <i>trans</i> lsr	23,9±3,78	53,5±0,05	(5)
15- <i>cis</i> lsr	24,8±3,67	54,5±0,06	(5)
all- <i>trans</i> Cbt	24,7±0,87	54,8±0,50	(1) – (4)
<i>cis</i> Cbt	25,6±1,11	55,3±0,13	(1) – (4)
15- <i>cis</i> Cbt	26,5±1,10	55,9±0,26	(1) – (4)
all- <i>trans</i> β-lsr	30,1±2,87	57,5±0,01	(5)
<i>cis</i> β-lsr	30,5±2,79	57,8±0,00	(5)
15- <i>cis</i> β-lsr	31,6±3,37	58,7±0,08	(5)
derivat all- <i>trans</i> Cbt	31,1±1,73	58,3±0,98	(1) – (4)
derivat 15- <i>cis</i> Cbt	31,9±1,37	59,5±1,19	(1) – (4)
all- <i>trans</i> neurosporè	34,5±1,01	60,8±0,75	(1), (2) i (4)
15- <i>cis</i> neurosporè	34,9±0,99	61,5±0,28	(1), (2) i (4)
all- <i>trans</i> β-carotè	36,8±1,99	62,5±0,07	(5)
<i>cis</i> β-carotè	37,3±1,94	63,1±0,08	(5)
15- <i>cis</i> β-carotè	38,2±1,88	63,9±0,13	(5)

(1) *Chl. limicola*, (2) *Chl. vibrioforme* f. *thiosulfatophilum*, (3) *Chl. tepidum*, (4) *Pld. clathratiforme*, (5) *Chl. phaeobacteroides* i (6) *Thiocapsa roseopersicina*.

En *Chl. limicola* UdG6038 (Figura 3.4) la resolució dels isòmers (all-*trans* i 15-*cis*) del Cbt (pics 1 i 3) fou més elevada amb el mètode EP, ja que la separació entre ambdós pics fou major (1,3 min) que amb el mètode NP (1,1 min). D'altra banda, els pics corresponents a neurosporè (Nrp), malgrat ser minoritaris, es van poder resoldre amb molta més claredat amb el mètode EP, ja que van ser pràcticament inapreciables utilitzant el mètode NP. En aquest cas i a diferència del que succeeix amb les altres soques verdes analitzades, no es van detectar pèrdues significatives de carotenoides a les mostres sotmeses a pre-purificació.

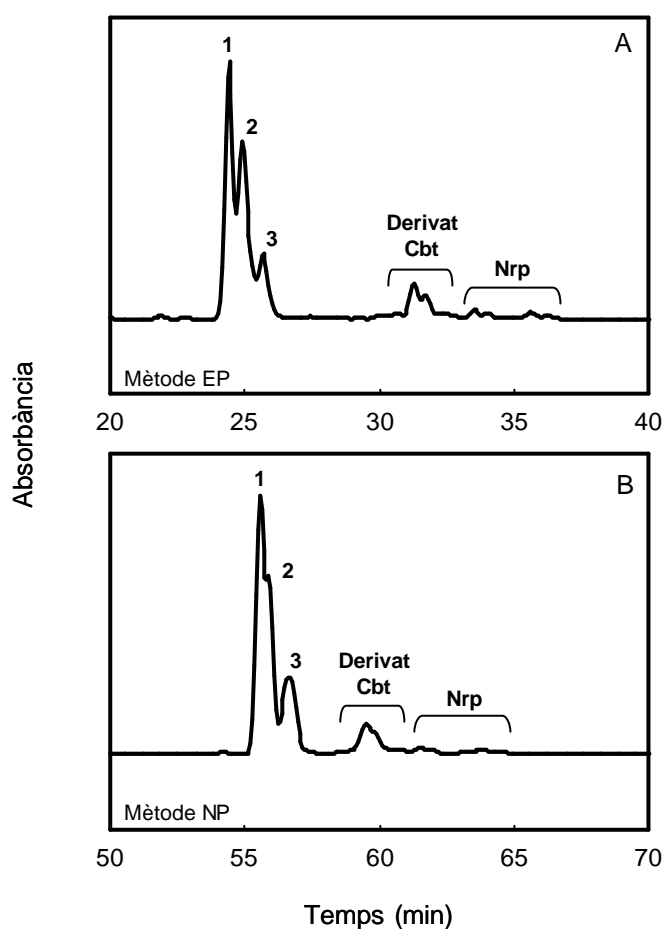


Figura 3.4. Cromatogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Chl. limicola* UdG6038 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt (isòmer *cis* no central) i (3) 15-*cis* Cbt (isòmer *cis* central). Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 463 nm.

Figure 3.4. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Chl. limicola* UdG6038 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt (non-central *cis* isomer) and (3) 15-*cis* Cbt (central *cis* isomer). Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 463 nm.

Com a carotenoides majoritaris de *Chl. limicola* es van identificar el Cbt, isòmers all-*trans* i *cis* (Figura 3.5) i el OH-Cbt, amb espectres d'absorció equivalents als del Cbt. L'isòmer *cis* mostrat a la figura correspon al 15-*cis*, és a dir, aquell que presenta la torsió, deguda al doble enllaç tipus *cis*, al centre de la molècula, i es caracteritza per presentar un pic d'absorció a la regió ultraviolada.

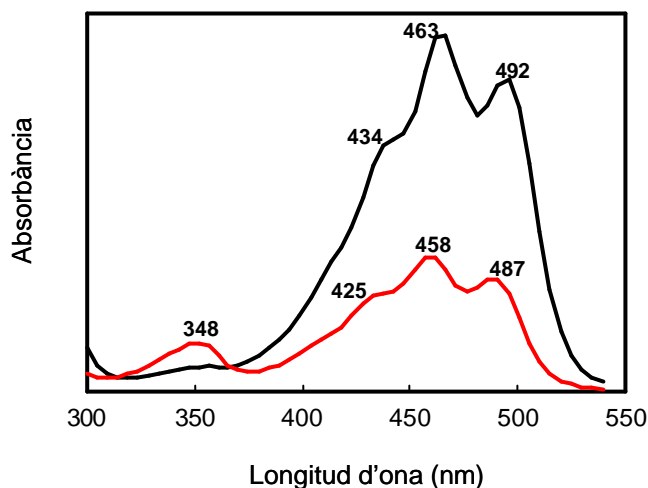


Figura 3.5. Espectres d'absorció del Cbt ($\lambda_{\text{màx}} = 463$ nm). Isòmer all-*trans* (línia negra) i isòmer 15-*cis* (línia vermella).

Figure 3.5. Absorption spectra of Cbt ($\lambda_{\text{max}} = 463$ nm). All-*trans* isomer (black line) and 15-*cis* isomer (red line).

Chl. vibrioforme f. *thiosulfatophilum* NCIB8327, tot i les pèrdues de derivats del OH-Cbt degudes al procés de pre-purificació, presentà uns cromatogrames molt similars per ambdós mètodes (Figura 3.6), tot i que amb el mètode EP es van accentuar més les diferències de polaritat entre el grup de pics corresponent a derivats del OH-Cbt i el grup del Cbt (1–3). Amb el mètode EP els dos grups recentment esmentats es van eluir amb 9,7 minuts de diferència, mentre que amb el mètode NP tan sols es van distanciar 2,1 minuts.

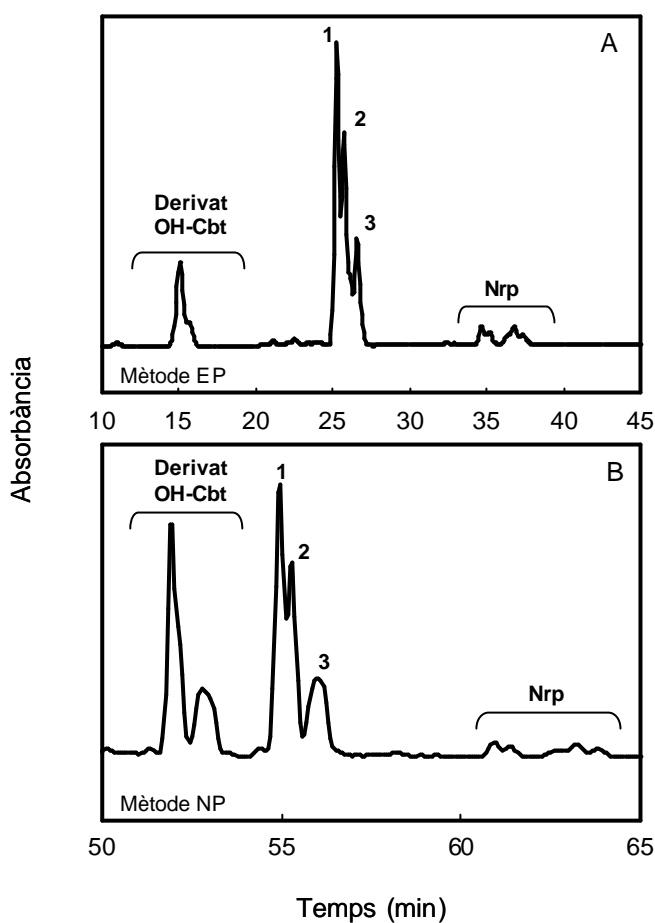


Figura 3.6. Cro matogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Chl. vibrioforme* f. *thiosulphatophilum* NCIB8327 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt, (3) 15-*cis* Cbt i Nrp, neurosporè. Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 463 nm.

Figure 3.6. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Chl. vibrioforme* f. *thiosulphatophilum* NCIB8327 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt, (3) 15-*cis* Cbt and Nrp, neurosporene. Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 463 nm.

En el cas de *Chl. tepidum* ATCC49652 (Figura 3.7) la resolució dels pics corresponents al Cbt (1-3) també va ser més elevada amb el mètode EP, tot i que de nou es van perdre els derivats del OH-Cbt. En les mostres pre-purificades la separació entre l'isòmer all-*trans* Cbt i l'isòmer 15-*cis* Cbt fou de 1,3 minuts, mentre que utilitzant el mètode sense pre-purificar aquesta separació fou de 1,1 minuts.

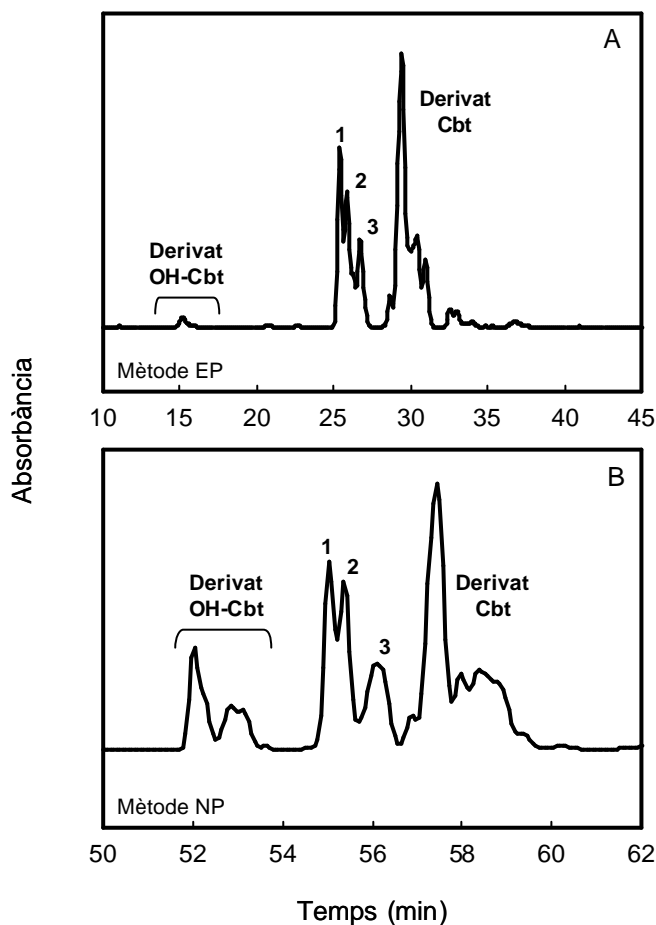


Figura 3.7. Cromatogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Chl. tepidum* ATCC4965 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt i (3) 15-*cis* Cbt. Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 463 nm.

Figure 3.7. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Chl. tepidum* ATCC4965 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt and (3) 15-*cis* Cbt. Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 463 nm.

Pld. clathratiforme UdG7504 (Figura 3.8), per la seva banda, també presentava uns cromatogrames bastant equivalents amb ambdós mètodes, sense pèrdues aparents degudes al procés de pre-purificació.

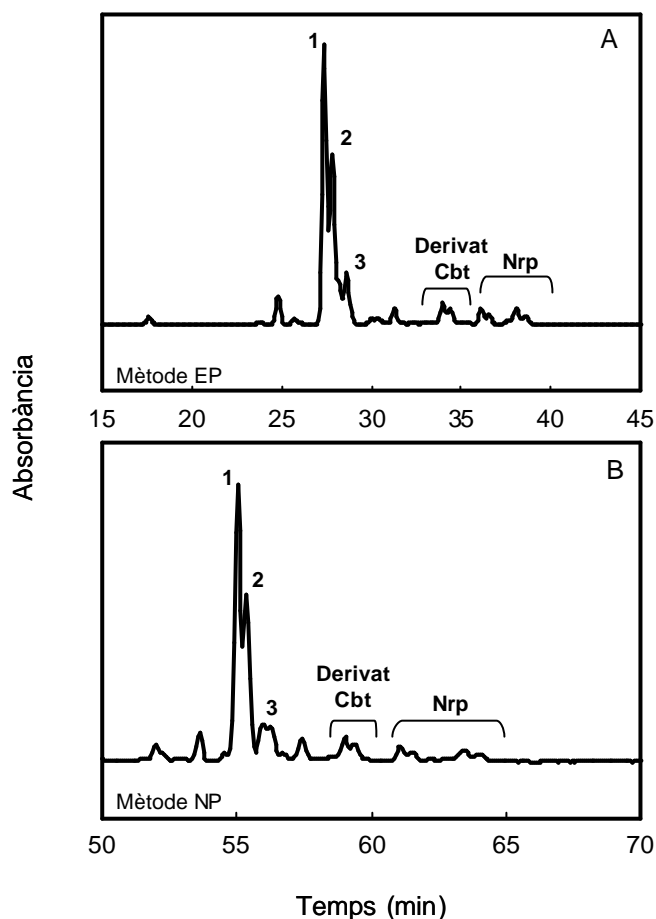


Figura 3.8. Cromatogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Pld. clathratiforme* UdG7504 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt, (3) 15-*cis* Cbt i Nrp, neurosporè. Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 463 nm.

Figure 3.8. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Pld. clathratiforme* UdG7504 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) all-*trans* Cbt, (2) *cis* Cbt, (3) 15-*cis* Cbt and Nrp, neurosporene. Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 463 nm.

Pel que fa a *Chl. phaeobacteroides* CL1401 (Figura 3.9) la resolució de l'Isr (pics 1 i 2) no va presentar diferències entre els dos mètodes. És destacable la presència de pics de Cbt minoritaris, darrera el pic de l'isòmer 15-*cis* Isr (2), més apreciables amb el mètode EP. En aquest cas els carotenoides majoritaris van ser l'Isr, isòmers all-*trans* i 15-*cis* (Figura 3.10) i el β -Isr, els isòmers del qual presenten espectres d'absorció equivalents als de l' Isr.

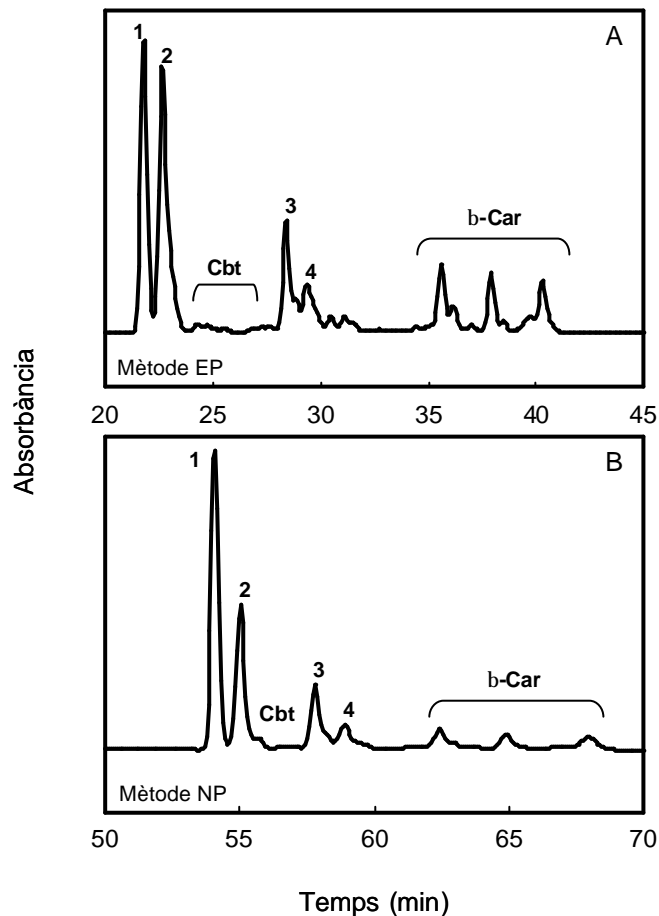


Figura 3.9. Cromatogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) all-*trans* Isr, (2) 15-*cis* Isr, (3) all-*trans* β -Isr i (4) 15-*cis* β -Isr. Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 453 nm.

Figure 3.9. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) all-*trans* Isr, (2) 15-*cis* Isr, (3) all-*trans* β -Isr and (4) 15-*cis* β -Isr. Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 453 nm.

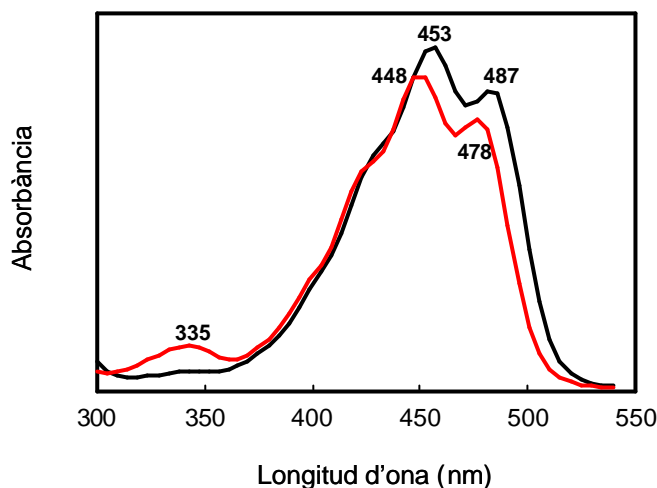


Figura 3.10. Espectres d'absorció de l'Isr ($\lambda_{\text{màx}} = 453 \text{ nm}$). Isòmer all-*trans* (línia negra) i isòmer 15-*cis* (línia vermella).

Figure 3.10. Absorption spectra of Isr ($\lambda_{\text{max}} = 453 \text{ nm}$). All-*trans* isomer (black line) and 15-*cis* isomer (red line).

Finalment, en les mostres de *Thiocapsa roseopersicina* 5811 (Figura 3.11) va destacar la millor resolució obtinguda amb el mètode NP, assumint les pèrdues ocasionades per la pre-purificació que van dificultar la detecció d'alguns dels pics, concretament els corresponents a l'isòmer 15-*cis* de l'Okn (pic 5) i al precursor de l'espiloxantina (pic 6). El principal carotenoide d'aquesta espècie és l'Okn (Figura 3.12).

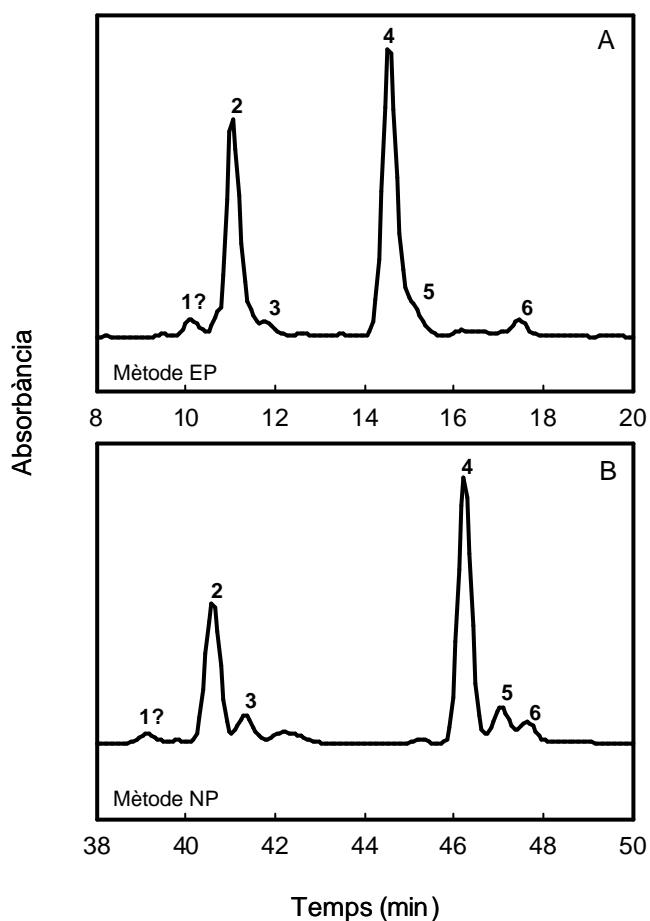


Figura 3.11. Cromatogrames de: (A) un extracte pre-purificat de *Thiocapsa roseopersicina* 5811 i (B) un extracte de la mateixa soca sense pre-purificar. Identificació: (1) rodovibrina ?, (2) derivat all-*trans* Okn, (3) derivat 15-*cis* Okn (4) all-*trans* Okn, (5) 15-*cis* Okn i (6) precursor espiriloxantina. Els pigments identificats amb ambdós mètodes foren els mateixos, però destaquen les diferències en els t_R entre un i altre mètode. Detecció a 490nm.

Figure 3.11. HPLC traces of: (A) a pre-purified extract of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 and (B) a non-pre-purified extract of the same species. Identification: (1) rodovibrina ?, (2) derivat all-*trans* Okn, (3) derivat 15-*cis* Okn (4) all-*trans* Okn, (5) 15-*cis* Okn and (6) spiriloxanthin precursor. Identified pigments were the same with both methods, whereas R_t was different between them. Detection channel was set at 490 nm.

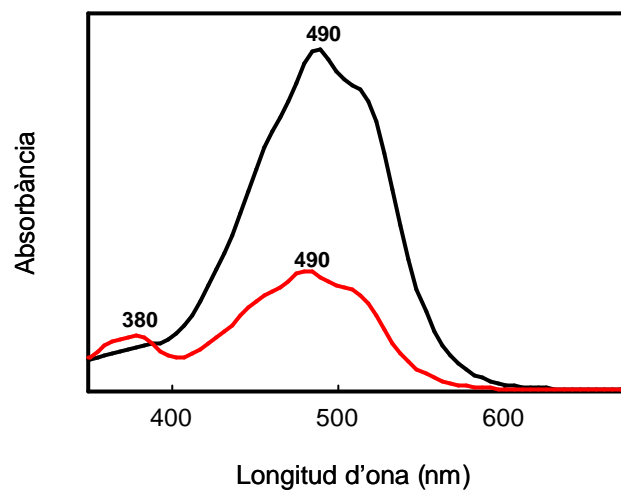


Figura 3.12. Espectres d'absorció de l'Okn ($\lambda_{\max} = 490$ nm). Isòmer all-*trans* (línia negra) i isòmer 15-*cis* (línia vermella).

Figure 3.12. Absorption spectra of Okn ($\lambda_{\max} = 490$ nm). All-*trans isomer* (black line) and 15-*cis isomer* (red line).

3.2.2. Identificació dels carotenoides de *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses

Tot i que els carotenoides dels GSB ja havien estat prèviament identificats mitjançant HPLC (veure Apartat anterior), la utilització de cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses (LC-MS/MS) va permetre confirmar-ne la seva identificació. Amb aquesta tècnica més resolutive es va detectar un major nombre de pics per cada tipus de carotenoide, malgrat que els isòmers principals per cadascun d'ells foren els mateixos que es detectaren per HPLC.

Els carotenoides de l'espècie estudiada es van dividir en tres tipus principals (Figura 3.13). En total es detectaren 11 pics, dels quals 8 foren identificats gràcies al bon senyal generat (Figura 3.13). Aquests pics es distribuïren en quatre grups. El primer i més abundant estava constituït per l'Isr, concretament per un isòmer all-*trans* (pic 1) i un isòmer 15-*cis* (pic 2). El segon grup estava format per un isòmer all-*trans* (pic 3) i dos isòmers *cis* (pics 4 i 5) del β -Isr. El tercer grup estava format per un isòmer all-*trans* (pic 6) i dos isòmers *cis* (pics 7 i 8) del β -Car. Finalment, en el darrer grup, es detectà un isòmer all-*trans* i dos isòmers *cis* d'un carotè no identificat i que mostrava una polaritat més elevada (pics 9-11). A la Taula 3.4 es recullen els pesos moleculars dels diferents carotenoides detectats, així com el nombre i tipus d'isòmers per cadascun d'ells. Atès que sembla clar que *Chl. phaeobacteroides* CL1401 presentava diferents isòmers, per cada tipus de carotenoide, es va decidir realitzar una sèrie d'estudis encaminats a esbrinar si aquests isòmers eren realment constitutius de l'aparell fotosintètic o bé eren artefactes generats durant la manipulació de les mostres.

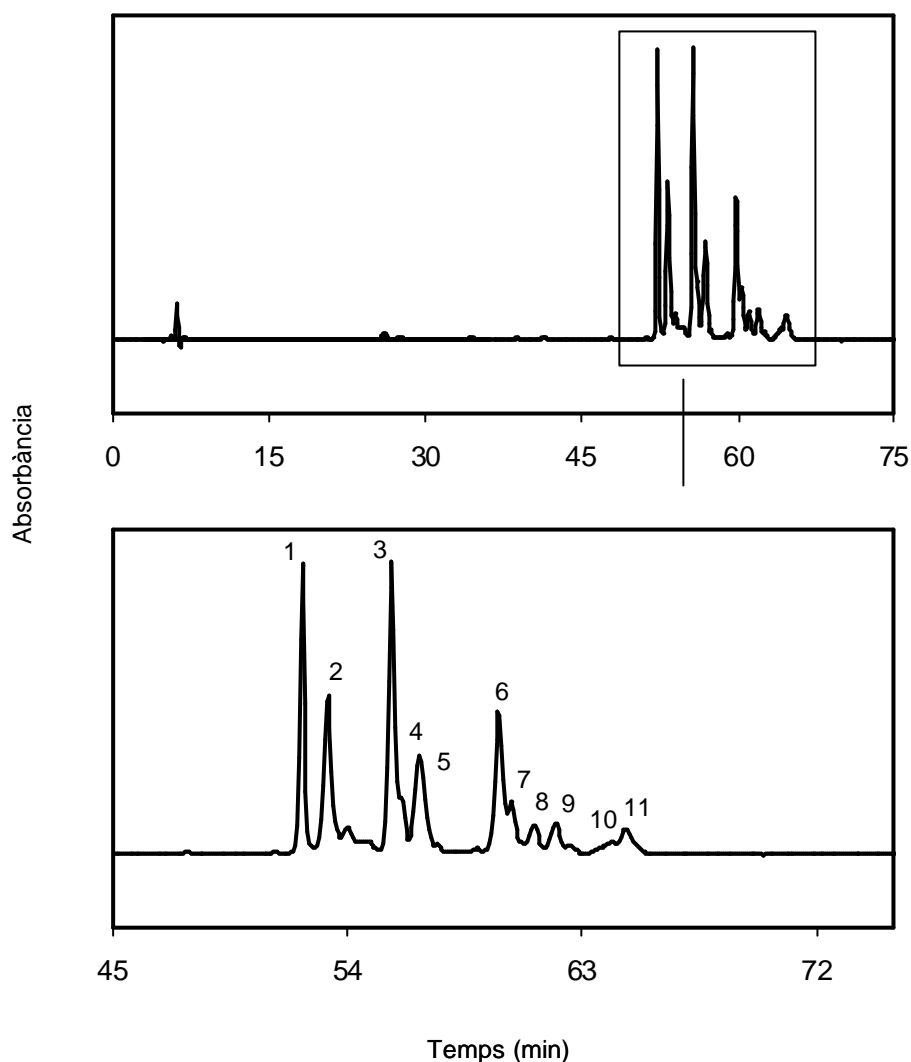


Figura 3.13. Cromatograma, enregistrat a 453 nm, d'un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401, analitzat posteriorment per APCI-LC-MS. Identificació: (1) all-*trans* Isr, (2) 15-*cis* Isr, (3) all-*trans* β -Isr, (4) *cis* β -Isr, (5) 15-*cis* β -Isr, (6) all-*trans* β -carotè, (7) *cis* β -carotè, (8) 15-*cis* β -carotè, (9) all-*trans* carotè no identificat, (10) *cis* carotè no identificat i (11) 15-*cis* carotè no identificat.

Figure 3.13. HPLC trace of the carotenoid extract from *Chl. phaeobacteroides* CL1401. This extract was further analysed by APCI-LC-MS. Carotenoids were detected at 453 nm. Peak identification: (1) all-*trans* Isr, (2) 15-*cis* Isr, (3) all-*trans* **b**-Isr, (4) 15-*cis* **b**-Isr, (5) 15-*cis* **b**-Isr, (6) all-*trans* **b**-carotene, (7) *cis* **b**-carotene, (8) 15-*cis* **b**-carotene, (9) all-*trans* unidentified carotene, (10) *cis* unidentified carotene and (11) 15-*cis* unidentified carotene.

Taula 3.4. Pes molecular i nombre i tipus d'isòmers dels carotenoides procedents de l'extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 analitzat per APCI-LC-MS. A la última columna s'indiquen les figures corresponents a l'espectre de masses de cada carotenoide.

Table 3.4. Molecular weight, number and type of isomers of the main carotenoids from *Chl. phaeobacteroides* CL1401 analysed by APCI-LC-MS. The last column indicates the figures where the mass spectra of the identified peaks are shown.

Nº pic	Carotenoide	[M+H] ⁺	Espectre de masses
1	all-trans lsr	528 + 1	Fig. 3.14 (pàg.92)
2	15-cis lsr	528 + 1	Fig. 3.15 (pàg.93)
3	all-trans β-lsr	532 + 1	Fig. 3.16 (pàg.94)
4	cis β-lsr	532 + 1	
5	15-cis β-lsr	532 + 1	Fig. 3.17 (pàg.95)
6	all-trans β-Carotè	535 + 1	Fig. 3.18 (pàg.96)
7	cis β-Carotè	535 + 1	
8	15-cis β-Carotè	535 + 1	Fig. 3.19 (pàg.97)
9-11	Car no identificat	537 + 1	

Les figures 3.14–3.19 corresponen als espectres de masses obtinguts per cadascun dels pics detectats. Per cadascun dels isòmers, i degut a la tècnica d'espectrometria de masses emprada (Apartat 2.5) es van obtenir tres tipus d'espectres: en el primer (MS1) es mostra l'abundància relativa de les molècules protonades obtingudes després de la ionització de la mostra. A partir de la fragmentació d'aquestes molècules s'obtenia el segon espectre de masses (MS2), en el qual es mostra l'abundància dels fragments obtinguts. En el tercer espectre (MS3) es mostra l'abundància dels fragments generats a partir de la fragmentació de la partícula més abundant obtinguda després del primer trencament de la molècula. Tot i que en al cas que ens ocupa l'espectre MS1 va ser suficient per a la identificació de les molècules analitzades, ja que el pes molecular dels carotenoides dels GSB ja ha estat prèviament determinat, la informació proporcionada pels altres dos espectres (MS2 i MS3) pot ser, en alguns casos, d'utilitat alhora d'identificar molècules de pes molecular desconegut.

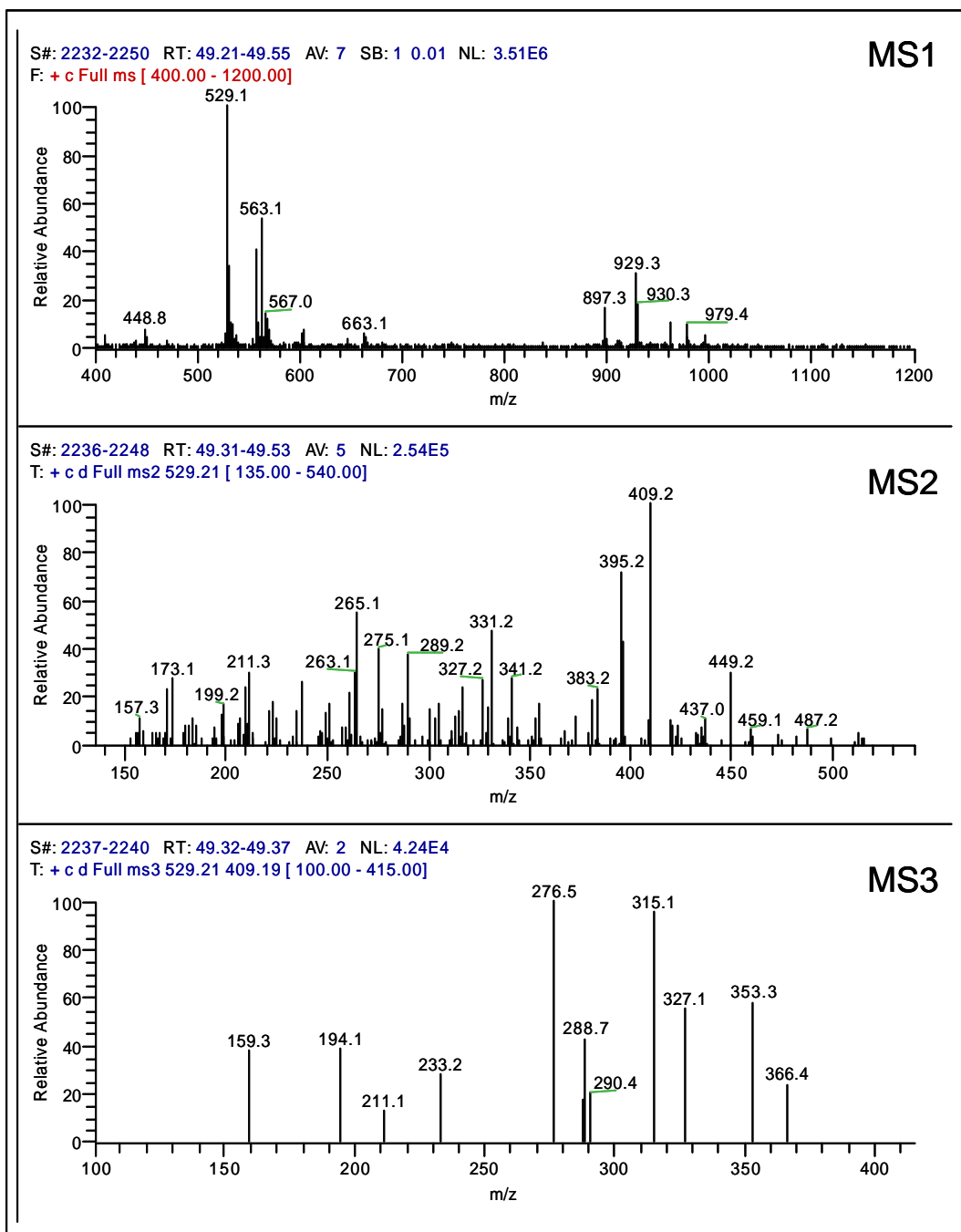


Figura 3.14. Espectres de masses del all-*trans* Isr (Pic 1, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 529. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 409.

Figure 3.14. Mass spectra of the all-*trans* Isr (peak 1 in Fig. 3.13). Full MS1 shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 529. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 409.

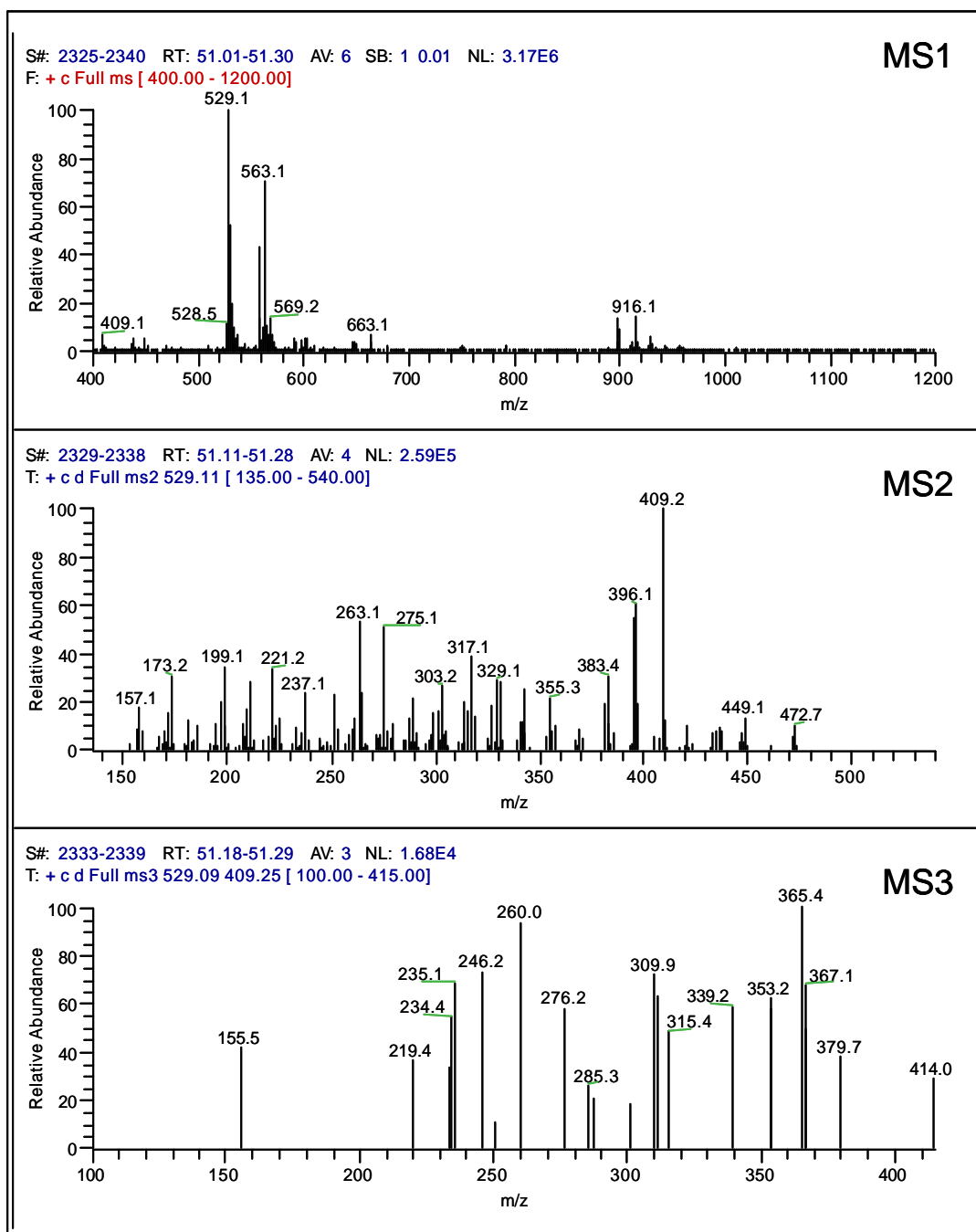


Figura 3.15. Espectres de masses del 15-*cis* Isr (Pic 2, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 529. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 409.

Figure 3.15. Mass spectrum of the 15-*cis* Isr (peak 2 in Fig. 3.13). Full MS1 shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 529. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 409.

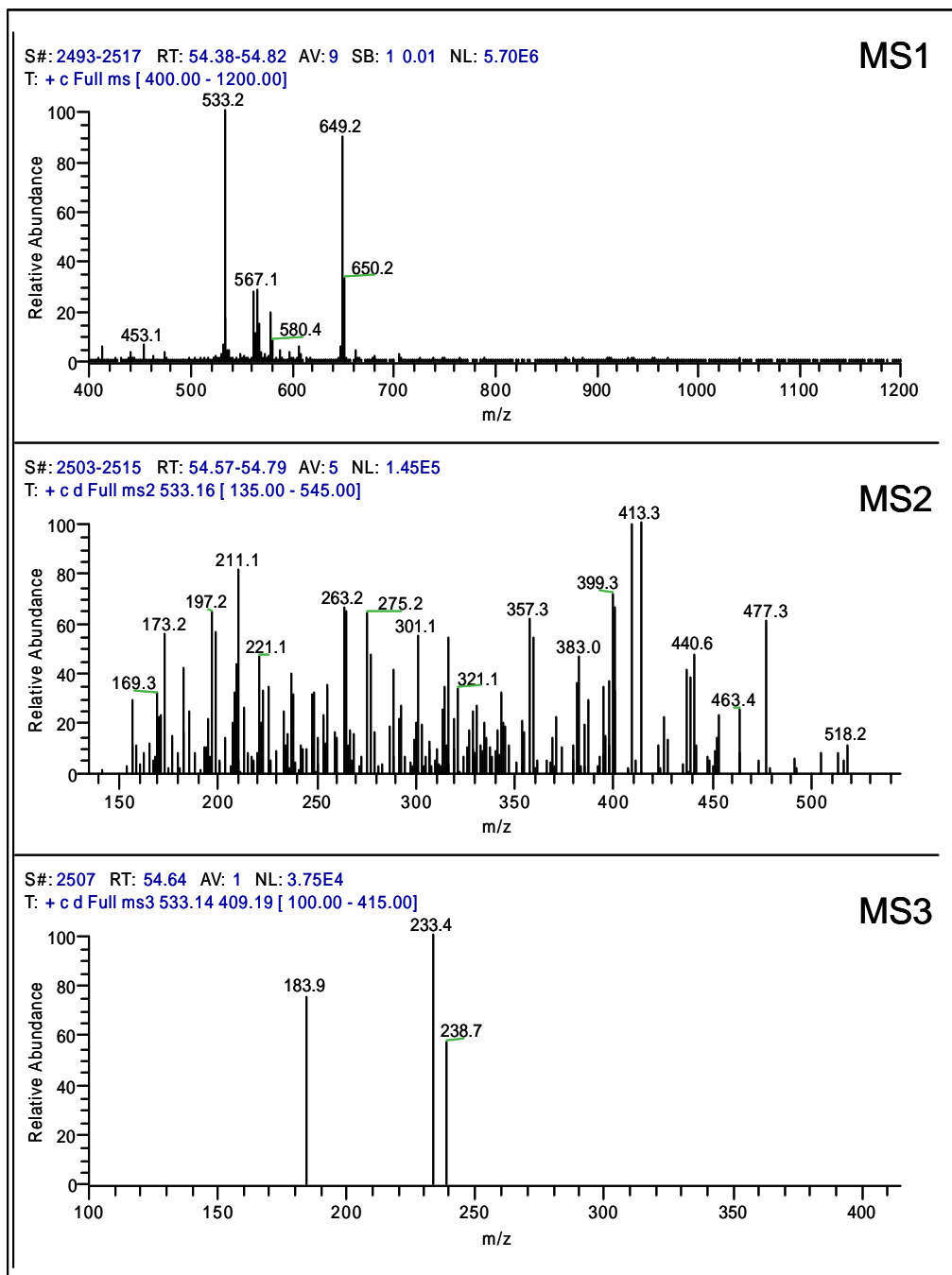


Figure 3.16. Espectres de masses del all-*trans* β -Isr (Pic 3, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 533. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 413.

Figure 3.16. Mass spectra of the all-*trans* **b**-Is (peak 3 in Fig. 3.13). Full MS1 shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 533. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 413.

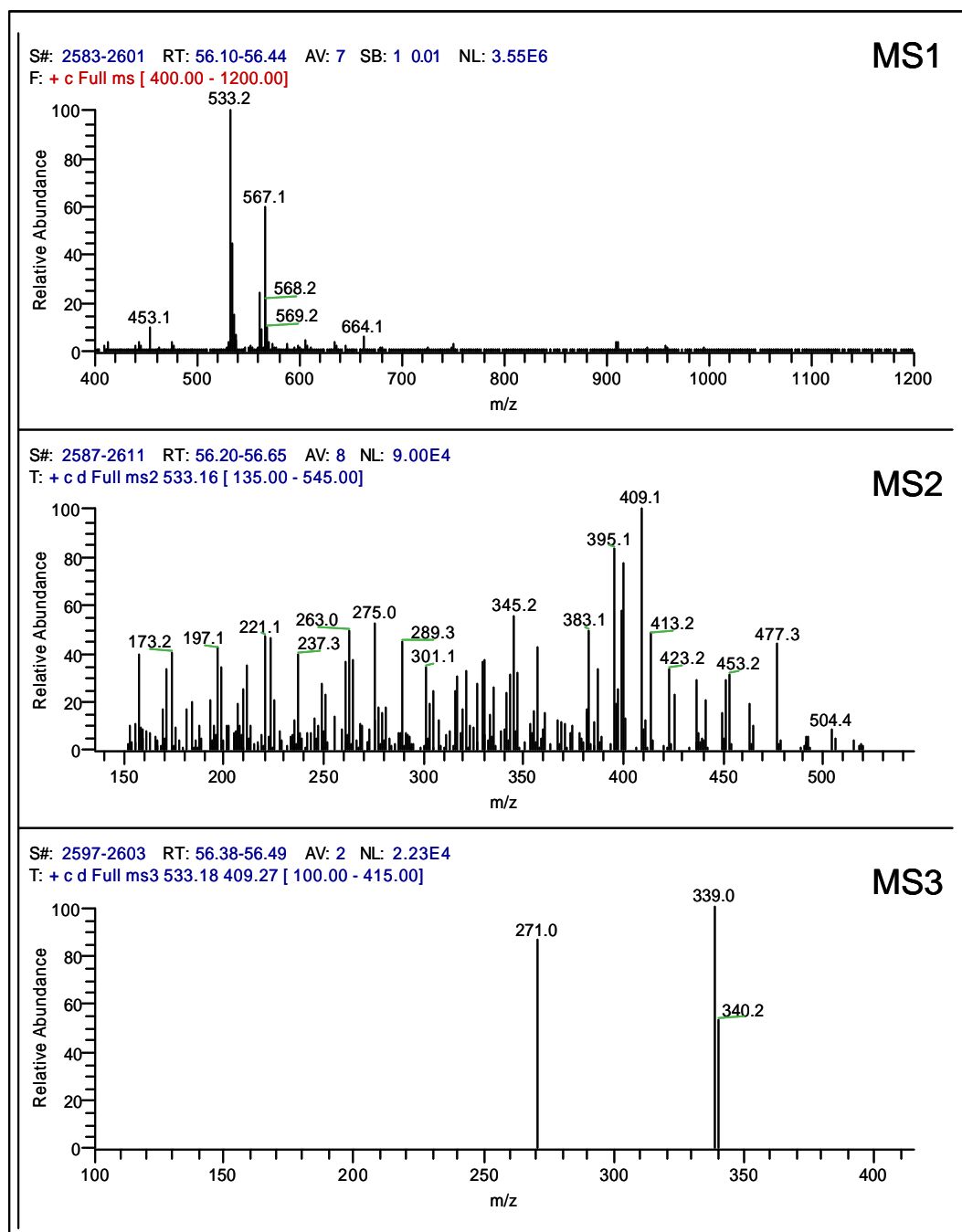


Figure 3.17. Espectres de masses del 15-*cis* β -Isr (Pic 5, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 533. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 409.

Figure 3.17. Mass spectra of the 15-*cis* **b**-Isr (peak 5 in Fig. 3.13). Full MS shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 533. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 409.

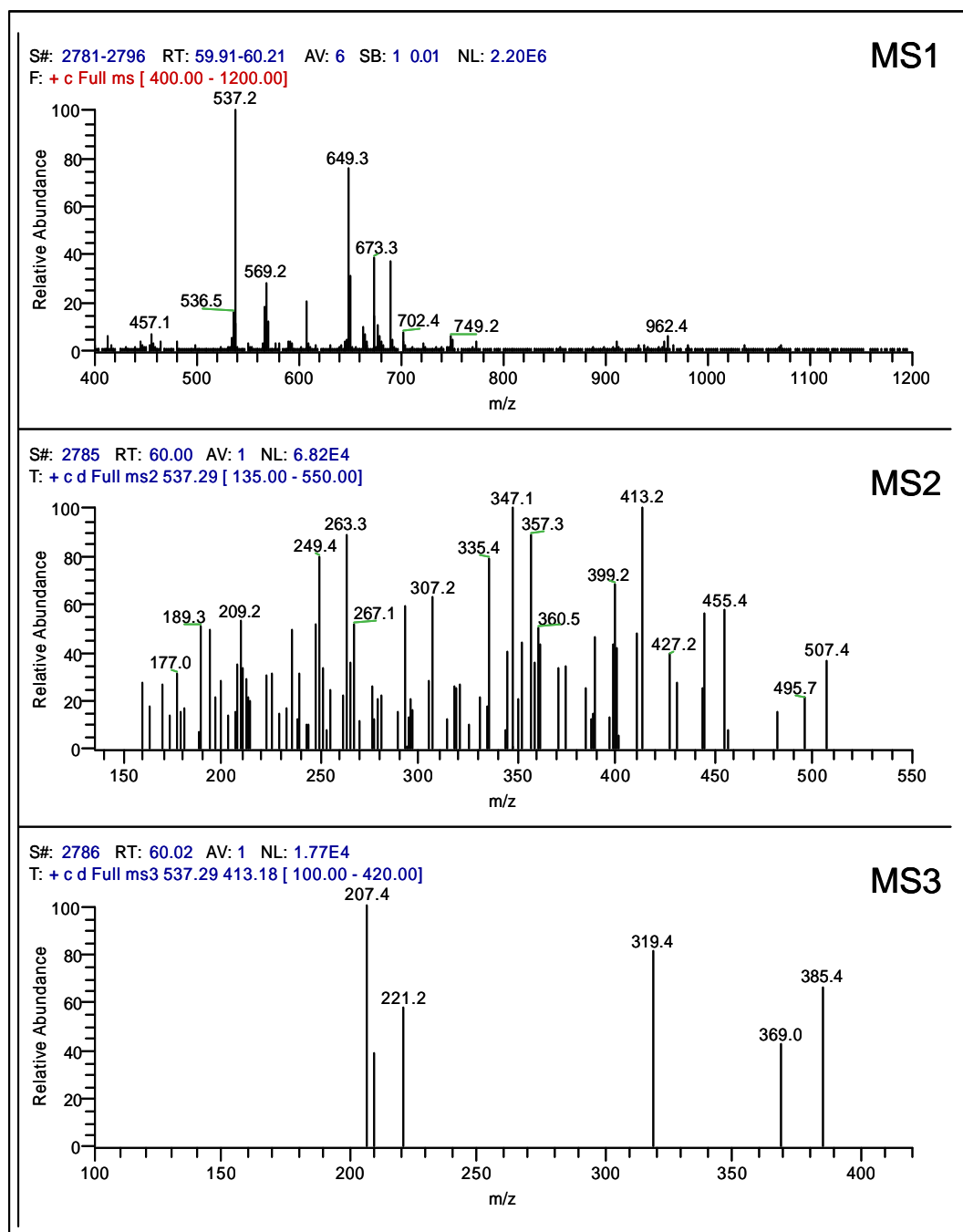


Figure 3.18. Espectres de masses del all-*trans* β -Car (Pic 6, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 537. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 413.

Figure 3.18.. Mass spectra of the all-trans β -Car (peak 6 in Fig. 3.13). Full MS1 shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 537. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 413.

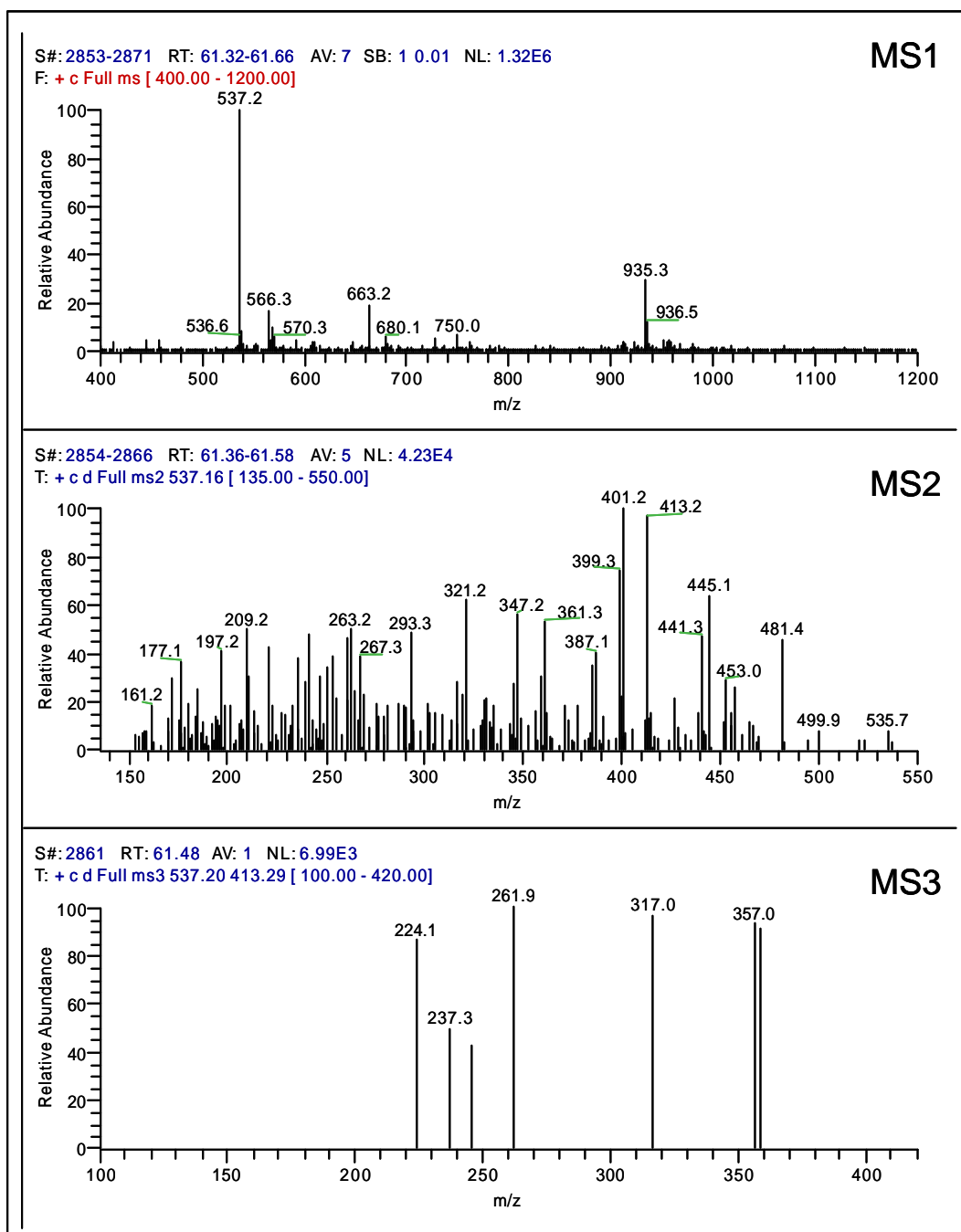


Figure 3.19. Espectres de masses del 15-*cis* β -Car (Pic 8, Figura 3.13). MS1: abundància de les molècules protonades. MS2: abundància relativa dels fragments obtinguts després de la fragmentació del m/z 537. MS3: fragments obtinguts després de la fragmentació del fragment m/z 401.

Figure 3.19. Mass spectra of the 15-*cis* β -Car (peak 8 in Fig. 3.13). Full MS shows the protonated molecules. Full MS2 shows the relative abundance of the fragments obtained after the fragmentation of m/z 537. Full MS3 corresponds to the fragments obtained after the fragmentation of m/z 401.

3.2.3. Variacions quantitatives en el contingut d'isòmers dels carotenoides de les espècies marrons de *Bacteris Verds del Sofre*

Un dels objectius que es van plantejar en un principi fou el de determinar si la diversitat d'isòmers dels principals carotenoides en GSB era constitutiva de l'espècie bacteriana en qüestió, o bé era un artefacte produït durant l'extracció dels pigments i posterior manipulació de la mostra. Això era d'especial interès per la correcta interpretació dels experiments de fisiologia realitzats posteriorment amb diferents espècies de GSB (Capítol 4). Per aquest motiu es va dissenyar un protocol experimental (detallat en l'apartat 2.6) per analitzar possibles canvis en la composició d'isòmers dels principals carotenoides de les espècies estudiades.

En primer lloc es va comprovar si tant les BCl's com els carotenoides es veien afectats qualitativament i quantitativament després d'exposicions continuades (des de 0 fins a 12 h) a la llum ($80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A nivell qualitatiu els espectres d'absorció, tant de BCl *e* com de carotenoides, no presentaren canvis pel que fa als màxims d'absorció. A nivell quantitatiu, en canvi, es va evidenciar una reducció aparent en el contingut de BCl *e* a partir dels 30 minuts. En aquest temps el percentatge de pèrdues de BCl *e* fou del 60 % (Figura 3.20). A partir de 4 h d'incubació tota la BCl *e* havia desaparegut. Pels carotenoides, en canvi, aquesta reducció fou discreta i el valor més elevat de pèrdues fou del 30 % després de 12 h d'exposició a les mateixes condicions lumíniques. La taxa de degradació de la BCl *e*, calculada a partir d'ajustar les dades experimentals a una corba exponencial negativa, fou de $0,03 \mu\text{mols l}^{-1} \text{min}^{-1}$. La concentració de carotenoides, en canvi, no va arribar a desaparèixer al llarg de les 12 h d'incubació a la llum.

En condicions de foscor, d'altra banda, tant la concentració de BCl *e* com la de Car foren constants després de mantenir l'extracte fins a 12 h preservat de la llum (Figura 3.21).

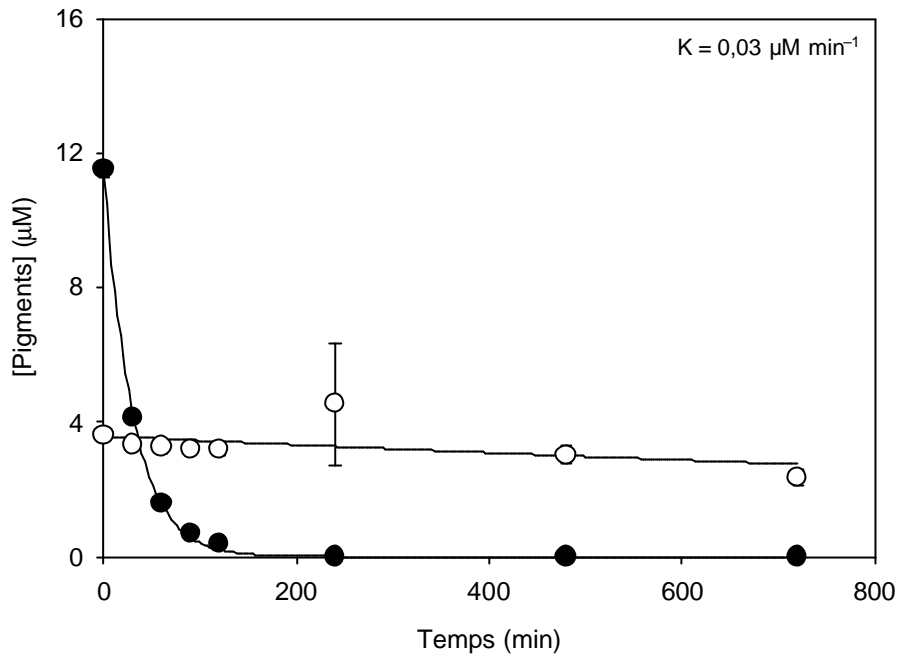


Figura 3.20. Concentració (μM) de BChl *e* (●) i Car (○) durant la incubació de l'extracte de *Chl.phaeobacteroides* CL1401 sota condicions d'il·luminació ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El valor de K és la taxa de degradació de la BChl *e*.

Figure 3.20. BChl *e* (●) and Car (○) concentration (μM) changes during the incubation of a *Chl.phaeobacteroides* CL1401 pigment extract at $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 12 hours. K is the degradation rate of BChl *e*.

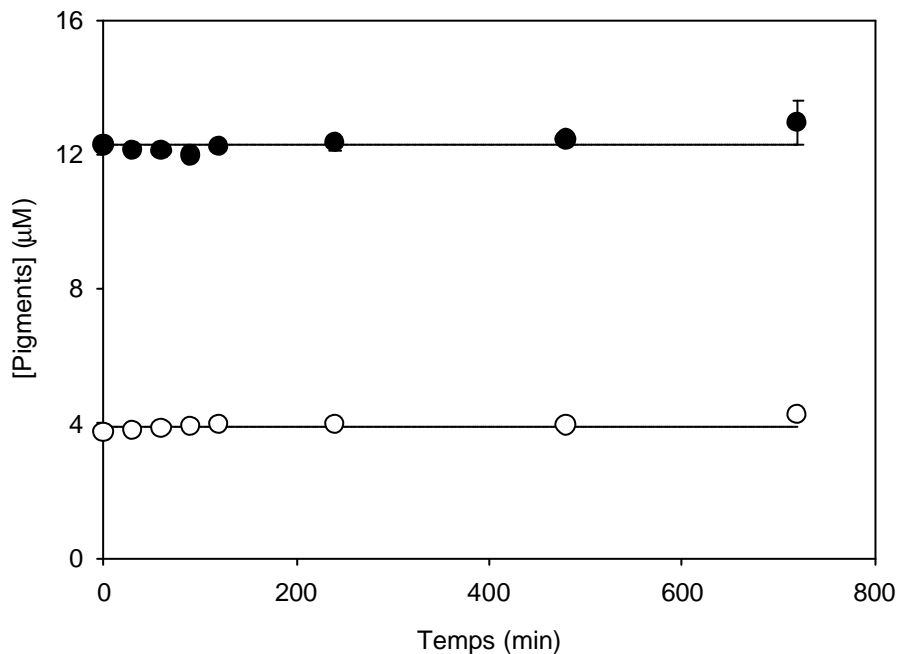


Figura 3.21. Concentració (μM) de BChl *e* (●) i Car (○) durant la incubació de l'extracte de *Chl.phaeobacteroides* CL1401 sota condicions de foscor.

Figure 3.21. BChl *e* (●) and Car (○) concentration (μM) changes during the incubation of a *Chl.phaeobacteroides* CL1401 pigment extract in the dark.

A partir d'aquests assajos també es calcularen les relacions *trans/cis* pels principals carotenoides de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 (Isr, β -Isr i β -Car). Aquestes es mantingueren pràcticament constants al llarg de les 12 h d'incubació sota les dues condicions assajades i pràcticament no s'observaren canvis entre llum i fosc (Taula 3.5). A la Figura 3.22 es pot observar l'evolució constant de les relacions *trans/cis* pels carotenoides més abundants, Isr i β -Isr, a les espècies marrons de GSB.

Taula 3.5. Valor mitjà de les relacions *trans/cis*, calculat després de mantenir durant 12 h un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 sota condicions de llum ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i de fosc.

Table 3.5. Average *trans/cis* ratios calculated after a 12 h incubation of pigment extract of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 under light and dark conditions.

	LLUM	FOSCOR
Isr <i>trans/cis</i>	2,53	3,12
β -Isr <i>trans/cis</i>	1,93	2,93
β -Car <i>trans/cis</i>	3,24	3,69

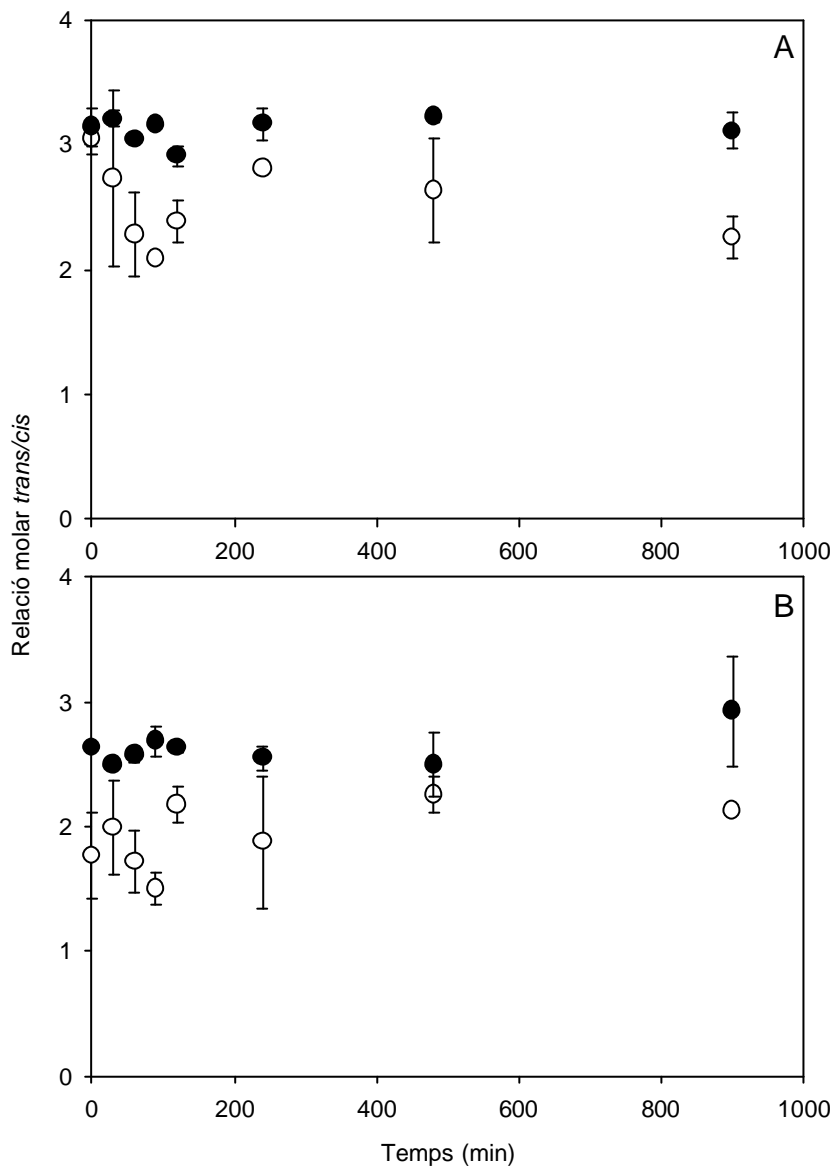


Figura 3.22. Relacions molars entre els isòmers (*trans/cis*) de l'Isr (A) i del β -Isr (B) després de la incubació dels extractes de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 a la llum (○) i a la foscor (●).

Figure 3.22. *Trans/cis* ratios of the Isr (A) and the β -Isr (B) from a *Chl. phaeobacteroides* CL1401 extract after the incubation under light (○) and dark (●).

També es va determinar si l'estat d'isomerització dels diferents carotenoides es veia afectat per l'estat d'oxido-reducció del medi, en aquest cas el solvent utilitzat per l'extracció. Per això es van afegir als extractes de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 diferents agents oxidants

(dimetilsulfòxid i peròxid d'hidrogen) i reductors (ascorbat sòdic i ditionit sòdic) per tal d'avaluar possibles canvis en l'esmentada composició dels isòmers.

D'entre tots els agents assajats només el ditionit sòdic (10 mM) va induir canvis en la composició d'isòmers respecte l'extracte control. El ditionit sòdic, utilitzat en experiments de transferència d'energia pel seu caràcter reductor, va causar unes pèrdues del 97,8 % en el cas de la BCl *e* i del 80,8 % en el cas dels carotenoides, després d'incubar els extractes durant 2 h a les fosques emprant-lo a una concentració de 10 mM (Taula 3.6). També les relacions *trans/cis* calculades pels principals carotenoides foren pràcticament equivalents entre la mostra control i les mostres tractades amb tots els agents assajats, excepte les que foren incubades amb ditionit sòdic 10 mM (Taula 3.7).

Taula 3.6. Pèrdues de pigments (en %) obtingudes després d'incubar durant 2 h , en condicions de foscor, un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 amb diferents agents oxidants i reductors (concentració de 10 mM). DMSO: dimetilsulfòxid, H₂O₂: peròxid d'hidrogen, AA: àcid ascòrbic i DS: ditionit sòdic.

Table 3.6. Pigment losses (in %) of the extract of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 after 2 hours of dark incubation under oxidising and reducing conditions. All treatments were performed at a final concentration of 10 mM. DMSO: dimethylsulfoxide, H₂O₂: hydrogen peroxide, AA: ascorbic acid and DS: sodium dithionite.

Agent	Condicions	Pèrdues BCl <i>e</i> (%)	Pèrdues Car (%)
Control		0	0
DMSO	oxidants	12,1 ± 3,65	15,5 ± 0,70
H ₂ O ₂	oxidants	8,9 ± 2,35	15,5 ± 1,17
AA	reductores	8,1 ± 1,75	10,6 ± 0,39
DS	reductores	97,8 ± 0,84	80,8 ± 2,03

Taula 3.7. Relacions molars (*trans/cis*) dels carotenoides de *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 amb els diferents tractaments aplicats. Les incubacions amb tots els agents assajats foren de 2 h en condicions de foscor. DMSO: dimetilsulfòxid, H₂O₂: peròxid d'hidrogen, AA: àcid ascòrbic i DS: ditionit sòdic.

Table 3.7. *Trans/cis ratios of carotenoids from Chlorobium phaeobacteroides CL1401 after the different treatments applied. The incubations were performed in the dark for 2 h. DMSO: dimethylsulfoxide, H₂O₂: hydrogen peroxide, AA: ascorbic acid and DS: sodium dithionite.*

Tractament	l _{sr} (<i>trans/cis</i>)	b-l _{sr} (<i>trans/cis</i>)	b-Carotene (<i>trans/cis</i>)
Control	3,1	3,5	3,7
DMSO	3,1 ± 0,05	2,8 ± 0,09	4,1 ± 1,12
H ₂ O ₂	2,5 ± 0,19	2,4 ± 0,29	2,7 ± 0,19
AA	3,1 ± 0,01	3,2 ± 0,05	5,4 ± 0,45
DS	1,3 ± 0,01	1,1 ± 0,00	2,0 ± 0,64

Atès que l'addició de ditionit sòdic alterava dràsticament la concentració de pigments, es va realitzar una cinètica de desaparició dels pigments al llarg del temps emprant una concentració final d'aquest agent de 10 mM. El temps d'incubació necessari perquè el ditionit sòdic reduís en un 50 % (t_{50}) el contingut de pigments, fou de 5 min, tant per la BCl *e* com pels Car (Figura 3.23). A més, també es va calcular la concentració de ditionit sòdic necessària per disminuir en un 50 % el contingut de pigments, obtenint-se un valor de 5 mM, que fou també comú per la BCl *e* i pels carotenoides (Figura 3.24).

Paral·lelament, l'assaig amb els diferents agents oxidants i reductors es va realitzar mantenint els extractes en condicions d'il·luminació, per tal d'avaluar l'efecte combinat de les condicions d'oxido-reducció i d'il·luminació. Les incubacions en aquest cas foren també de dues hores, període després del qual les pèrdues de BCl *e* van ser significativament superiors a les obtingudes en condicions de foscor (Taula 3.8). Pels carotenoides, en canvi, les pèrdues sota ambdues condicions lumíniques foren pràcticament equivalents. Les relacions *trans/cis*, d'altra banda, també foren notablement diferents entre el control i el tractament amb ditionit sòdic, mentre que per la resta d'agents assajats, les diferències foren poc pronunciades (Taula 3.9).

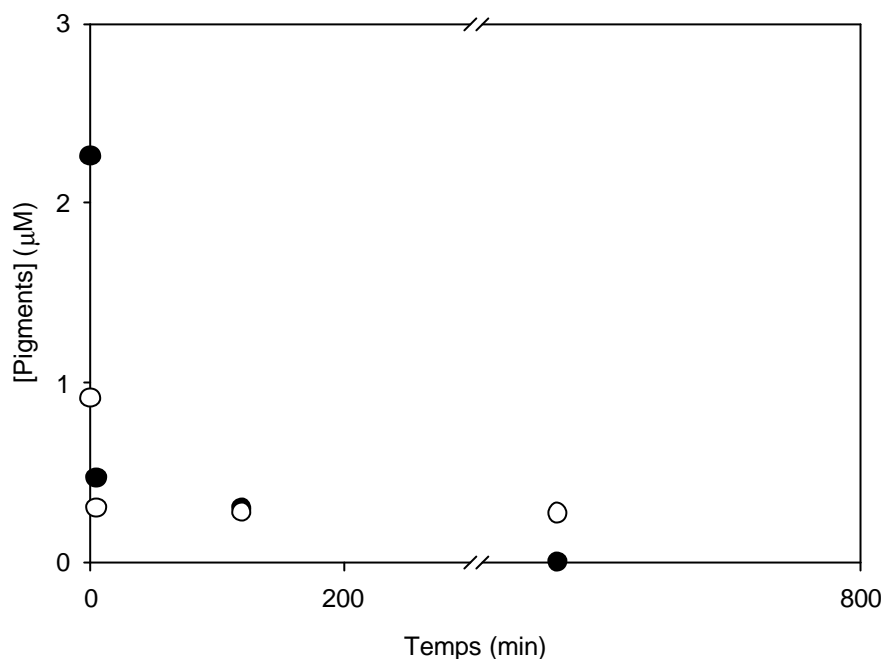


Figura 3.23. Concentració (μM) de BChl *e* total (●) i de Car (○) durant 12 h d'incubació en condicions de foscor d'un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 amb una concentració de ditionit sòdic (DS) 10 mM. El valor de *K* és la taxa de degradació de la BChl *e*.

Figure 3.23. Concentration (μM) of total BChl *e* (●) and Car (○) in a *Chl. phaeobacteroides* CL1401 extract after incubation for 12 hours in the dark with 10 mM sodium dithionite. *K* is the degradation rate of BChl *e* disappear.

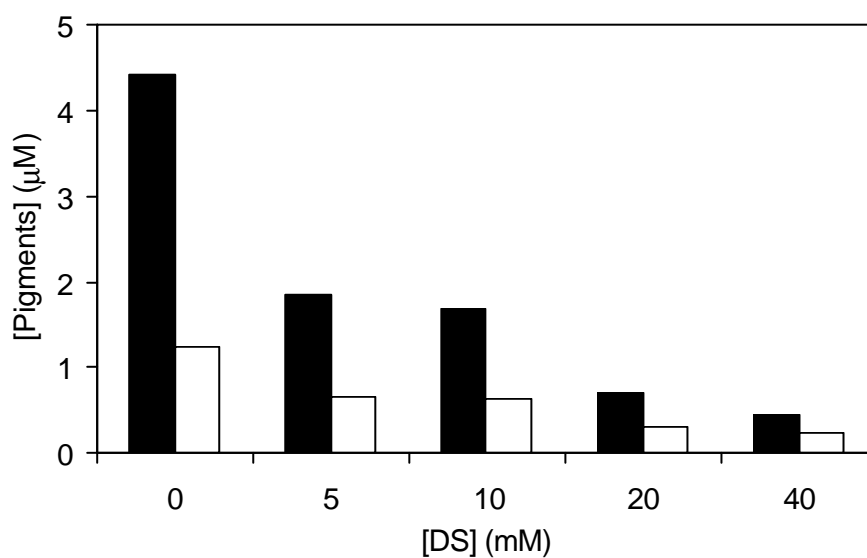


Figura 3.24. Concentració (μM) de BChl *e* total (barres negres) i Car (barres blanques) durant 2 h d'incubació en condicions de foscor d'un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 amb diferents concentracions de ditionit sòdic.

Figure 3.24. Concentration (μM) of total BChl *e* (black bars) and Car (white bars) in a *Chl. phaeobacteroides* CL1401 extract after incubation for 2 hours in the dark with different sodium dithionite concentrations.

Taula 3.8. Pèrdues de pigments (en %) obtingudes després d'incubar en condicions d'il·luminació durant 2 h un extracte de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 amb diferents agents oxidants i reductors. En tots els casos la concentració assajada fou de 10 mM. DMSO: dimetilsulfòxid, H₂O₂: peròxid d'hidrogen, AA: àcid ascòrbic i DS: ditionit sòdic.

Table 3.8. Pigment losses (in %) in an extract of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 after 2 hours of incubation, in the light, under oxidising and reducing conditions. All the treatments were performed at a final concentration of 10 mM. DMSO: dimethylsulfoxide, H₂O₂: hydrogen peroxide, AA: ascorbic acid and DS: sodium dithionite.

Agent	Condicions	Pèrdues BCl e (%)	Pèrdues Car (%)
Control		0	0
DMSO	oxidants	73,2 ± 1,54	18,3 ± 0,94
H ₂ O ₂	oxidants	67,8 ± 1,19	18,1 ± 1,01
AA	reductores	59,5 ± 0,74	15,3 ± 2,34
DS	reductores	90,6 ± 0,45	80,2 ± 0,47

Taula 3.9. Relacions molars (*trans/cis*) dels carotenoides de *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 amb els diferents tractaments aplicats. El període d'incubació en tots els casos fou de 2 h i en condicions d'il·luminació. DMSO: dimetilsulfòxid, H₂O₂: peròxid d'hidrogen, AA: àcid ascòrbic i DS: ditionit sòdic.

Table 3.9. *Trans/cis* ratios of carotenoids from *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 after the different treatments. Incubations were performed in the light for 2 h. DMSO: dimethylsulfoxide, H₂O₂: hydrogen peroxide, AA: ascorbic acid and DS: sodium dithionite.

Tractament	Isr (<i>trans/cis</i>)	b-Isr (<i>trans/cis</i>)	b-Carotene (<i>trans/cis</i>)
Control	3,1	3,5	3,7
DMSO	2,9 ± 0,02	3,0 ± 0,44	4,1 ± 0,03
H ₂ O ₂	2,7 ± 0,06	3,1 ± 0,44	3,5 ± 0,03
AA	3,2 ± 0,06	3,0 ± 0,01	4,8 ± 0,37
DS	1,2 ± 0,02	1,1 ± 0,01	2,4 ± 0,43

3.2.4. Aplicacions del mètode desenvolupat. Anàlisi pigmentària en sediments lacustres antics de la zona de Banyoles

Les anàlisis cromatogràfiques de les mostres de sediments lacustres obtinguts a la bòbila d'Ordis (veure Apartat 2.4.5.1) varen revelar la presència de dos grans tipus de pigments fotosintètics. Degut a la complexitat associada a aquestes mostres l'anàlisi es va realitzar utilitzant el mètode NP. Com a pigments majoritaris es varen detectar carotenoides, tant algals com bacterians, mentre que també es trobaren restes de BCl *e* i derivats de la mateixa tot i que en quantitats traça. A més, per millorar la detecció i identificació dels derivats de BCl *e* es va realitzar una nova modificació del mètode de Borrego i Garcia-Gil (1994) (mètode DB, Apartat 2.4.5.3 de Material i Mètodes) que va permetre resoldre la gran quantitat de derivats detectats.

Pel que fa als carotenoides es van observar tres grups amb polaritats clarament diferenciades (Figura 3.25 i Taula 3.10). Els dos primers grups corresponien a xantofil·les algals, mentre que el tercer corresponia a carotenoides bacterians, concretament a aril-carotenoides possiblement associats a espècies marrons de GSB.

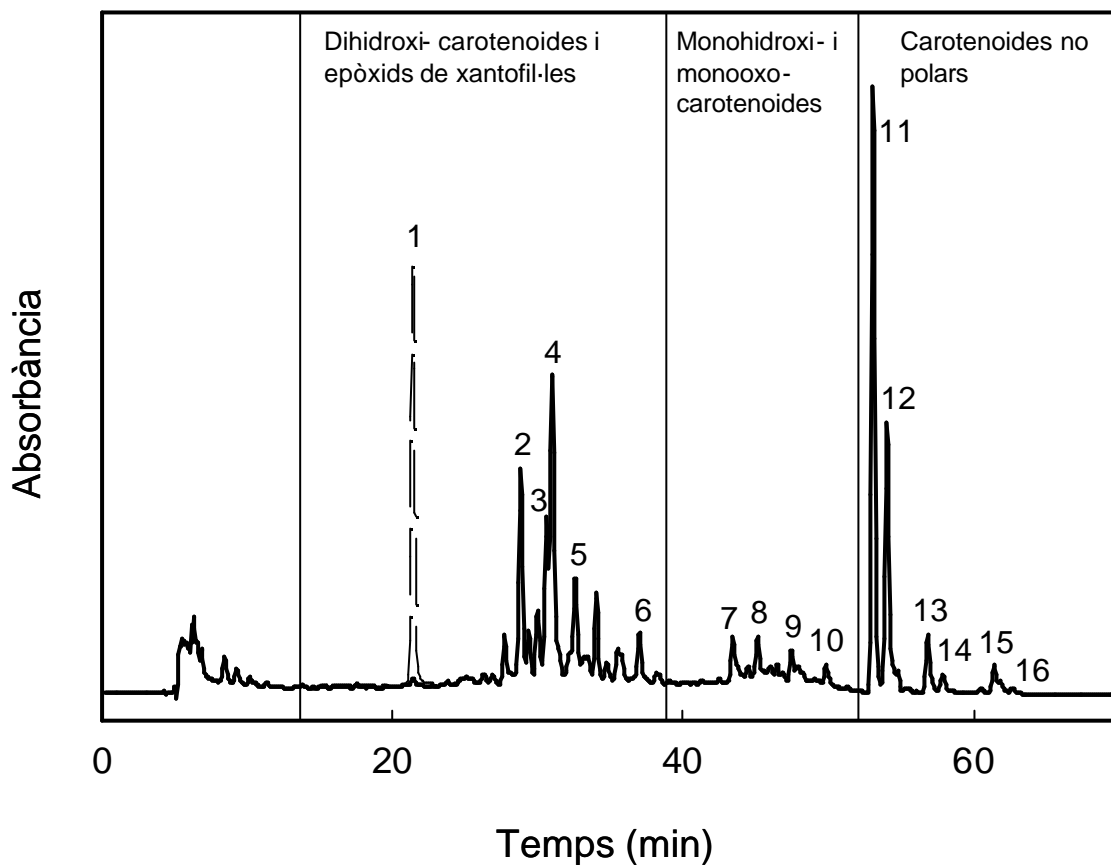


Figura 3.25 Cromatograma enregistrat a 453 nm obtingut a partir de l'extracte de pigments obtingut dels sediments de la bòbila d'Ordis. Identificació: (1) auroxantina (433 nm), (2) anteraxantina, (3) luteïna, (4) zeaxantina, (5) *cis*-zeaxantina, (6) cantaxantina, (7) β -criptoxantina diepòxid, (8) Okn, (9) β -criptoxantina monoepòxid, (10) criptoxantina, (11) all-*trans* Isr, (12) *cis* Isr, (13) all-*trans* β -Isr, (14) *cis* β -Isr, (15) all-*trans* β -Car (16) *cis* β -Car.

Figure 3.25. HPLC trace of the pigments extracted from the ancient sediment collected at the Ordis quarry. Identification: (1) auroxanthin (433 nm), (2) antheraxanthin, (3) lutein, (4) zeaxanthin, (5) *cis*-zeaxanthin, (6) canthaxanthin, (7) diepoxide **b**-cryptoxanthin, (8) Okn, (9) monoepoxide **b**-cryptoxanthin, (10) cryptoxanthin, (11) all-*trans* Isr, (12) *cis* Isr, (13) all-*trans* **b**-Isr, (14) *cis* **b**-Isr, (15) all-*trans* **b**-carotene and (16) *cis* **b**-carotene. Detection was set at 453 nm (solid line).

Taula 3.10. Composició i t_R pels carotenoides identificats. En tots els casos, excepte per l'auroxantina ($\lambda_{m\grave{a}x}=433$ nm), el canal de detecció fou a 453 nm.

Table 3.10. Composition and retention time of the identified carotenoids. For all of them, except for the auroxanthin ($I_{max}=433$ nm), the detection channel was set at 453 nm.

Pigment	t_R (min)	[Car] [*] ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[Car](%)
<i>Dihidroxi-carotenoides i epòxids de xantofil·les</i>	21,4–36,9	3,38	50
auroxantina	21,4	0,01	-
anteraxantina	28,8	0,47	-
luteïna	30,6	0,29	-
zeaxantina	31,0	0,69	-
<i>Monohidroxi- i monooxo-carotenoides</i>	43,4–49,8	0,85	10–11
β -criptoxantina diepòxid	43,4	0,11	-
okenona	45,2	0,12	2
β -criptoxantina monoepòx.	46,5	0,04	-
α -criptoxantina	46,8	0,03	-
β -criptoxantina	47,5	0,07	-
<i>Carotenoides no polars</i>	53,1–62,7	2,45	38
all- <i>trans</i> lsr	53,1	1,36	-
<i>cis</i> lsr	54,1	0,71	-
all- <i>trans</i> β -lsr	56,8	0,17	-
<i>cis</i> β -lsr	57,9	0,05	-
all- <i>trans</i> α -carotè	60,5	0,02	-
all- <i>trans</i> β -carotè	61,4	0,12	-
<i>cis</i> β -carotè	62,7	0,02	-

*El coeficient d'extinció ($\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que fou utilitzat per la determinació de la concentració dels carotenoides detectats va ser 140.000, excepte per l'auroxantina (111.000), per l'Okn (134.100) i per l'Isr i el β -Isr (107.000) (Britton, 1995; Borrego *et al.*, 1999).

El primer grup de carotenoides, més polar, era eluït entre els minuts 21 i 37 i fou el majoritari, representant un 50 % del total (Taula 3.10). En aquest grup s'inclouïen epòxids de xantofil·les, dihidroxi-carotenoides i dioxo-carotenoides, i en principi es van catalogar com a carotenoides d'origen algal, possiblement de Dinofícies (Kingsley, 1989). El primer

pigment d'aquest grup, el més polar de la carrera cromatogràfica, es va identificar com a auroxantina (5,8,5',8'-diepòxid-7,8,7',8'-tetrahidro-beta-carotè-3,3'-diol), amb un t_R de 21,4 minuts i un màxim d'absorció a 433 nm. Aquest carotenoide es caracteritzava per presentar 7 dobles enllaços conjugats, propietats espectroscòpiques que recordaven a un precursor del ζ -carotè i els seus màxims d'absorció eren a 385, 409 i 434 nm, definint una estructura fina caracteritzada per tres pics, el tercer dels quals va ser el dominant (Figura 3.26). L'anteraxantina ($t_R = 28,8$ min), la luteïna ($t_R = 30,6$ min) i la zeaxantina ($t_R = 31,0$ min) també pertanyien a aquest primer grup (Figura 3.26). La resta de pics no es van identificar degut o bé a un solapament crític amb productes de degradació de la BCl_e, a la seva poca abundància (presentes en traces) o a la impossibilitat d'assignar el tipus de conformació *cis* (di-*cis* o poli-*cis*).

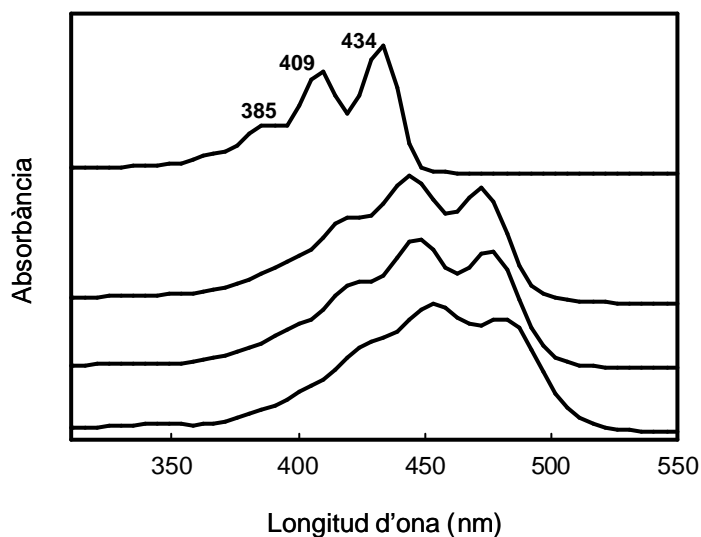


Figura 3.26. Espectres d'absorció, detectats a 453 nm (433 nm pel pic d'auroxantina) dels principals pics (Figura 3.25) identificats en el primer grup de carotenoides. Identificació: (1) auroxantina, (2) anteraxantina, (3) luteïna i (4) zeaxantina.

Figure 3.26. Absorption spectra, recorded at 453 nm (433 nm for auroxanthin) of the main identified peaks in the first group of carotenoids (Figure 3.25). Identification: (1) auroxanthin, (2) anteraxanthin, (3) lutein and (4) zeaxanthin.

El segon grup, presumiblement també d'origen algal, va aparèixer entre els minuts 43 i el 50 i estava format per monohidroxi-carotenoides, monooxo-carotenoides i epòxids de carotens. Representaven entre el 10 i l'11 % del total de carotenoides detectats. Alguns d'ells van ser identificats com a xantofil·les de criptofícies (Kingsley, 1989): criptoxantina

diepòxid ($t_R = 43,4$ min), criptoxantina monoepòxid ($t_R = 46,5$ min), α -criptoxantina ($t_R = 46,8$ min) i β -criptoxantina ($t_R = 47,5$ min). Dins el temps de carrera d'aquest segon grup també es va identificar Okn ($t_R = 45,2$ min), carotenoide típic dels bacteris vermells del sofre, tot i que tan sols representava entre un 1,8 i un 2 % dels carotenoides totals.

Finalment, en el grup més apolar de carotenoides, que representava un 38 % del total, es van agrupar carotenoides tant d'origen bacterià com algal. D'una banda es van poder identificar aril-carotenoides normalment associats a les soques marrons dels GSB: all-*trans* Isr ($t_R = 53,1$ min), *cis* Isr ($t_R = 54,1$ min), all-*trans* β -Isr ($t_R = 56,8$ min), *cis* β -Isr ($t_R = 57,9$ min) (Figura 3.27). Els carotenoides més apolars de la carrera cromatogràfica podien tenir un origen tant bacterià com algal. Aquests carotenoides foren el all-*trans* α -carotè ($t_R = 60,5$ min), all-*trans* β -carotè ($t_R = 61,4$ min) i *cis* β -carotè ($t_R = 63,1$).

Els isòmers *cis* de tots aquests carotenoides foren fàcilment identificats gràcies al pic *cis* que presentaven a la regió ultraviolada (300-350 nm), la intensitat del qual permetia deduir la seva posició central (15-*cis*) (Britton, 1995). D'altres isòmers tipus *cis* varen ser detectats en petites quantitats tot i que no es va poder determinar en quina posició de la molècula es trobava el doble enllaç responsable de la torsió de l'estructura.

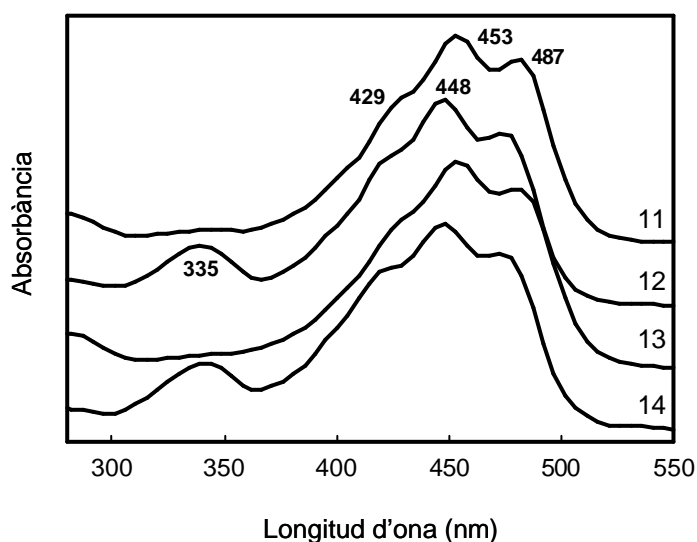


Figura 3.27. Espectres d'absorció dels principals carotenoides trobats als sediments. Els números dels espectres corresponen als pics 11–14 de la Figura 3.25. Identificació: (11) all-*trans* Isr, (12) *cis* Isr, (13) all-*trans* β -Isr i (14) *cis*-Isr.

Figure 3.27. Absorption spectra of the main carotenoids found in the sediments. Spectra numbering correspond to peaks numbers 11–14 in Figure 3.25. Identification: (11) all-*trans* Isr, (12) *cis* Isr, (13) all-*trans* β -Isr i (14) *cis*-Isr.

La BCl *e* i els seus derivats es van detectar a 473 nm (Figura 3.28), excepte les BPheb, el màxim d'absorció de les quals es trobava a 448 nm (Figura 3.29). La identificació d'aquests pics (Taula 3.11), presents en quantitats traça als sediments, va ser possible gràcies a l'obtenció artificial de patrons moleculars (veure Aparat 2.4.5.4 de Material i Mètodes) que van permetre comparar tant els seus espectres d'absorció com els seus t_R . Aquests productes de degradació de la BCl *e* presentaven el mateix espectre d'absorció que el pigment original, ja que l'alcohol esterificat en el carboni 17 no intervé en l'absorció de la molècula. Els t_R , en canvi, i donada la pèrdua de l'esmentat alcohol, eren inferiors als de la BCl *e*. D'altres productes de degradació, possiblement de clorofil·les algal, es trobaven presents al llarg de gairebé tota la carrera cromatogràfica, tot i que la seva identificació va ser impossible degut a la seva presència gairebé residual i al seu solapament crític amb els pics dels carotenoides principals.

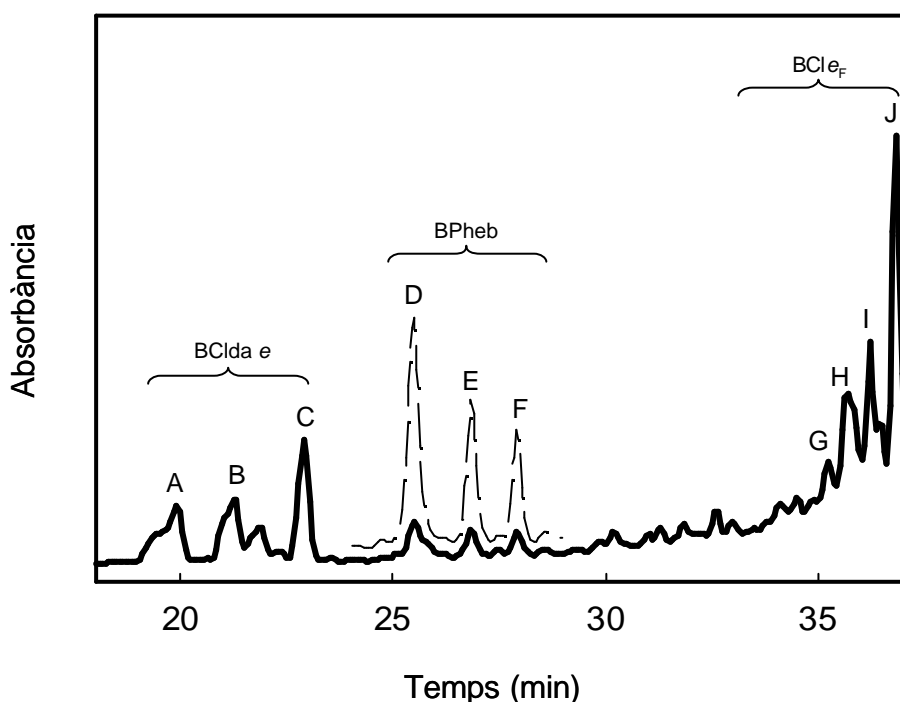


Figura 3.28. Cromatograma corresponent als pics de la BCl *e* (G-J) i els seus derivats presents als sediments. El canal de detecció fou 473 nm (línia contínua), excepte per les BPheb (D-F), amb un màxim d'absorció a 448 nm (línia discontinua).

Figure 3.28. HPLC trace of BChl *e* peaks (G-J) and derivatives detected in the sediment. Detection channel was 473 nm (solid line), except for BPheb (D-F), that was 448 nm (dashed line).

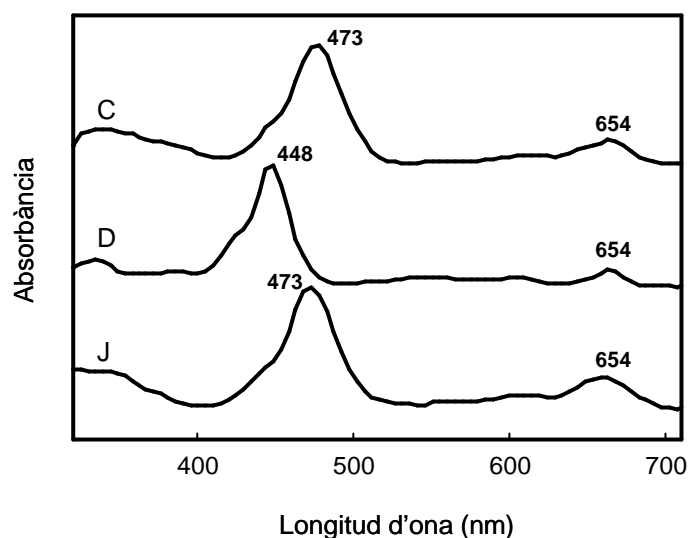


Figura 3.29. Espectres d'absorció dels pics de BCl *e* i dels seus derivats mostrats a la Figura 3.28. Identificació: (C) BClda *e*, (D) BPheb i (J) BCl *e*_F.

Figure 3.29. Absorption spectra of BCl *e* peaks and derivatives shown in Figure 3.28. Identification: (C) BClda *e*, (D) BPheb and (J) BCl *e*_F.

Taula 3.11. Concentració i t_R de la BCl *e* i derivats. El canal de detecció fou 473 nm, excepte per la identificació de les BPheb (448 nm).

Table 3.11. Concentration and t_R of BCl *e* and derivatives. Detection channel was at 473 nm, except for BPheb identification (448 nm).

	t_R (min)	[BCl] [*] ($\mu\text{g g}^{-1}$)
BClda <i>e</i>_H		–
[Pr,E] BClda <i>e</i> _H	19,4	
[I,E] BClda <i>e</i> _H	21,3	
[N,E] BClda <i>e</i> _H	22,0	
BPheb		–
[E,E] BPhe <i>e</i> _H	–	
[Pr,E] BPhe <i>e</i> _H	25,5	
[I,E] BPhe <i>e</i> _H	26,8	
[N,E] BPhe <i>e</i> _H	27,9	
BCl <i>e</i>_F		0,15
[E,E] BCl <i>e</i> _F	35,2	
[Pr,E] BCl <i>e</i> _F	35,7	
[I,E] BCl <i>e</i> _F	36,2	
[N,E] BCl <i>e</i> _F	36,8	

*El coeficient d'extinció molar emprat per la BCl *e* va ser 41.000 (Borrego *et al.*, 1999).

3.3. Discussió

3.3.1. Separació de carotenoides de Bacteris Verds del Sofre per cromatografia líquida d'alta resolució

Fins al moment el mètode d'HPLC de fase reversa que ha permès la caracterització d'un major nombre de carotenoides, la majoria d'origen bacterià, ha estat descrit per Takaichi (2000). Amb aquest mètode s'aconsegueix, en 30 minuts de carrera cromatogràfica, la separació i identificació d'uns 30 carotens. La separació d'aquests pigments es dur a terme utilitzant una columna del tipus C₁₈, un gradient isocràtic i una fase mòbil que és una mescla d'acetonitril, metanol i tetrahidrofurà (58:35:7).

El mètode dissenyat en aquest treball experimental per a extractes pre-purificats (Apartat 2.4.4) permet l'anàlisi dels carotenoides dels GSB en 45 minuts. La resolució obtinguda és comparable i en alguns casos millor a la que s'obté amb mètodes més complets i llargs (Borrego i Garcia-Gil, 1994). A més, el protocol d'extracció i purificació dels carotenoides és notablement més senzill que l'utilitzat per Takaichi, amb el qual són necessàries diferents etapes cromatogràfiques abans de disposar de l'extracte de carotenoides. En el nostre cas només és necessària una etapa prèvia de pre-purificació amb columnes d'alúmina. Aquest tractament facilita la separació i posterior anàlisi qualitativa dels carotenoides, amb la qual cosa s'assoleix una millora notable en la separació dels carotenoides dels GSB, tot eliminant la interferència amb d'altres pigments més polars. Una altra avantatge, paral·lela a l'obtenció d'una bona resolució, rau en la reducció dels t_R en relació als mètodes més llargs utilitzats tradicionalment per l'anàlisi de les BCl's (Borrego i Garcia-Gil, 1994). Per tal de reduir els t_R dels carotenoides es va incrementar l'apolaritat dels solvents, augmentant l'afinitat dels carotenoides per la fase mòbil del sistema. Un exemple concret és el cas de l'OH-Cbt i el grup del Cbt. Aquest dos grups presenten t_R relativament propers i amb el mètode EP (extractes pre-purificats) la separació fou major que l'obtinguda amb el mètode NP (extractes no pre-purificats).

Tot i les avantatges el nou mètode cromatogràfic no permet l'anàlisi quantitativa degut a les pèrdues, en aquells carotenoides de caràcter més polar (OH-Cbt i derivats), causades per la pre-purificació. Malgrat que les condicions en les quals es van obtenir i injectar els diferents extractes foren les mateixes (temperatura ambient, preservació de la llum, mateixes condicions i utilitat cromatogràfic) és possible considerar que aquest procés de pre-purificació pugui alterar l'estructura dels carotenoides sense modificar el seu espectre

d'absorció. De fet, Britton (1995) indica que l'alúmina pot provocar transformacions en la configuració dels carotenoides en segons quines condicions. Aquests petits canvis en l'estructura molecular podrien ser els responsables de l'elevada variabilitat obtinguda pels t_R d'alguns dels carotenoides, sobretot derivats de l'OH-Cbt, Isr i β -Isr, procedents dels extractes pre-purificats (Taula 3.3). Malgrat això, l'elevat nombre d'isòmers tipus *cis* (Taula 3.12) tant pel Cbt com pel β -Isr detectats en totes les soques estudiades difícilment pot considerar-se com un artefacte originat pel tractament amb alúmina ja que aquests isòmers també apareixen en les mostres sense pre-purificar. Els pocs treballs on es fa referència a les formes *cis* en bacteris fotosintètics tenen a veure amb consideracions funcionals, suggerint que aquests isòmers estarien relacionats amb funcions fotoprotectors, trobant-se associats als CR, mentre que els isòmers *trans* portarien a terme funcions, majoritàriament, com a pigments antena (Koyama i Fujii, 1999). No s'ha trobat cap referència bibliogràfica on es destaquï l'elevada proporció de formes *cis* dins l'aparell fotosintètic dels GSB. Per tot això, aquesta abundància pot ser considerada notable des del punt de vista composicional. És per aquest motiu que part del treball de recerca desenvolupat té en compte aquest aspecte, tot incidint també en determinar quins paràmetres ambientals influeixen en la composició dels isòmers dels carotenoides, així com aprofundir en el seu paper funcional dins el procés fotosintètic d'aquests microorganismes (veure Capítol 4).

Pel que fa a l'aplicació del mètode NP (extractes no pre-purificats) destaca la bona resolució obtinguda pels carotenoides i la possibilitat d'analitzar de forma precisa les BCIs. L'altra gran avantatge d'aquest mètode és la poca variació obtinguda en els t_R dels pics identificats, fet que facilita la posterior identificació dels pigments.

Taula 3.12. Abundància relativa (en %) dels principals carotenoides de les espècies de GSB estudiades.

Table 3.12. Relative abundance (in %) of the main carotenoids of the Green Sulfur Bacteria species analyzed.

Espècie	Carotenoide	%
<i>Chl. limicola</i> UdG6038	<i>all-trans</i> Cbt	46,5
	<i>cis</i> Cbt	28,6
	15- <i>cis</i> Cbt	24,9
<i>Chl. vibrioforme</i> f. <i>thiosulp.</i> NCBI8327	<i>all-trans</i> Cbt	49,7
	<i>cis</i> Cbt	34,9
	15- <i>cis</i> Cbt	15,4
<i>Chl. tepidum</i> ATCC49652	<i>all-trans</i> Cbt	41,5
	<i>cis</i> Cbt	37,2
	15- <i>cis</i> Cbt	21,3
<i>Pld. clathratiforme</i> UdG7504	<i>all-trans</i> Cbt	56,2
	<i>cis</i> Cbt	33,7
	15- <i>cis</i> Cbt	10,1
<i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401	<i>all-trans</i> lsr	50,4
	<i>cis</i> -lsr	20,0
	<i>all-trans</i> β -lsr	21,5
	<i>cis</i> β -lsr	8,10

Les diferències de resolució entre ambdós mètodes (EP i NP) són atribuïdes tant a la diferència en els solvents emprats com al procés previ al qual són sotmeses les mostres abans de ser injectades. La pre-purificació a través de columnes d'alúmina, que permet l'eliminació de les BCIs, afecta també la resta de pigments de la mostra. Segons els resultats per a les espècies de GSB estudiades, aquest procés d'aïllament permet obtenir uns pics més ben definits per a alguns dels carotenoides (el Nrp n'és un bon exemple) que no els obtinguts per a les mateixes mostres sense pre-purificar. El mètode NP, en canvi, ha estat aplicat quan es necessitava informació detallada de la composició i distribució d'homòlegs de les BCIs o quan la complexitat de les mostres ho ha requerit. Les mostres

complexes, ja siguin extractes de cultius o sediments, requereixen d'un mètode d'anàlisi suficientment complet com per assegurar l'elució i identificació de tots els pigments de la mostra, tenint en compte les seves diferències de polaritat. La injecció de mostres sense pre-purificar amb el mètode EP implica per una banda el solapament entre els diferents carotenoides i per l'altra una elució conjunta de totes les BCIs amb el front del solvent. A més, tenint en compte que la resolució que s'obté amb el mètode NP és molt elevada, podem concloure que la utilització d'aquest últim assegura uns resultats òptims en tot tipus de pigments fotosintètics, eucariotes i procariotes, i per tant, pot ser aplicat a una gran varietat d'extractes pigmentaris.

Considerant la resolució obtinguda en tots els extractes pigmentaris de les soques analitzades és possible contemplar la possibilitat d'aplicar els nous mètodes cromatogràfics en futurs experiments de fisiologia i ecologia microbiana. D'aquesta manera, i gràcies a l'exhaustiva anàlisi tant qualitativa com quantitativa que se n'obté poden estudiar-se les variacions en la composició pigmentària, especialment pel que fa als carotenoides, de poblacions naturals i cultius de laboratori sotmesos a diferents condicions de creixement (veure Capítol 4). A més, aquests estudis sobre els canvis en les proporcions dels carotenoides poden dur-se a terme no tan sols amb els carotenoides majoritaris (Cbt en espècies verdes i Isr i β -Isr en les espècies marrons) sinó també amb aquells carotenoides minoritaris (Nrp en les espècies verdes i β -Car en les marrons) que difícilment poden ser detectats amb els mètodes cromatogràfics tradicionals.

Finalment es pot concloure que els mètodes dissenyats en aquest treball de recerca poden ser considerats el punt de partida d'experiments, ja siguin bioquímics, fisiològics o ecològics, que tinguin com a objectiu aprofundir en el coneixement funcional dels carotenoides dels GSB, tal i com es mostra al Capítol 4.

3.3.2. Efecte de la llum i diferents agents químics sobre les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides de les espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre

Treballs previs realitzats amb bacteris fotosintètics descriuen funcions diferents pels carotenoides segons la seva configuració. Els isòmers tipus *trans* durien a terme funcions com a pigments antena, mentre que els isòmers tipus *cis* estarien involucrats en processos de fotoprotecció (Koyama i Fujii, 1999). Un exemple concret és el cas de *Chlorobium*

tepidum, dins el grup d'espècies verdes de GSB, pel qual s'ha identificat 15-*cis* β -Car als seus CR (Grazyna *et al.*, 1998).

3.3.2.1 Fotosensibilitat

Els resultats del present capítol de la memòria (Apartat 3.2.3) corroborarien el fet que el contingut d'isòmers, per cadascun dels carotenoides presents a les cèl·lules, és constitutiu d'aquestes i que per tant no són artefactes creats durant l'extracció dels pigments. Aquesta afirmació és basada en el fet que les concentracions de carotenoides *in vitro* es mantenen constants al llarg del temps fins i tot en extractes sotmesos a condicions d'il·luminació. D'altra banda, les relacions molars entre isòmers amb configuració *trans* i els isòmers amb configuració *cis* pel mateix carotenoide, són també constants al llarg del temps, tot i que lleugerament inferiors quan els extractes es mantenen sota il·luminació. En aquest cas, la disminució d'isòmers *trans* podria ser deguda a una reacció espontània afavorida per l'augment de temperatura ocasionada per la constant il·luminació de la mostra ($80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de manera similar al què ha estat descrit *in vitro* pel β -Car (Koyama i Fujii, 1999). Assajos amb aquest carotenoide han demostrat que l'augment de temperatura afavoreix les reaccions d'isomerització de les configuracions *trans* cap a les formes isomèriques *cis*. A partir d'aquests resultats podem assumir que canvis potencials en les concentracions i/o proporcions entre els isòmers d'un determinat carotenoide al llarg del creixement bacterià són deguts a canvis fisiològics del microorganisme i conseqüència, per tant, de la resposta de la cèl·lula davant els canvis en les condicions de creixement (veure Capítol 4).

Paral·lelament, els experiments realitzats sota il·luminació han permès evidenciar la diferent sensibilitat a la llum entre les BCl i els carotenoides. Després de mantenir els extractes 12 h a una intensitat lumínica de $80 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, les pèrdues de carotenoides foren del 30 %. En canvi les pèrdues de BCl foren del 100 % després de 4 h d'exposició lumínica.

Tot i que en el present experiment no s'assajaren diferents solvents d'extracció ni diferents temperatures i es va utilitzar el mateix tipus de font lumínica, sense canvis qualitats ni quantitats de la mateixa, s'ha de tenir present que la fotodegradació dels pigments, tot i que també depèn de l'estructura d'aquests, varia depenent de les condicions a les quals es troben sotmesos. Els factors que poden provocar canvis en la sensibilitat dels pigments

davant la intensitat lumínica són: la longitud d'ona a la qual es troba sotmés l'extracte, el tipus de solvent en el qual s'han dissolt els pigments, la presència d'oxigen i la temperatura, tot i que aquesta última sembla tenir menys efecte respecte els anteriors paràmetres (Mortensen i Skibsted, 1999).

En el cas que ens ocupa, el sovent d'extracció va ser una mescla d'acetona: metanol (7:2, vol:vol), solvent en el qual les molècules de BCl *e* es mantenen en estat monomèric. Sota aquestes condicions, l'oxigen molecular present al medi ($^1\text{O}_2$, en estat *singlet*) és capaç de reaccionar amb les molècules de BCl *e* monomèriques ($^3\text{BCl}^*$, en estat *triplet*), provocant la seva degradació. L'estat *triplet* dels carotenoides ($^3\text{Car}^*$), en canvi, i degut a què presenten un nivell energètic inferior al de l'oxigen molecular, no reacciona tan espontàniament amb l'oxigen *singlet* com les molècules de BCl *e*, motiu pel qual els carotenoides no són fotodegradats amb tanta facilitat com les molècules de BCl *e* monomèriques. Treballs previs realitzats amb la mateixa soca marró emprada en aquests experiments (*Chl. phaeobacteroides* CL1401) descriuen l'efecte de l'oxigen sobre la BCl *e*, en estat monomèric, així com el seu comportament davant l'oxigen, en estat agregat. Els autors d'aquest treball confirmen que els estat excitats de les molècules de BCl *e* monomèrica són més susceptibles que les molècules de BCl *e* en estat agregat a reaccionar amb l'oxigen *singlet*. Per tant els agregats de BCl *e* que trobem *in vivo* o bé en extractes aquosos *in vitro* són capaços d'autoprotegir-se davant la presència d'oxigen (Arellano *et al.*, 2002).

3.3.2.2. Sensibilitat a agents oxidants i reductors

Tant la concentració de pigments com les proporcions *trans/cis* dels carotenoides, no es van veure afectades per l'addició de diferents agents químics oxidants (dimetilsulfòxid i peròxid d'hidrogen) o reductors (àcid ascòrbic) (Apartat 3.2.3). Menció a part mereix l'efecte del ditionit sòdic, ja que l'addició d'aquest agent reductor va ocasionar pèrdues de quasi el 90 %, tant de BCls com de carotenoides. Aquesta disminució en la concentració de pigments, i també en les relacions *trans/cis* dels carotenoides, respon, d'una banda, a la reducció dels enllaços π de l'anell tetrapirròlic de les BCls i, d'altra banda, a la reducció dels dobles enllaços del sistema conjugat dels carotenoides per part del ditionit sòdic (Arellano, comunicació personal). Augmentant el temps d'incubació amb ditionit sòdic es va aconseguir una eliminació completa de les BCls. De fet, amb tan sols 5

min d'incubació amb aquest agent, la reducció del contingut de BCIs fou gairebé completa. Això és degut probablement a l'elevat potencial redox que presenta el ditionit sòdic (-527 mV) en relació al de l'àcid ascòrbic (58 mV) (Fasman, 1976). Els carotenoides, en canvi, tot i augmentar el temps d'incubació i la concentració del ditionit sòdic no es van veure afectats. Aquest fet indica clarament que les característiques estructurals de les BCIs i els carotenoides poden ser les responsables de la diferent sensibilitat davant l'efecte del ditionit sòdic.

Tenint en compte que la degradació dels carotenoides per part del ditionit sòdic no va generar senyal en un rang d'absorbància de 270 a 850 nm es pot suggerir que l'efecte del ditionit sòdic en els carotenoides seria el d'ocasionar el trencament de la molècula, o bé provocar la reducció del sistema de dobles enllaços conjugats que constitueixen el cromòfor. Una possible reducció d'aquests dobles enllaços seria la saturació de la molècula a partir de la incorporació de grups hidroxil (OH). En ambdós casos no es formarien estructures capaces d'absorbir a les regions de l'espectre indicades ja que el propi cromòfor és el que es veu afectat pel tractament.

A partir d'aquests resultats s'assumeix que el processament de les mostres durant l'extracció dels pigments no té un efecte significatiu sobre la composició, tant qualitativa com quantitativa, dels isòmers *trans* i *cis* dels diferents carotenoides ni tampoc de les BCIs, sempre i quan les manipulacions es portin a terme en foscor i a temperatura ambient com així ha estat al llarg de tot el treball. Així doncs, els possibles canvis que es detectin en la composició de pigments són conseqüència de la resposta de les cèl·lules davant canvis en les condicions de creixement (veure capítol següent). Els esmentats canvis consistirien en la desestabilització del cromòfor i, per tant, en la consegüent pèrdua de la capacitat d'absorbir la llum.

3.3.3. Anàlisi de pigments fòssils en sediments

L'anàlisi de pigments realitzat a partir de mostres de sediments antics aporta nova informació sobre l'existència d'un antic sistema lacustre, àmpliament estudiat a partir de la terrassa d'Usall-Espolla descrita per Sabarís (1957, 1958), situat a l'àrea mostrejada de Banyoles.

El material sedimentari de la bòbila Ordis correspon a dipòsits argilosos, ubicats sota les formacions calcàries del Pla d'Usall, que es troben en contacte amb micrites negres del Waalià com a conseqüència de processos tectònics (Leroy, 1988). Les troballes de fauna lacustre de l'esmentada terrassa no han estat les úniques. Restes d'*Hippopotamus amphibius major*, al novembre de 1968, han permès datar amb més precisió els materials geològics d'Usall-Espolla. Els pigments detectats poden associar-se, doncs, a poblacions microbianes fotosintètiques existents al sistema lacustre objecte d'estudi durant el període Waalià del Pleistocè inferior, fa aproximadament 1 milió d'anys. Aquest sistema lacustre estaria més relacionat amb un episodi pantanós local més que no pas a un fenomen lacustre a gran escala com seria el que va originar l'estany de Banyoles (Bech, 1970). Aquest fet implica que les condicions ambientals que han permès la conservació d'aquests pigments al llarg de milers d'anys han estat suficientment estables com per permetre l'acumulació i protecció dels pigments, tant algals com bacterians, sense una alteració detectable de les seves característiques espectrals.

Tot i assumir una elevada estabilitat físico-química dels sediments, no tots els pigments fotosintètics poden conservar-se inalterats al llarg de grans períodes de temps.

D'acord amb els resultats i amb anteriors treballs (Züllig, 1989 i referències incloses) es pot confirmar el caràcter recalcitrant que presenten molts carotenoides, en comparació a la inestabilitat estructural de les BCl davant les agressions externes que poden afectar el material sedimentat (pH, temperatura, pressió).

En el nostre treball es van detectar petites quantitats de BCl *e* i productes de degradació de la mateixa, però va ser impossible la identificació de derivats de clorofil·les algals. Les xantofil·les algals, en canvi, van ser els pigments majoritaris de les mostres analitzades i dels tres grups de carotenoides caracteritzats els dos primers corresponen a carotenoides d'origen algal. El grup majoritari ha estat associat, segons els pics identificats, a Dianofícies (Kingsley, 1989). Es tracta de dihidroxi-carotenoides i epòxids de xantofil·les altament polars, motiu pel qual s'elueixen a l'inici de la carrera cromatogràfica. L'altre grup de carotenoides algals (monohidroxi- i monooxo-carotenoides) ha estat associat a Criptofícies (Kingsley, 1989). Pel que fa a pigments de bacteris fototròfics, han estat identificats, en base al seu espectre d'absorció i t_R , pics corresponents a carotenoides d'espècies marrons de GSB.

En base a aquestes identificacions es pot assumir que la presència de fitoplàncton i poblacions de GSB, concretament d'espècies marrons, es remunta als orígens del sistema lacustre de la zona de Banyoles. Això permet suggerir que els paràmetres físico-químics de la cubeta ancestral fossin comparables als de les cubetes III i IV de l'estany de Banyoles segons les referències existents (Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992; Borrego *et al.*, 1993), i a més es mantinguessin força constants al llarg de milers d'anys. Bech (1970) va descriure el clima d'aquesta zona com a humit, temperat i constant, condicions favorables pel manteniment del bosc caducifoli existent durant el Waalià a la zona de la bòbila Ordis (Leroy, 1986). La cubeta original hauria d'haver estat, per tant, de caràcter meromíctic, amb una profunditat permanent de la quimioclina, ratllant els nivells fòtics, per tal de permetre l'existència de poblacions de GSB (espècies marrons segons les troballes descrites en el present treball) ben establertes i amb presència de compostos reduïts del sofre, originats a partir de compostos de descomposició microbiana en el sediment. Per sobre la quimioclina, i en condicions aeròbiques, s'establirien presumiblement les comunitats algals tal i com es dona en l'actualitat. D'altra banda, la detecció de traces d'Okn permet suggerir també la presència de Bacteris Vermells. Assumint un grau de conservació equivalent d'aquest carotenoide en relació als carotenoides dels GSB, es podria estimar que la quimioclina en aquesta cubeta ancestral es va localitzar per sota els 14 metres, límit a partir del qual l'activitat fototròfica a les cubetes III i IV de l'estany de Banyoles es limita a les espècies marrons de GSB, millor adaptades a les baixes intensitats de llum (Borrego *et al.*, 1993). La manca de carotenoides d'espècies verdes de GSB podria estar relacionada amb l'absència d'aquestes espècies en la cubeta ancestral, més que no pas amb una completa degradació d'aquest carotenoide. Dos observacions permeten reforçar aquesta hipòtesi, per una banda la similitud estructural entre l'Isr i el Cbt no permet suggerir diferències importants en quant a una major resistència d'aquest darrer a la degradació, i per l'altra, fins ara mai s'han detectat espècies verdes constituint poblacions estables a les cubetes de l'estany (Garcia-Gil, 1990; Borrego, 1992; Borrego *et al.*, 1993).

Tenint en compte l'antiguitat dels pigments fotosintètics estudiats, capaços de preservar-se durant aproximadament 1 milió d'anys, és possible afirmar que la presència de poblacions d'espècies marrons de GSB es remunta als orígens del sistema lacustre primitiu, quelcom extensible a l'estany de Banyoles, assumint les semblances existents entre algunes de les cubetes (III i IV), situades a la part nord de l'estany (Borrego *et al.*, 1993), i la cubeta ancestral estudiada (situada a la zona de l'actual bòbila). Segons els resultats del present

estudi, per tant, seria factible assumir que les espècies marrons dels GSB existissin, a la zona lacustre de Banyoles, al menys des del Pleistocè inferior, fa aproximadament 1 milió d'anys. Per tal de confirmar l'origen dels pigments identificats com a Isr i β -Isr es proposa analitzar el contingut de l'isòtop ^{13}C dels mateixos. Un enriquiment en aquest isòtop confirmaria la via de fixació de CO_2 , és a dir, el cicle reductiu de l'àcid tricarbòxilic, emprada pels GSB (Sirevag *et al.*, 1977) i per tant el seu origen bacterià. Degut a l'elevada estabilitat dels pigments fotosintètics, s'entén doncs que aquests pigments s'utilitzin rutinàriament com a marcadors biològics, en aquest cas com a indicadors d'episodis d'anòxia fòtica (Summons i Powell, 1986; Sinninghe Damsté, 1993).

D'altres vies per a confirmar la procedència dels carotenoides estarien encaminades a l'anàlisi d'àcids nucleics dels sediments. L'extracció d'ADN i posterior amplificació mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa permetria determinar el tipus de poblacions fotosintètiques existents a la cubeta ancestral, assumint, d'una banda, la dificultat d'extreure DNA a partir de mostres de sediments i, d'altra banda, les majors taxes de degradació dels àcids nucleics respecte molècules amb esquelet hidrocarbonat (Coolen i Overmann, 1998). Tenint en compte aquest precedent es va procedir a l'extracció de l'ADN, en col·laboració amb el grup del Dr. Overmann (Universitat de Múnic, Alemanya). Malgrat els esforços realitzats en aquest sentit no es va aconseguir recuperar ADN dels sediments. Això podria ser conseqüència o bé d'una extracció ineficaç o també a una major degradació de l'ADN respecte els carotenoides. Coolen i Overmann (1998) també van observar que la relació ADN/Okenona de sediments fòssils de 11.000 anys d'antiguitat, procedents del llac Mahoney (British Columbia, Canadà) fou de $2,7 \times 10^{-6}$, mentre que aquesta mateixa relació prenia el valor d'1,4 en cèl·lules intactes, evidenciant que la taxa de degradació de l'ADN en sediments antics, com els que ens ocupen, és molt més elevada que la corresponent als carotenoides bacterians.

4. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica

4. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica

4.1. Introducció

L'objectiu global d'aquesta part del treball va ser conèixer els mecanismes d'adaptació, de diferents espècies de Bacteris Verds del Sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*) davant els canvis en les condicions d'il·luminació. Per assolir aquest objectiu global l'estudi es va centrar, bàsicament, en dos aspectes. D'una banda, els experiments es realitzaren per confirmar les funcions dels carotenoides a l'aparell fotosintètic dels GSB, tenint en compte els últims treballs publicats amb espècies marrons d'aquest grup bacterià, i d'altra banda s'analitzà l'adaptació de l'aparell fotosintètic, a baixes intensitats de llum, a partir de les variacions del nombre de centres de reacció (CR) presents per clorosoma.

4.1.1. Funcions dels carotenoides a l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre

Els carotenoides, tal i com s'ha introduït al capítol anterior, són pigments àmpliament distribuïts a la natura. Malgrat la seva elevada ubiqüitat, en termes generals es pot considerar que tots els carotenoides presents als organismes fotosintètics, ja siguin plantes superiors o microorganismes, comparteixen funcions bàsiques pel bon funcionament de la fotosíntesi (Liaaen-Jensen i Andrewes, 1972). D'una banda, es tracta de pigments que poden actuar com a antena accessòria i dur a terme funcions de fotoprotecció de l'aparell fotosintètic, i d'altra banda són pigments capaços de realitzar funcions de caràcter estructural. No obstant això, i malgrat que els bacteris objecte d'estudi, és a dir, els GSB, han estat àmpliament caracteritzats a nivell bioquímic, fisiològic i ecològic, els estudis centrats en les funcions dels carotenoides en aquest grup bacterià, proporcionant informació sobre la seva localització i funció dins els clorosomes és, a diferència del què succeeix amb els bacteris fotosintètics vermells, molt escàs.

D'una banda, la funció com a pigments antena dels carotenoides, es va descobrir amb els treballs realitzats amb diatomees, concretament del gènere *Nitzshia* (Dutton *et al.*, 1943). A partir d'aquests treballs es va poder establir, doncs, l'existència de transferència d'energia entre la fucoxantina i la clorofil·la (Cl) *a*, ja que l'excitació de l'esmentat carotenoide deixava pas a l'emissió de fluorescència per part de la Cl *a*. D'altra banda, la fotoprotecció,

per part dels carotenoides, de CR, de complexos pigment-proteïna, i fins i tot de cèl·lules i teixits (Krinsky, 1968; 1979), és gràcies a les seves propietats antioxidants. Els carotenoides són capaços de promoure la protecció dels components de l'aparell fotosintètic, davant la presència d'excessos lumínics i/o oxigen, el qual inhibeix la síntesi de bacterioclorigil·les (BCls) en el cas dels bacteris fotosintètics anoxigènics, mitjançant dos mecanismes. El primer consisteix en extingir la fluorescència directament dels estats excitats de les molècules de BCl (en estat *triplet*, $^3\text{BCl}^*$), provocats com a conseqüència d'altres intensitats lumíniques, evitant la reacció d'aquestes amb l'oxigen molecular ($^1\text{O}_2$). En cas que tingués lloc l'esmentada reacció entre les BCl's excites en estat *tripet* i l'oxigen molecular, el producte resultant, és a dir, l' O_2 *singlet*, posaria en perill la viabilitat de les cèl·lules degut al seu caràcter oxidant. El segon mecanisme, consistent en extingir directament l'excitació de l'oxigen *singlet*, no és el que predomina *in vivo* (Foote *et al.*, 1970).

Els estudis duts a terme en relació a la localització i funció dels carotenoides als GSB han avançat molt en els darrers anys. En aquest camp destaquen els experiments realitzats amb una soca marró de GSB, concretament *Chl. phaeobacteroides* CL1401, mitjançant els quals s'han descobert aspectes molt interessants dels carotenoides en el grup bacterià objecte d'estudi (Arellano *et al.*, 2000a; 2000b; 2001 i 2002).

En primer lloc, per tal de conèixer les implicacions funcionals d'aquests pigments, el contingut dels quals és com a mínim 2 vegades superior a les espècies marrons respecte les espècies verdes de GSB (present treball) es dugueren a terme experiments per inhibir selectivament la síntesi de carotenoides. Aquests estudis foren realitzats d'acord a treballs previs amb l'espècie *Chloroflexus aurantiacus* (Foidl *et al.*, 1994). La concentració d'hidroxibifenil (HBF), l'agent inhibidor incorporat al medi de cultiu, emprada en el cas de la soca marró va ser 3 vegades inferior respecte l'assajada en l'espècie filamentosa. En el cas de *Chl. paheobacteroides* CL1401, una concentració d'HBF de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ va ocasionar unes pèrdues de carotenoides superiors al 95 % sense efectes aparents sobre el creixement fotosintètic, el qual es veia afectat emprant concentracions d'HBF superiors a l'esmentada. D'una banda, a partir dels experiments duts a terme amb els clorosomes dels cultius inhibits es va poder determinar que els carotenoides afecten a l'organització estructural dels elements cilíndrics, presentant, per tant, una clara funció de caràcter estructural. Concretament tenen efecte sobre la direcció de l'angle entre l'eix de transició dels

monòmers de BCl *e* i l'eix de l'element cilíndric. D'altra banda, tenint en compte que com a conseqüència de la inhibició disminueix la grandària de la làmina basal, el contingut de BCl *a* i de proteïna CsmA d'aquesta també va disminuir, concretament en un 30–40 %, pel que fa a la BCl *a* (Arellano *et al.*, 2000a) i en un 60 % pel que fa al contingut de CsmA (Arellano *et al.*, 2001). D'altra banda, la funció fotoprotectora dels carotenoides va poder ser demostrada amb els experiments realitzats amb agregats artificials de BCl *e* (Arellano *et al.*, 2000b). Aquests estudis demostraren que els carotenoides són prescindibles per a la fotoprotecció de la BCl *e* en estat agregat, menys vulnerable que la BCl *a* als excessos lumínics degut al seu nivell energètic, inferior al de l'¹O₂, però són totalment necessaris per a la protecció de la BCl *a* de la làmina basal. Aquest fet implica que els carotenoides es troben molt propers a la làmina basal del clorosoma. L'esmentada proximitat entre els carotenoides i la BCl *a* de la làmina basal és, doncs, un fet que reforça el paper estructural assignat als carotenoides d'aquestes espècies, tenint en compte les pèrdues de BCl *a* i CsmA ocasionades com a conseqüència de la inhibició de la síntesi de carotenoides.

En segon lloc, a partir de treballs duts a terme amb *Chl. tepidum* s'evidencia l'existència d'estructures multimèriques entre la BCl *a* i les proteïnes CsmA de la làmina basal (Bryant *et al.*, 2002). En aquest estudi els clorosomes foren sotmesos a diferents tractaments amb detergents i/o solvents orgànics. Els tractaments que eliminaren totes les proteïnes de l'envolta dels clorosomes, amb l'excepció de la proteïna CsmA de la làmina basal, tampoc van permetre l'eliminació de la BCl *a* de la làmina basal, la qual només era extreta amb el tractament de SDS i 1-hexanol que també provocava les pèrdues de proteïna CsmA. Aquests estudis, per tant, confirmen la unió dels components de la làmina basal, entre els quals també cal incloure els carotenoides, els quals només foren extrets amb el mateix tractament que elimina la BCl *a* i les proteïnes CsmA.

Mitjançant aquest estudi amb *Chl. tepidum* i els treballs anteriorment esmentats amb *Chl. phaeobacteroides* es pot assumir, doncs, que els carotenoides dels GSB són capaços de dur a terme d'una banda, funcions a nivell estructural i, d'altra banda, funcions de fotoprotecció de la BCl *a* de la làmina basal.

4.1.2. Estequiometries de l'aparell fotosintètic dels Bacteris Verds del Sofre.

Els clorosomes són les vesícules que constitueixen els complexos antena dels GSB. Aquest tipus d'aparell fotosintètic, específic d'aquest grup bacterià, es caracteritza per contenir empaquetats de manera específica els pigments fotosintètics. El seu contingut ha estat prèviament detallat a la introducció general de la tesi (veure Apartat 1.2).

Una bona manera de conèixer com s'adapta l'aparell fotosintètic dels GSB a canvis en les condicions de creixement, com podrien ser variacions en la intensitat lumínica, és realitzant estequiometries, entre els diferents components de l'aparell fotosintètic, per analitzar possibles modificacions d'aquestes en funció de les condicions assajades.

En aquest treball, concretament, s'ha utilitzat el valor d'entre 100.000–250.000 molècules de BCl antena per clorosoma, estimat a partir del treball realitzat amb diferents espècies de GSB sobre la topografia i la biometria dels clorosomes en aquest grup bacterià (Martínez-Planells *et al.*, 2002). Aquest valor es va calcular d'una banda, d'acord als últims models d'organització dels monòmers de BCl als elements cilíndrics (Prokorenko *et al.*, 2000; Steensgaard *et al.*, 2000), pels quals la distància entre àtoms de Mg adjacents és de 6,7 Å, i d'altra banda, tenint en compte les mesures de volum dels clorosomes obtingudes mitjançant microscopia de força atòmica (AFM). Els valors obtinguts s'allunyen dels prèviament determinats en treballs anteriors (Blankenship *et al.*, 1995; Olson, 1998), situats a l'entorn de les 2.000 molècules antena per clorosoma.

Pel que fa a la BCl *a* es va assumir, d'acord als treballs previs realitzats amb *Chl. limicola* (Gerola i Olson, 1986) i amb *Chl. phaeovibroides* i *Chl. vibrioforme* (van Noort *et al.*, 1994), que aquesta representa un 3 % de la BCl antena. D'aquest 3 %, un 1 % correspondria a la BCl *a* de la làmina basal i el 2 % restant serien les molècules de BCl *a* associades als CR i a les proteïnes FMO. El nombre de molècules de BCl *a* unides al nucli del CR és 16, mentre que el nombre de molècules de Cl *a*, que actuen com a acceptor primari, és de 4, d'acord a Hauska *et al.*, 2001. En els GSB aquesta Cl *a* es troba esterificada amb $\Delta^2,6$ -fitadienol i ha estat anomenada BC_{k63} (Kobayashi *et al.*, 2000). Estudis previs confirmen que aquesta BC_{k63} ha estat detectada en cèl·lules i preparacions de membranes de diferents espècies de GSB com *Prosthecochloris aestuarii*, *Chl. limicola*, *Chl. limicola* f. *thiosulfatophilum*, *Chl. vibrioforme* i *Chl. phaeovibroides* (Kobayashi *et al.*, 1992; Van de Meent *et al.*, 1992).

En relació als carotenoides, el nombre de molècules d'aquests pigments associades al nucli dels CR dels GSB és de 2 (Hauska *et al.*, 2001).

A la Figura 4.1 s'esquematisa un clorosoma en el qual s'assenyalen, d'una banda, els principals components de l'aparell fotosintètic i, d'altra banda, es recullen algunes de les estequiometries prèviament comentades.

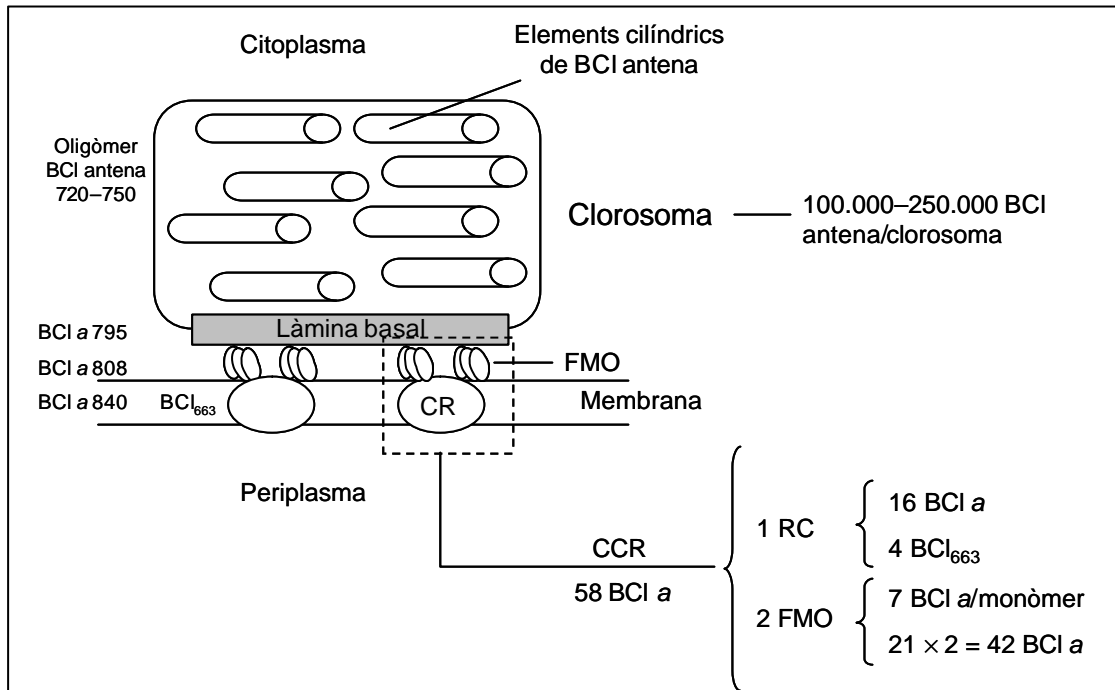


Figura 4.1. Esquema de l'aparell fotosintètic dels GSB (modificat de Hauska *et al.*, 2001).

Figure 4.1. Schema of the photosynthetic apparatus of Green Sulfur Bacteria (after Hauska *et al.*, 2001).

Finalment, pel que fa al nombre de CR presents per clorosoma no hi ha fins al moment cap publicació que en faci referència. En aquest capítol de la tesi, a partir de l'estimació del nombre de CR i tenint en compte diferents consideracions, exposades a la discussió del present capítol (Apartat 4.3.1.3), es va poder estimar el nombre de CR/clorosoma, les variacions del qual poden ser interpretades per entendre els mecanismes d'adaptació, dels GSB, als canvis en la intensitat lumínica.

4.2. Resultats

4.2.1. Estudis de fisiologia i adaptació lumínica en Bacteris Verds del Sofre

En aquest primer apartat es recullen una sèrie d'investigacions sobre les adaptacions de l'aparell fotosintètic dels GSB a condicions limitants de llum ($1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les soques que es van estudiar foren dues de marrons: *Chl. phaeobacteroides* CL1401 i *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 i dues de verdes: *Chl. limicola* UdG6038 i *Prosthecochloris aestuarii* CE2404. L'experimental s'ha centrat en esbrinar el paper que fan els carotenoides en l'esmentat procés d'adaptació, un aspecte especialment interessant a les espècies marrons, degut a l'elevat contingut que presenten d'aquests pigments respecte les espècies verdes.

D'altra banda, el segon objectiu d'aquesta part de la tesi fou calcular el nombre de CR, a partir de la quantificació de BCl_{663} , per tal d'analitzar les variacions d'aquest nombre en funció de les condicions lumíniques (Secció 4.2.1.2). Més endavant (Apartat 4.3.1.3) es discuteix com poder estimar, a partir de diferents aproximacions, el nombre de CR presents per clorosoma.

4.2.1.1. Variacions en la composició pigmentaria de diferents soques de Bacteris Verds del Sofre durant el creixement a diferents intensitats de llum

Es van assajar dues condicions lumíniques, d'una banda $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, intensitat de llum saturant, i de l'altra, $1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, baixa intensitat lumínica.

Creixement

La Figura 4.2 mostra les corbes de creixement de les espècies estudiades a les dues intensitats assajades, així com els paràmetres de creixement calculats per cada cas. Com era d'esperar la taxa de creixement (μ) fou en tots els casos més elevada quan les cèl·lules creixien a intensitat de llum alta. El temps de generació (t_g), en canvi, inversament proporcional al paràmetre anterior, va ser per tant més elevat sota condicions de baixa intensitat lumínica.

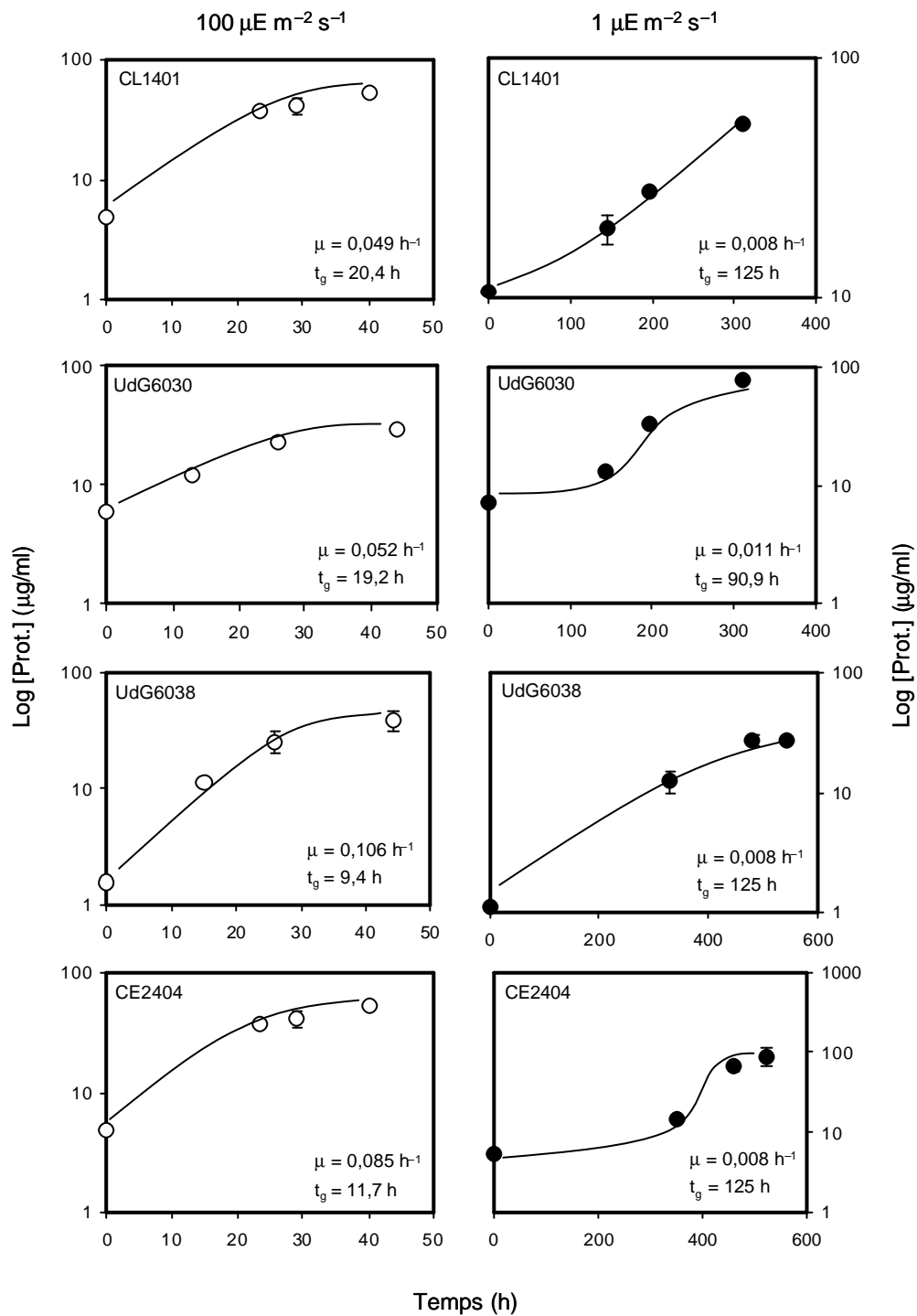


Figura 4.2. Creixement dels cultius de les quatre soques estudiades (*Chl. phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* UdG6030, *Chl. limicola* UdG6038 i *Prosthecochloris aestuarii* CE2404) a les dues intensitats lumíniques assajades. A cada gràfic s'inclou la taxa de creixement (μ) i el temps de generació (t_g) calculat en cada cas.

Figure 4.2. Growth kinetics of the four studied strains (*Chl. phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* UdG6030, *Chl. limicola* UdG6038 and *Prosthecochloris aestuarii* CE2404) at the two light intensities tested. Growth rate (μ) and generation time (t_g) calculated for each case are shown.

Pigments fotosintètics

Bacterioclороfil·la antena

Els continguts específics de pigments per les soques marrons i les relacions molars de la BCl antena respecte la resta de pigments es mostren a la Figura 4.3 i a la Taula 4.1, respectivament.

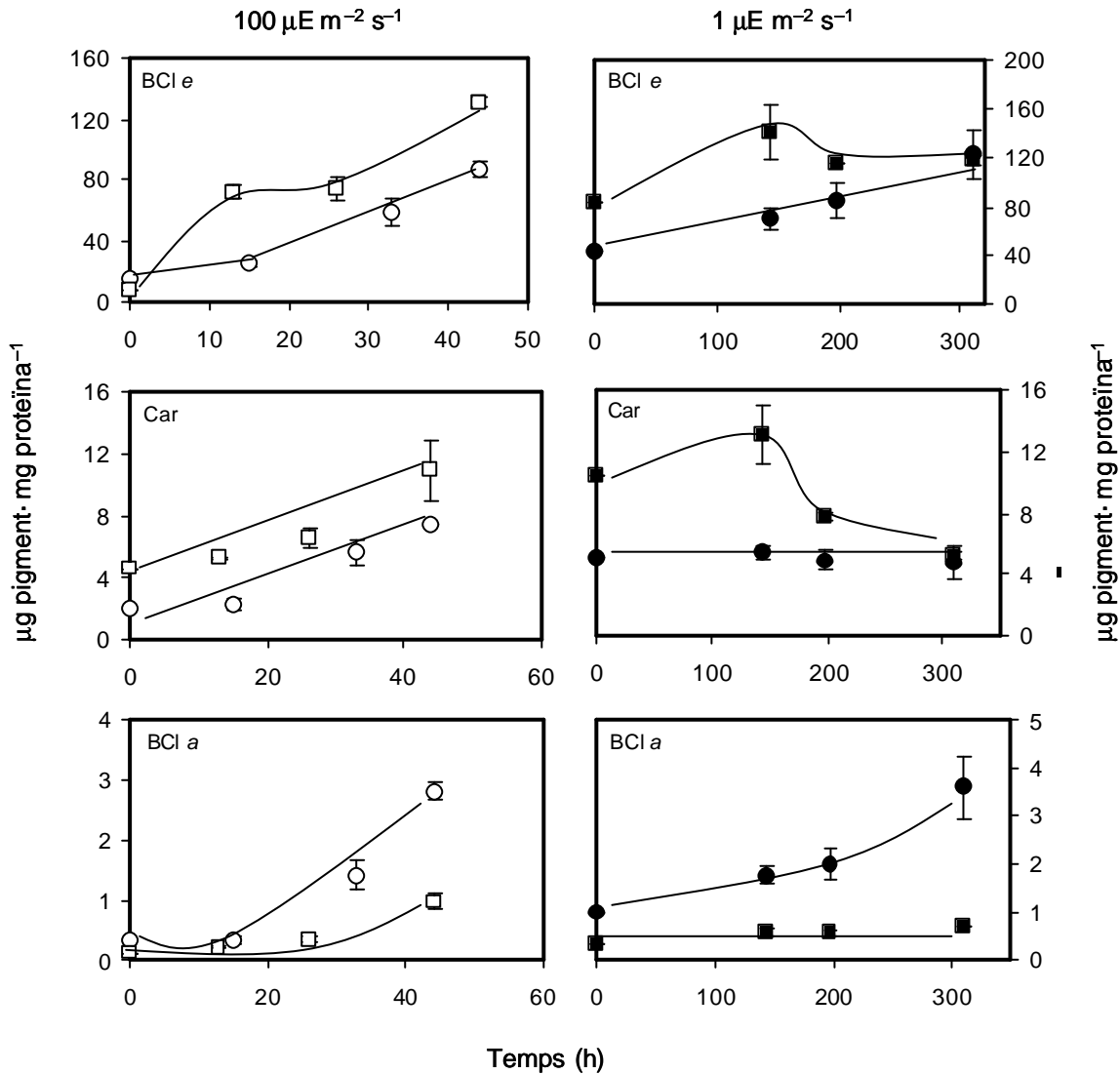


Figura 4.3. Variacions en els continguts específics de pigments a les dues soques marrons estudiades: *Chl. paheobacteroides* CL1401 (○) i *Chl. paheobacteroides* UdG6030 (□) a alta intensitat (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.3. Changes in the specific content of pigments in the two brown studied species: *Chl. paheobacteroides* CL1401 (○) and *Chl. paheobacteroides* UdG6030 (□) at two light intensities ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, open symbols and $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, filled symbols).

Taula 4.1. Relacions molars entre els diferents pigments de l'aparell fotosintètic de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 i *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 a les dues intensitats lumíniques assajades. Es mostra la desviació típica.

Table 4.1. Molar ratios of the different photosynthetic pigments of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 and *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 at the two light intensities tested. Standard deviation is shown.

	CL1401		UdG6030	
	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
BCI <i>e</i> /Car	7,2 \pm 0,41	16,2 \pm 1,32	7,6 \pm 1,14	14,15 \pm 0,14
BCI <i>e/a</i>	33,1 \pm 3,57	37,1 \pm 0,90	145,6 \pm 15,56	192,6 \pm 6,27
Car/ <i>a</i>	4,6 \pm 0,23	2,3 \pm 0,13	19,1 \pm 0,80	13,6 \pm 0,58

En tots els casos, per tal de tenir una millor estima de l'adaptació a les condicions lumíniques, els valors de les relacions molars es van calcular agafant les dades corresponents al final de la fase exponencial del creixement, sense tenir en compte cap valor corresponent a la fase estacionària, en cas de què aquesta es donés. La variació en els continguts específics de pigments per les soques de coloració verda es mostra a la Figura 4.4, mentre que les relacions molars entre els diferents pigments s'han recollit a la Taula 4.2.

Per totes les soques estudiades es va mesurar un major contingut específic de BCI antena (BCI *e* a les espècies marrons i BCI *c* a les espècies verdes) a baixa intensitat de llum (Figures 4.3 i 4.4).

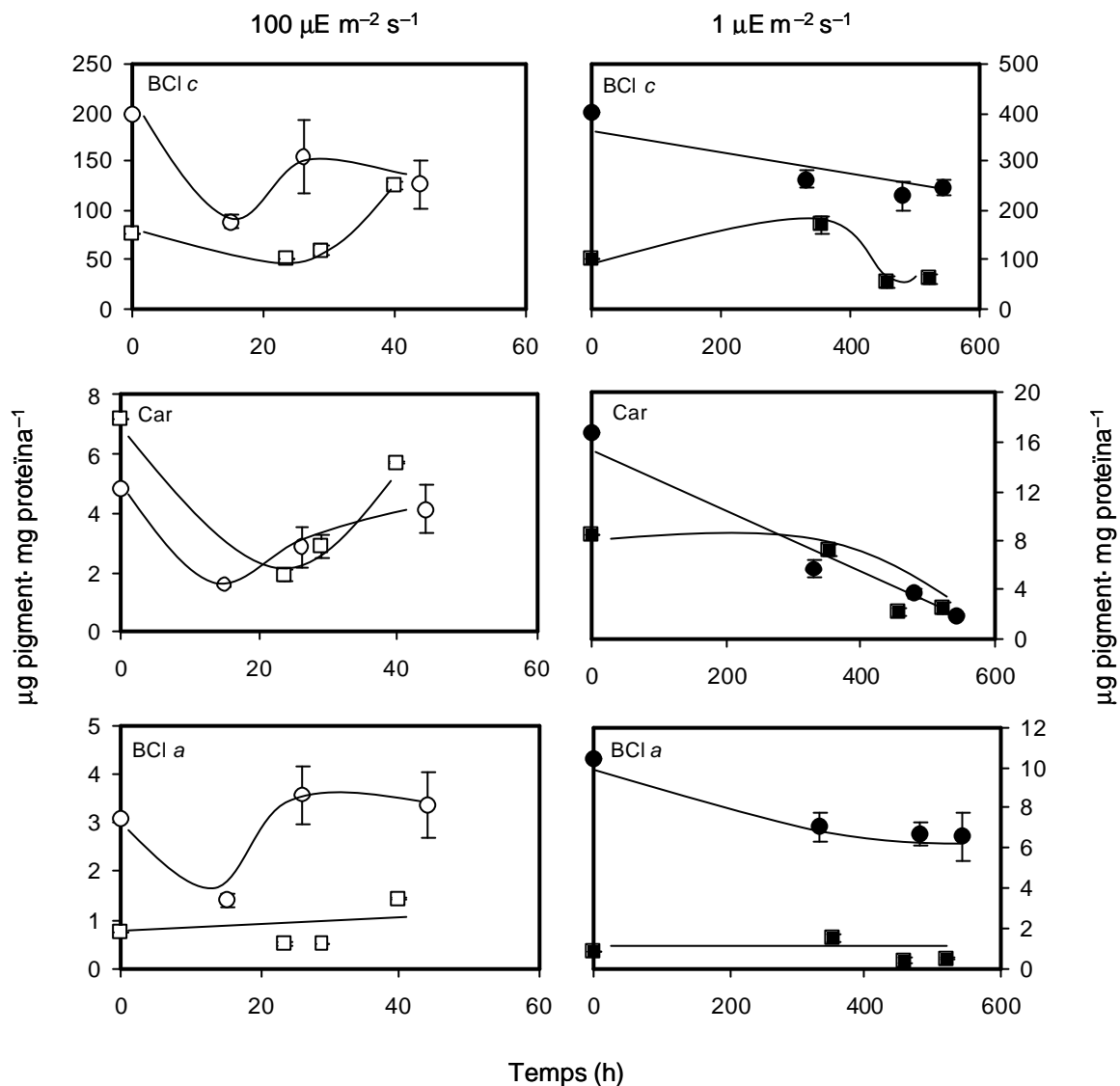


Figura 4.4. Variacions en els continguts específics de pigments a les dues soques verdes estudiades: *Chl. limicola* UdG6038 (○) i *Prosthecochloris aestuarii* CE2404 (□) a alta intensitat (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.4. Changes in the specific content of pigments in the two green studied species: *Chl. limicola* UdG6038 (○) and *Prosthecochloris aestuarii* CE2404 (□) at two light intensities ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, open symbols and $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, filled symbols).

Taula 4.2. Relacions molars entre els diferents pigments de l'aparell fotosintètic de *Chl. limicola* UdG6038 i *Prosthecochloris aestuarii* CE2404 a les dues intensitats lumíniques assajades. Es mostra la desviació típica.

Table 4.2. Molar ratios of the different photosynthetic pigments of *Chl. limicola* UdG6038 and *Prosthecochloris aestuarii* CE2404 at the two light intensities tested. Standard deviation is shown.

	UdG6038		CE2404	
	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
BCI <i>c</i> /Car	20,0 \pm 0,28	84,4 \pm 0,30	14,4 \pm 0,31	15,8 \pm 0,75
BCI <i>c/a</i>	42,0 \pm 0,42	42,5 \pm 5,30	97,9 \pm 0,45	139,4 \pm 7,41
Car/ <i>a</i>	2,1 \pm 0,01	0,5 \pm 0,06	6,8 \pm 0,12	8,8 \pm 0,89

D'una banda, el contingut específic de BCl antena per a totes les soques (Figures 4.3 i 4.4) va tenir tendència a augmentar al llarg del creixement en les dues intensitats assajades, tot i que a les espècies verdes (Figura 4.4) el contingut específic de BCl *c* es va mantenir més constant respecte el contingut de BCl *e* de les soques marrons. El contingut de BCl antena, d'altra banda, també va ser més elevat a 1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per totes les soques estudiades.

Les relacions molars entre l'antena i la BCl *a* total es van mantenir constants, independentment de les condicions lumíniques, per totes les espècies estudiades, amb l'excepció del cultiu de *Prosthecochloris aestuarii*, el qual va experimentar un lleuger augment d'aquesta relació sota condicions limitants de llum (Taules 4.1 i 4.2). La relació molar de l'antena amb els corresponents carotenoides, en canvi, Isr i β -Isr per les espècies marrons i Cbt per les verdes, fou més elevada a intensitats de llum limitants que no a condicions saturants de llum per a les dues soques marrons i per a *Chl. limicola*, evidenciant que si bé es va produir un augment de BCl sota condicions de limitació, aquest no es va produir pels carotenoides. *Prosthecochloris* va mostrar un comportament diferent, ja que la relació BCl *c*/Cbt es va mantenir pràcticament constant tant a saturació com sota limitació lumínica (Taules 4.1 i 4.2).

Atès que el creixement a baixa intensitat de llum té efectes significatius sobre el contingut d'homòlegs de la BCl antena, aquest es va mesurar per totes les espècies mitjançant HPLC. Les diferències en el contingut relatiu d'homòlegs principals (%) en funció a les condicions d'incubació no foren massa destacades en cap dels casos (Figura 4.5). A les espècies

marrons el contingut relatiu dels homòlegs més alquilats, és a dir, de BCl e_3 i BCl e_4 , a baixa intensitat de llum, fou més elevat respecte el mateix contingut a alta intensitat de llum. Una resposta similar es va observar a *Prosthecochloris aestuarii*. A *Chl. limicola*, en canvi, aquesta relació es va donar amb el segon (BCl c_2) i el tercer homòleg (BCl c_3). En tots els casos, però, aquests canvis en el contingut relatiu d'homòlegs foren poc destacables, degut en part a què les condicions lumíniques assajades no foren prou crítiques com per induir canvis en aquests pigments (Borrego i Garcia-Gil, 1995; Borrego, 1996).

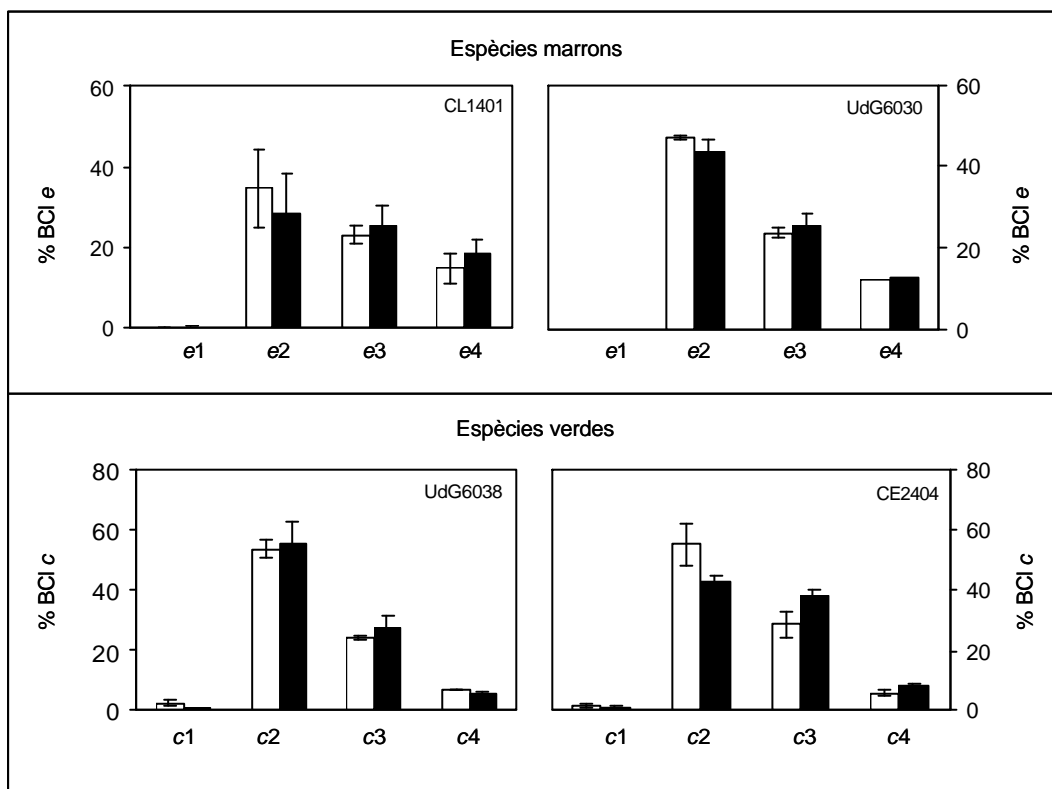


Figura 4.5. Contingut relatiu (%) dels homòlegs principals de les BChls de les quatre soques estudiades a les dues intensitats assajades. Barres blanques ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) i barres negres ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les barres verticals mostren la desviació típica.

Figure 4.5. Relative content (%) of the four main farnesyl-esterified BChls of the strains at two light intensities. White column ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and black column ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vertical bars: standard deviation.

Bacterioclorofil·la *a*

El contingut específic de BCl *a*, al igual que el d'antena, va ser més elevat a baixes intensitats de llum per totes les espècies estudiades (Figures 4.3 i 4.4).

En el cas de *Chl. phaeobacteroides* CL1401, el contingut de BCl *a* al llarg del temps va augmentar sota les dues condicions lumíniques, mentre que per *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 aquest contingut es va mantenir força constant durant tot el creixement (Figura 4.3). Les espècies verdes, d'altra banda, mantingueren uns continguts de BCl *a* força constants, amb petites variacions al llarg del creixement, sota les condicions lumíniques utilitzades (Figura 4.4).

Carotenoides

Pel que fa als carotenoides destaca, en primer lloc, l'elevat contingut d'aquests pigments a les espècies marrons respecte a les espècies verdes. Un exemple concret és el valor de 10,9 µg de carotenoides per mg de proteïna determinat per *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 en relació al valor de 4,3 de *Chl. limicola*, ambdós a 100 µmols m⁻² s⁻¹. Tot i que aquest fet ha estat indicat tradicionalment com un dels factors que podria contribuir a la millor adaptació de les espècies marrons a canvis en la intensitat de llum disponible, tant la vertadera funció d'aquests pigments dins l'aparell fotosintètic, com la seva utilitat dins el procés adaptatiu, són aspectes actualment objecte d'estudi i encara no han estat del tot clarificats.

En totes les espècies el contingut específic de carotenoides a 100 µmols m⁻² s⁻¹ va augmentar durant el creixement, mentre que a 1 µmols m⁻² s⁻¹ el mateix contingut va tenir tendència a disminuir al llarg del creixement (Figures 4.3 i 4.4). Aquest fet no deixa de ser curiós si atenem a la idea que aquests pigments actuen d'antena accessòria.

Pel que fa a la relació molar entre els carotenoides i la BCl *a* total destaca el fet que fou més elevada, per les espècies marrons (Taula 4.1) i per *Chl. limicola* (Taula 4.2) a 100 µmols m⁻² s⁻¹, mentre que per les cèl·lules de *Prosthecochloris aestuarii* l'esmentada relació va ser lleugerament superior a 1 µmols m⁻² s⁻¹ (8,8) que no a 100 µmols m⁻² s⁻¹ (6,8).

D'altra banda, la millor resolució obtinguda amb el mètode d'HPLC utilitzat pel que fa als carotenoides va permetre calcular de forma precisa els continguts específics dels diferents isòmers d'aquests pigments. Això va fer possible estudiar amb més detall l'efecte dels

canvis en la intensitat de llum sobre les proporcions entre els isòmers *trans* i *cis* de l'Isr i el β -Isr (per a les espècies marrons) i del Cbt (per a les espècies verdes) (Taulas 4.3 i 4.4). Cal destacar que el contingut de formes *cis* fou més elevat a les espècies verdes que a les marrons. Malgrat això, es va descartar la possibilitat que aquests isòmers fossin artefactes creats durant la manipulació dels extractes tenint en compte que sempre es presenten en les mateixes proporcions (veure Apartat 3.2.3) tot i que les hipòtesis descrites sobre les funcions dels carotenoides bacterians tan sols mencionen el paper dels isòmers all-*trans* i el dels isòmers 15-*cis* (Koyama i Fujii, 1999).

Taula 4.3. Relacions molars entre els isòmers dels principals carotenoides de les dues soques marrons estudiades a 100 i 1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Es mostra la desviació típica.

Table 4.3. Molar ratios of the *trans* and *cis* isomers of the main carotenoids of the two brown strains at the different light conditions tested. Standard deviation is shown.

	CL1401		UdG6030	
	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Isr/ β -Isr	1,4 \pm 0,17	1,8 \pm 0,13	0,8 \pm 0,06	1,3 \pm 0,07
β -Isr <i>trans/cis</i>	2,6 \pm 0,15	2,4 \pm 0,06	2,1 \pm 0,05	2,1 \pm 0,02
Isr <i>trans/cis</i>	2,4 \pm 0,25	2,1 \pm 0,17	1,8 \pm 0,00	1,6 \pm 0,07

Taula 4.4. Relació molar entre els isòmers *trans* i *cis* del Cbt de les dues espècies verdes estudiades a 100 i 1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Es mostra la desviació típica.

Table 4.4. Molar ratio between *trans* and *cis* of Cbt in the two green-species studied at 100 and 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Standard deviation is shown.

	UdG6038		CE2404	
	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Cbt <i>trans/cis</i>	1,0 \pm 0,00	0,5 \pm 0,04	0,6 \pm 0,07	0,6 \pm 0,02

Relació entre els homòlegs de bacterioclorofil·la i els carotenoides

A més d'estudiar les variacions en el contingut de pigments de GSB sotmesos a diferents condicions d'il·luminació, es va analitzar la relació que s'estableix entre la concentració de BCl i la de carotenoides a les dues intensitats lumíniques assajades. L'objectiu d'analitzar aquesta relació rau en el fet que la molècula precursora en la ruta de síntesi dels carotenoides, és a dir, el geranilgeraniol pirofosfat (GGPP), és també precursor d'alguns dels alcohols que s'esterifiquen al C-17 de les BCl. El que es pretenia determinar, doncs, era si la síntesi dels dos tipus de pigments podia ser co-regulada, és a dir, que aquests puguin ser sintetitzats simultàniament, o bé si la síntesi d'un d'ells va en detriment de la síntesi de l'altre i per tant això impliqui que la cèl·lula hagi de sintetitzar primer un tipus de pigment i després l'altre. Per a totes les soques estudiades les relacions obtingudes s'ajustaren a una recta. En tots els casos la concentració de carotenoides fou relacionada d'una banda amb la concentració de BCl total ([BCI]_t) i d'altra només amb alguns homòlegs. Concretament s'estudià la relació dels carotenoides amb els següents grups d'homòlegs de BCl: (1) homòlegs esterificats amb farnesol ([BCI]_F), (2) homòlegs secundaris ([BCI]_{sec}), (3) homòlegs secundaris menys els que es troben esterificats amb fitol ([BCI]_{sec-f}), (4) homòlegs esterificats amb fitol ([BCI]_f), i finalment (5) homòlegs esterificats amb fitol més BCl *a* ([BCI]_{f+a}) (Figures 4.6–4.9).

El motiu dels grups escollits serà discutit més endavant al corresponent apartat del present Capítol (4.3.1.1).

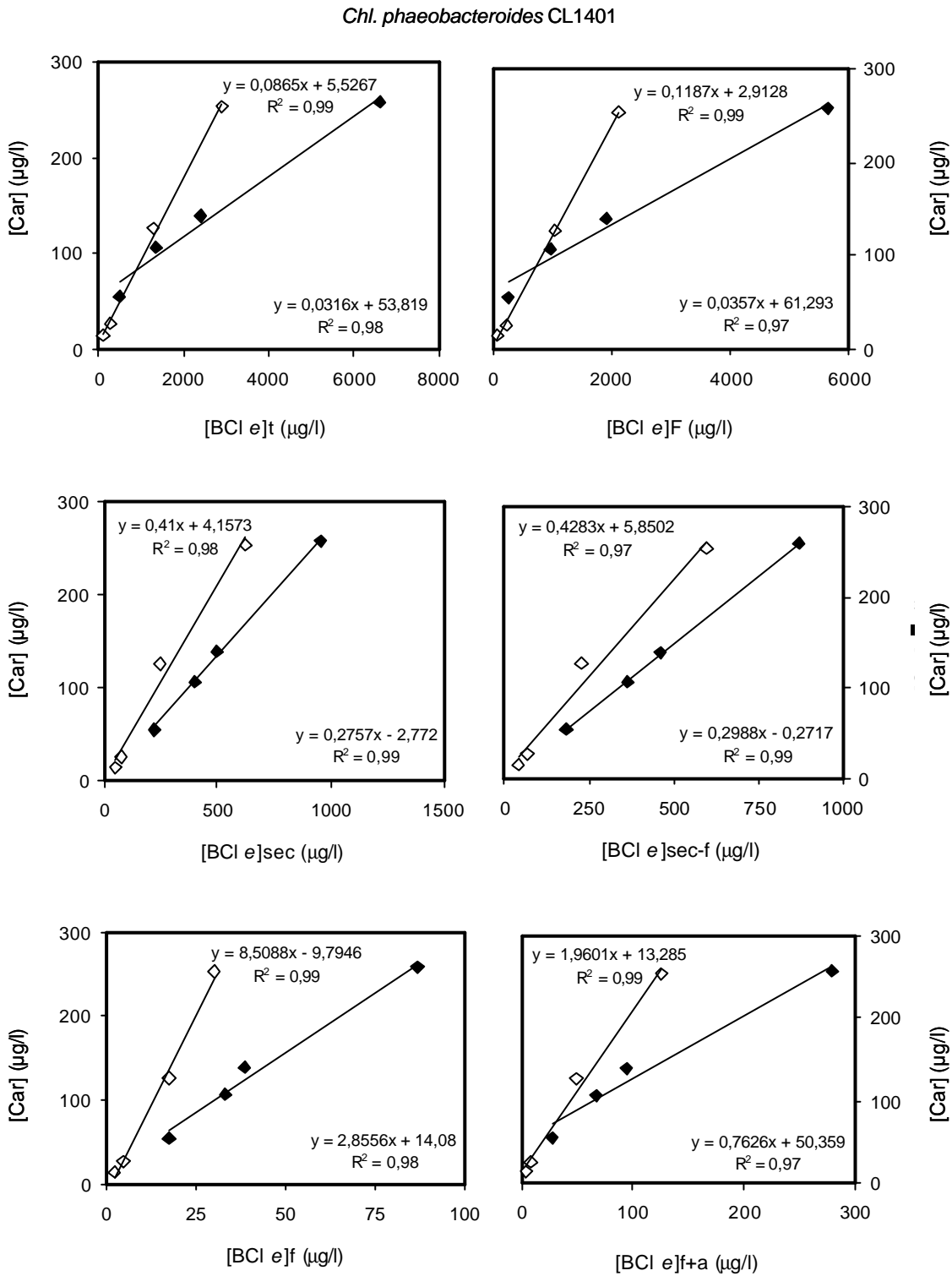


Figura 4.6. Relacions entre la BChl e total i els Car, i entre diferents homòlegs i els Car per a la soca marró *Chl. phaeobacteroides* CL1401 a alta intensitat de llum (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.6. Relation between total BChl e and Car, and between different homologues and Car for the brown-coloured strain *Chl. phaeobacteroides* CL1401 at high light intensity (open symbols) and at low light intensity (filled symbols).

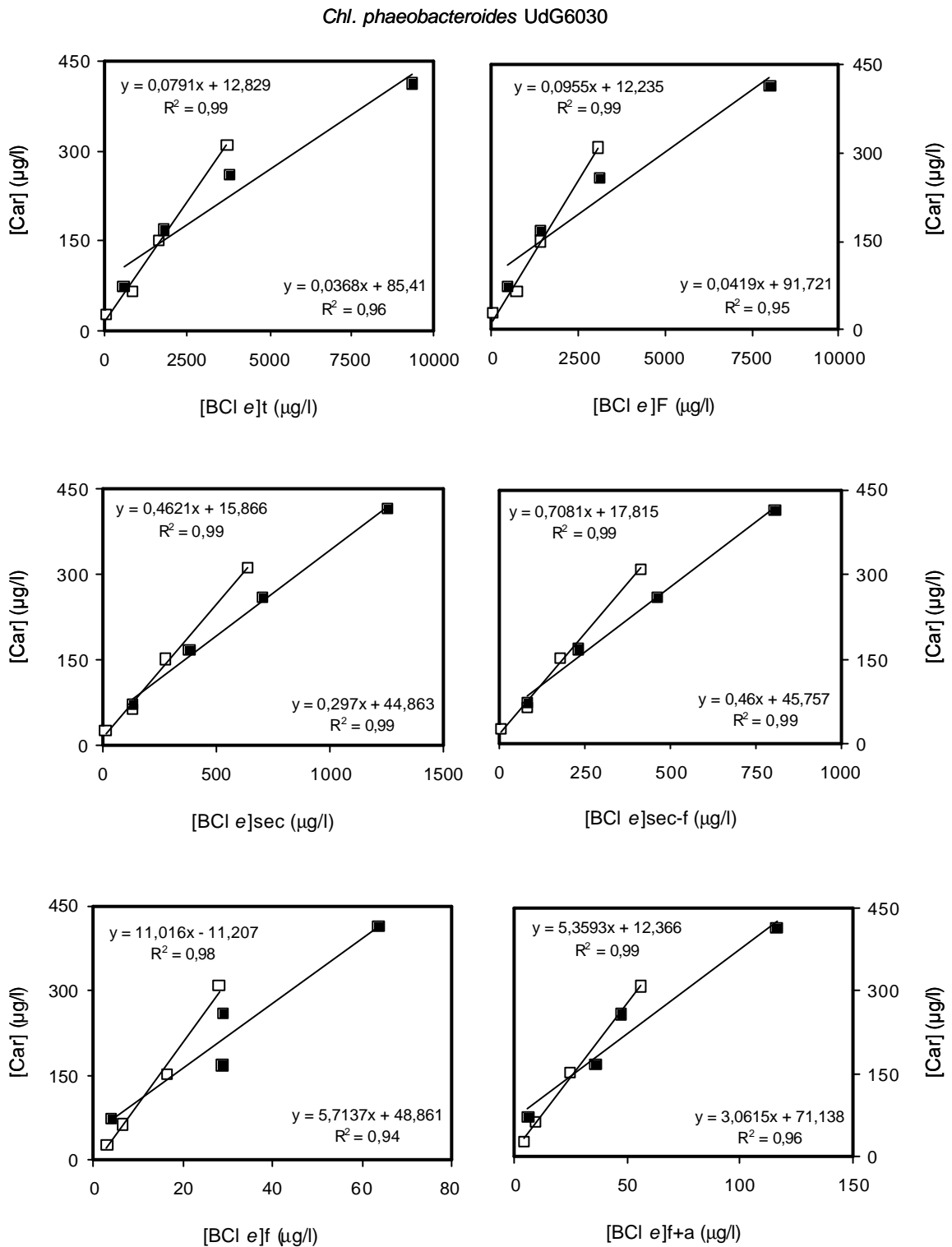


Figura 4.7. Relacions entre la BCl e total i els Car, i entre diferents homòlegs i els Car per a la soca marró *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 a alta intensitat de llum (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.7. Relation between total BChl e and Car, and between different homologues and Car for the brown-coloured strain *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 at high light intensity (open symbols) and at low light intensity (filled symbols).

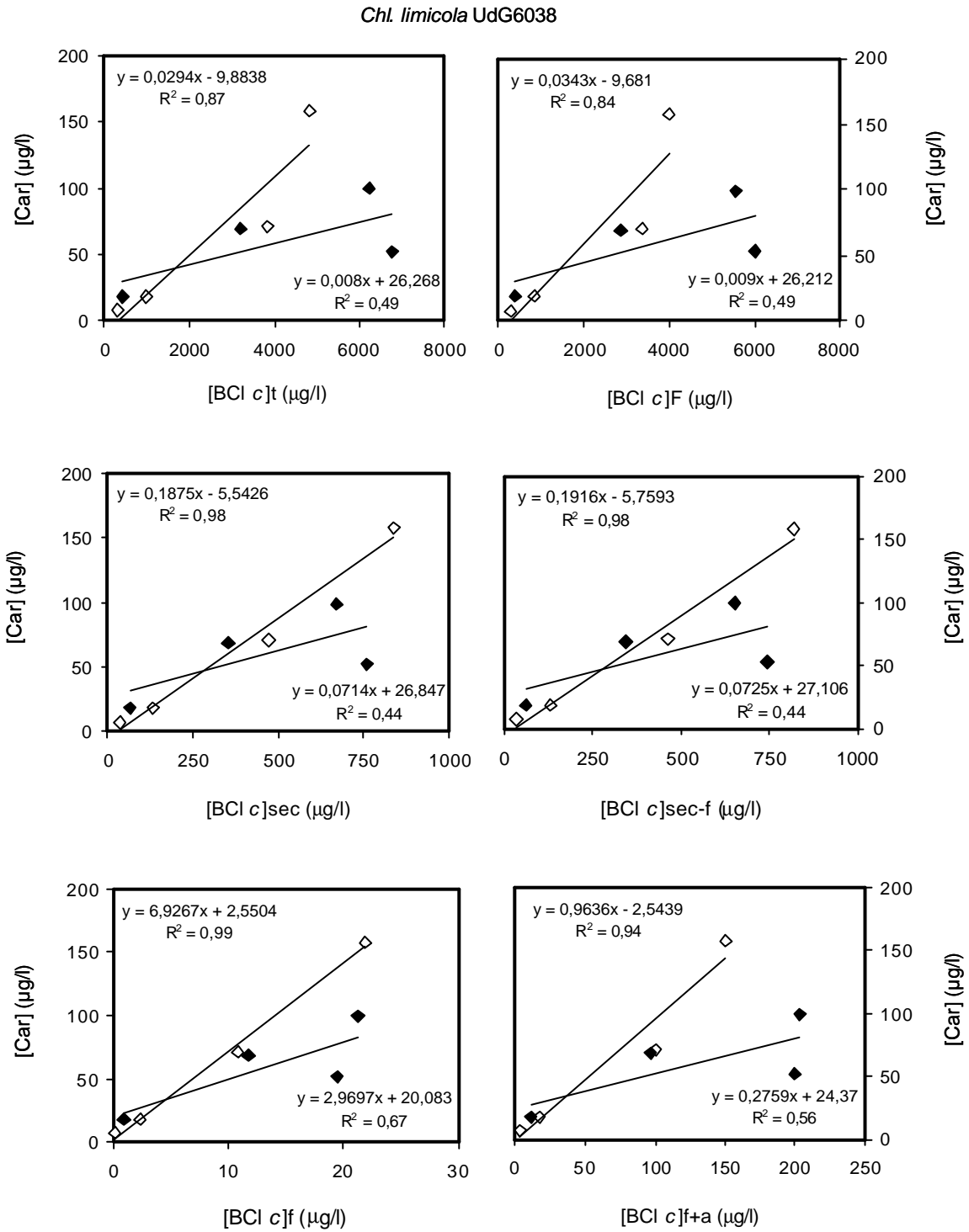


Figura 4.8. Relacions entre la Bchl c total i els Car, i entre diferents homòlegs i els Car per a la soca verda *Chl. limicola* UdG6038 a alta intensitat de llum (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.8. Relation between total Bchl c and Car, and between different homologues and Car for the green-coloured strain *Chl. limicola* UdG6038 at high light intensity (open symbols) and at low light intensity (filled symbols).

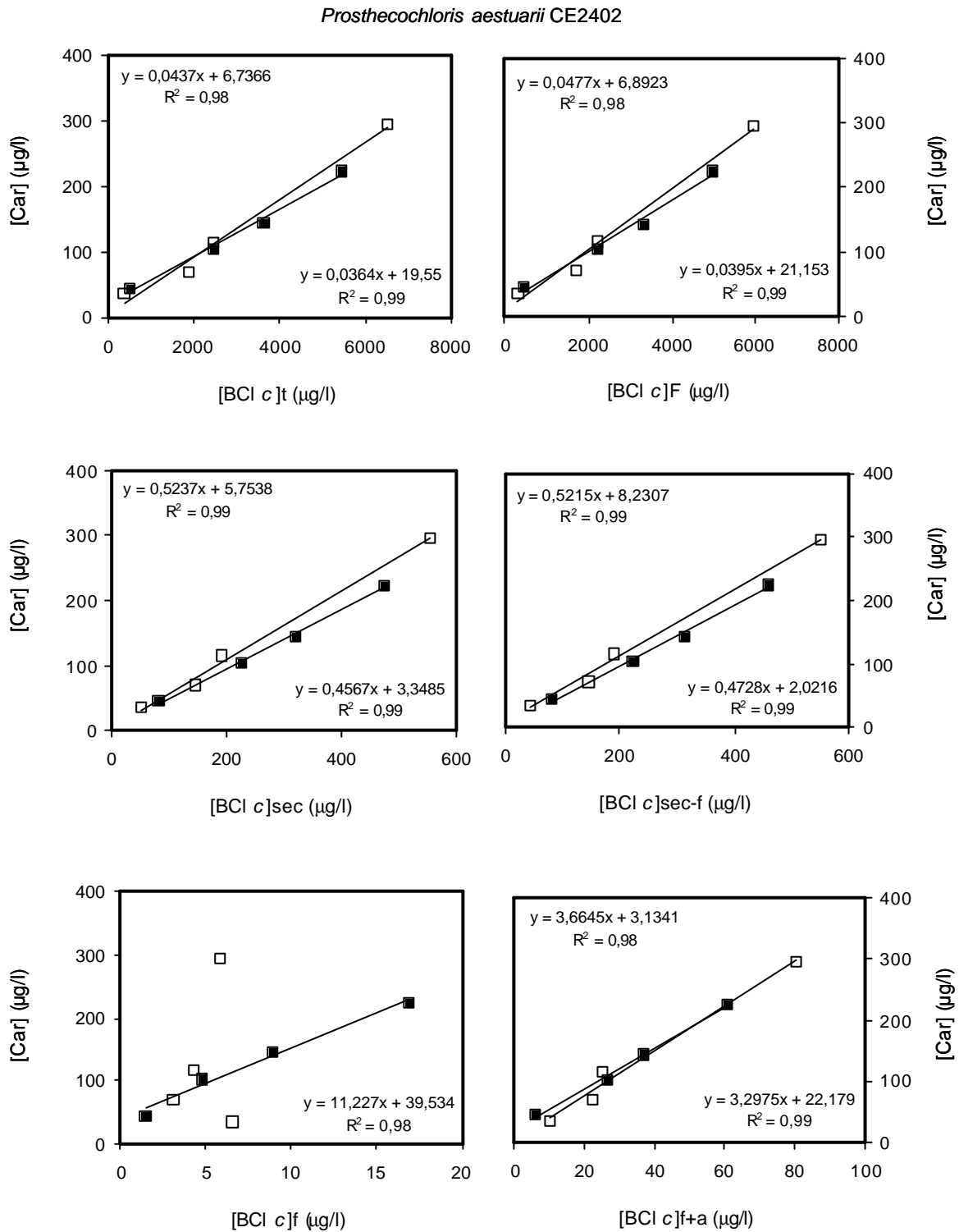


Figura 4.9. Relacions entre la Bchl c total i els Car, i entre diferents homòlegs i els Car per a la soca verda *Prosthecochloris aestuarii* CE2402 a alta intensitat de llum (símbols blancs) i a baixa intensitat de llum (símbols negres).

Figure 4.9. Relation between total Bchl c and Car, and between different homologues and Car for the green-coloured strain *Prosthecochloris aestuarii* CE2404 at high light intensity (open symbols) and at low light intensity (filled symbols).

4.2.1.2. Variacions en el nombre de centres de reacció de diferents soques de Bacteris Verds del Sofre creixent sota limitació lumínica

Estimació del nombre de centres de reacció

Un avenç important del present treball de recerca fou la possibilitat d'estimar el nombre de CR a partir de la quantificació de la concentració de BC₆₆₃. Aquest pigment actua d'acceptor primari en la cadena de transport d'electrons (Braumann *et al.*, 1986; van de Meent *et al.*, 1992; Feiler *et al.*, 1994; Feiler i Hauska, 1995) i per tant és una molècula constitutiva dels CR dels GSB. La identificació d'aquesta BC₆₆₃, mitjançant HPLC, va ser possible gràcies al seu espectre d'absorció i temps de retenció (Figura 4.10). La concentració d'aquest pigment es va obtenir integrant l'àrea del pic a 434 nm, longitud d'ona corresponent al màxim d'absorció de la banda Soret de l'espectre d'absorció, i utilitzant el coeficient d'extinció molar de 82.600, determinat en acetona 100 % per Smith i Benitez (1955). A partir de la concentració en μM d'aquest pigment (μmols de pigment per l de cultiu) es va calcular el nombre de molècules del mateix.

L'estimació del nombre de CR es va realitzar atenent que, a cada CR tipus I s'associen 4 molècules d'acceptor primari (Kobayashi *et al.*, 1992; 2000; Permentier *et al.*, 2000). Així, a partir del quocient entre les molècules de BC₆₆₃ i 4, es va poder calcular el nombre de CR, per litre de cultiu, i posteriorment el nombre de CR específic, és a dir, el nombre d'aquests per mg de proteïna.

Pel que fa al contingut específic de CR, per *Chl. phaeobacteoides* CL1401 i per *Chl. limicola* UdG6038, destaca el fet que fou superior a baixa intensitat de llum. En aquesta intensitat els valors obtinguts foren el doble que els obtinguts a $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taula 4.5). Per a les altres dues espècies estudiades, és a dir, per a *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 i per a *Prosthecochloris aestuarii* CE2404, les diferències en el contingut específic de CR entre una intensitat lumínica i l'altra no foren tan evidents. Per aquestes soques els valors a alta intensitat de llum foren lleugerament més elevats. *Chl. limicola*, concretament, va passar de $2,7 \times 10^{13}$ CR/mg de proteïna, a baixa intensitat de llum, a tenir-ne $3,8 \times 10^{13}$ en condicions saturants (Taula 4.5).

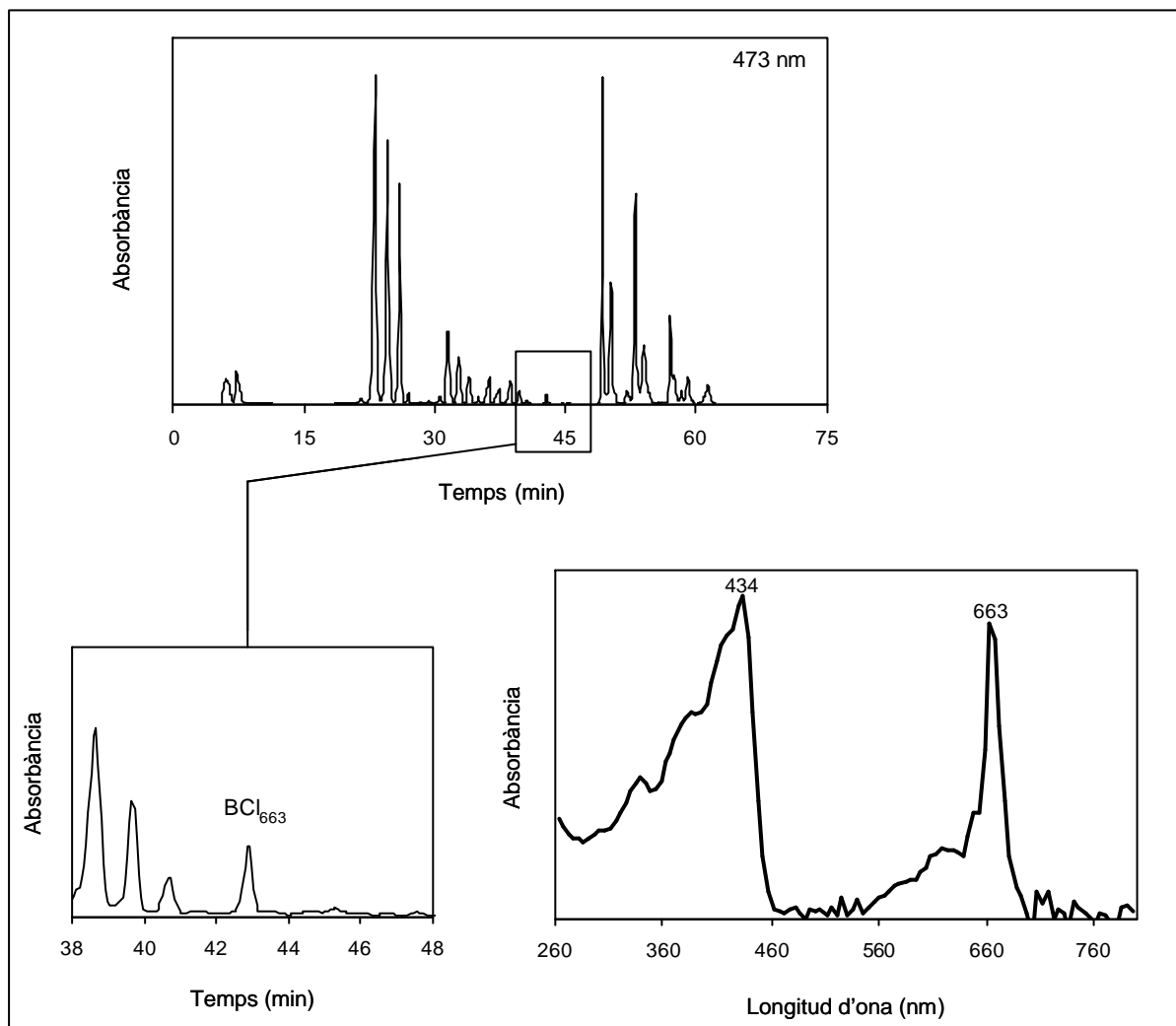


Figura 4.10. Cromatograma de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 en el qual ha estat ampliada la zona d'elució de la BCl₆₆₃. La Figura de la dreta correspon a l'espectre d'absorció de l'esmentada BCl.

Figure 4.10. Chromatogram of *Chl. phaeobacteroides* CL1401. Figure in the right corresponds to the absorption spectrum of BCl₆₆₃.

Taula 4.5. Nombre específic de CR (per mg de proteïna) calculat per les quatre espècies estudiades a les dues intensitats lumíniques assajades. Es mostra la desviació típica.

Table 4.5. Specific number of Reaction Centers (RC number/mg protein) estimated for the four strains at two light intensities. Standard deviation is shown.

	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CL1401	$(2,7 \pm 0,07) \times 10^{13}$	$(5,0 \pm 0,65) \times 10^{13}$
UdG6030	$(3,8 \pm 0,08) \times 10^{13}$	$(2,7 \pm 0,26) \times 10^{13}$
UdG6038	$(3,4 \pm 0,18) \times 10^{13}$	$(7,3 \pm 0,19) \times 10^{13}$
CE2404	$(3,3 \pm 0,06) \times 10^{13}$	$(2,1 \pm 0,21) \times 10^{13}$

Estequiometria dels centres de reacció a diferents condicions de llum

Per poder establir estequiometries entre els diferents pigments i els CR, a les dues intensitats lumíniques assajades, es va calcular, d'una banda, el nombre de molècules de cada pigment i, d'altra banda, el nombre de CR per litre de cultiu. En ambdós casos el nombre de molècules, per litre, va ser calculat a partir de la concentració en μM del corresponent pigment, tenint en compte que 1 mol d'una determinada substància conté $6,02 \times 10^{23}$ (nombre d'Avogadro) molècules d'aquella substància. En el cas dels CR, el càlcul del seu nombre per litre es va realitzar a partir de la concentració, en μM , de la BCl₆₆₃. El valor obtingut va ser posteriorment dividit entre 4, tal i com ha estat mencionat anteriorment.

El més destacat de les relacions obtingudes va ser, que si bé les proporcions entre la BCl antenna i la BCl *a* respecte els CR es van mantenir força constants, independentment a les condicions lumíniques assajades, la proporció Car/CR fou superior en els cultius incubats a intensitats de llum saturants, que com molt evident en el cas de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 (Taula 4.6) i *Chl. limicola* UdG6038 (Taula 4.7). La relació Car/CR, en el cas de *Chl. phaeobacteroides* CL1401, es va quasi triplicar en passar d'una intensitat lumínica de 1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mentre que en el cas de *Chl. limicola* l'increment de la mateixa relació fou superior a 4 vegades en passar del valor a baixa intensitat respecte el valor a condicions saturants de llum.

Taula 4.6. Relacions entre les molècules dels diferents pigments (BChl *e*, BChl *a* i Car) i el nombre de CR per les dues soques marrons estudiades a les dues intensitats lumíniques assajades. Es mostra la desviació típica.

Table 4.6. Relations between the molecules of the photosynthetic pigments (BChl *e*, BChl *a* and Car) and the number of RC for the two brown strains studied at 100 and 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Standard deviation is shown.

	CL1401		UdG6030	
	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
BChl <i>e</i> /CR	2237,7 \pm 77,18	1744,6 \pm 47,12	2452,6 \pm 120,09	3196,9 \pm 198,93
BChl <i>a</i> /CR	67,9 \pm 4,98	47,0 \pm 2,41	17,0 \pm 2,64	16,6 \pm 1,57
Car/CR	309,7 \pm 6,98	108,1 \pm 11,76	325,2 \pm 64,04	225,8 \pm 11,79

Taula 4.7. Relacions entre les molècules dels diferents pigments (BChl *c*, BChl *a* i Car) i el nombre de CR per les dues espècies verdes estudiades a les dues intensitats lumíniques assajades. Es mostra la desviació típica.

Table 4.7. Relations between the molecules of the photosynthetic pigments (BChl *c*, BChl *a* and Car) and the number of RC for the two green species studied at 100 and 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Standard deviation is shown.

	UdG6038		CE2404	
	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
BChl <i>c</i> /CR	2696,0 \pm 369,73	2483,0 \pm 77,98	2796,2 \pm 123,99	2168,6 \pm 82,28
BChl <i>a</i> /CR	64,2 \pm 9,43	59,0 \pm 9,20	28,6 \pm 1,14	15,6 \pm 0,24
Car/CR	134,7 \pm 77,97	29,4 \pm 1,03	193,8 \pm 4,38	137,5 \pm 11,74

4.2.2. Variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides dels clorosomes d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre

Un dels objectius del treball d'investigació era el d'avaluar les diferències en les relacions *trans/cis* dels principals carotenoides en els clorosomes d'espècies marrons. Tenint en compte els resultats obtinguts en l'apartat anterior, pel que fa al contingut de carotenoides a alta intensitat lumínica, sobretot a les espècies marrons de GSB estudiades, els cultius a partir dels quals s'aïllaren els clorosomes foren incubats a intensitat de llum alta ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Els clorosomes es van aïllar mitjançant un gradient en continu de sacarosa (veure Apartat 2.3 de Material i Mètodes). Una vegada centrifugat aquest gradient, el material carregat es va distribuir en diferents fraccions d'acord amb la seva densitat específica (veure Figura 4.11). Les fraccions obtingudes contenen diferents components de l'aparell fotosintètic, sobretot clorosomes lliures i associats a membrana, membranes residuals, etc. La identificació de la fracció clorosòmica pura es va fer a partir de l'espectre d'absorció (entre 350 i 900 nm) (Figures 4.12–4.14).

Per a les tres soques estudiades, *Chl. phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* 2430^T i *Chl. phaeovibroides* 2631^T, la primera de les fraccions obtingudes fou la més rica en carotenoides, essent pràcticament l'únic pigment detectat en aquesta fracció en la soca CL1401 (Figura 4.12. Panells superiors). En el cas de les altres dues soques marrons, tot i que la primera fracció fou la més rica en carotenoides (Figures 4.13 i 4.14), també es va detectar BCl *e*, sobretot a *Chl. phaeovibroides* (veure Fracció 1, Figura 4.14).

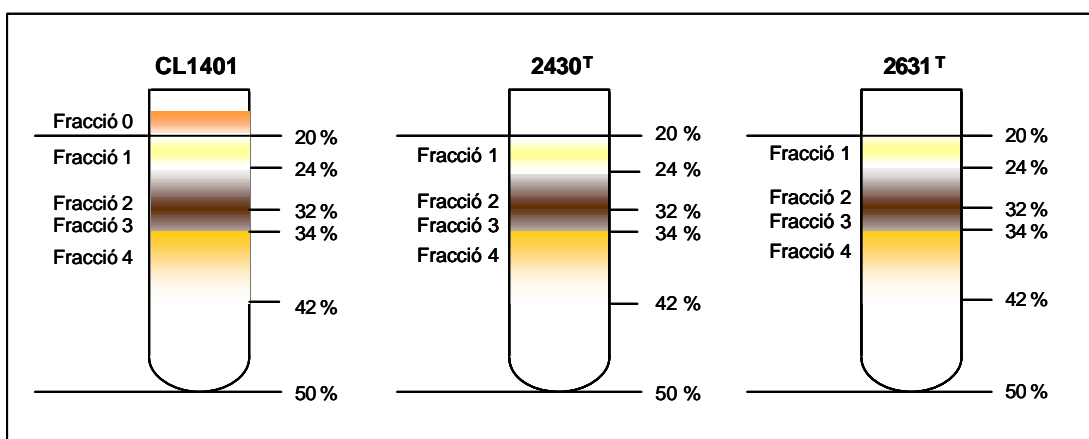


Figura 4.11. Fraccions fotosintètiques, per les tres soques analitzades obtingudes després del gradient de sacarosa.

Figure 4.11. Photosynthetic fractions from the three studied species obtained after the sucrose gradient.

Pels tres casos estudiats, la major part de clorosomes es va acumular a l'entorn del 32 % de sacarosa (Figura 4.11). Aquesta fracció, que es va anomenar Fracció 2, es va carregar en gradients de flotació per tal d'acabar de netejar els clorosomes i disposar d'una fracció pura dels mateixos pels posteriors anàlisis pigmentaris.

La identificació de les diferents fraccions fotosintètiques després del gradient de sacarosa, incloent la fracció clorosòmica més pura, fou a partir dels espectres d'absorció *in vivo* realitzats per cadascuna de les fraccions obtingudes, tal com ha estat mencionat anteriorment (Panells esquerres. Figures 4.12–4.14). Els espectres d'absorció de cada soca van mostrar uns pics màxims d'absorció, tant a la banda Soret com a la Q_Y , característics i diferents per a cadascuna d'elles. El màxim d'absorció a l'entorn dels 700 nm (banda Q_Y) va ser degut a l'absorció de la BCl antena, BCl *e* per a les tres soques, mentre que l'absorció a longituds d'ona inferiors (entre 350 i 500 nm) fou deguda, d'una banda, a l'absorció dels carotenoides, i d'altra banda, a l'absorció de la BCl *e* (banda Soret).

L'absorció a l'entorn de 800 nm va correspondre al màxim d'absorció de la BCl *a* de la làmina basal. Aquest pic no tan sols va ser aparent a la Fracció 2, la més pura després del gradient de sacarosa, sinó que també va aparèixer a d'altres fraccions fotosintètiques, com és el cas de les fraccions 3 i 4 de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 i *Chl. phaeovibroides* 2631^T (Figures 4.12 i 4.14). Tenint en compte, per tant, que els clorosomes contenen BCl *a*, procedent de la làmina basal dels mateixos, en principi la manca d'aquest pigment als clorosomes purs no era d'esperar (Figura 4.15). Aquesta absència ja va ser també aparent a la Fracció 2 de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 (Figura 4.12) (veure Discussió. Apartat 4.3.2).

La identificació de la BCl *a* associada a les proteïnes FMO i als CR, en canvi, és deguda al màxim d'absorció que presenta a longituds d'ona més elevades, a l'entorn dels 810–815 nm, respecte la BCl *a* de la làmina basal. Les fraccions fotosintètiques en les quals es detecta aquesta BCl *a* corresponen a clorosomes poc purs, és a dir, units a restes de membrana. Aquestes fraccions s'obtenen a una densitat del gradient de sacarosa superior a la que li correspon a la fracció de clorosomes més pura. No obstant això, per cap de les fraccions més denses de les soques estudiades es va detectar un pic d'absorbància clar que correspongui a la BCl *a* associada a les proteïnes FMO i als CR.

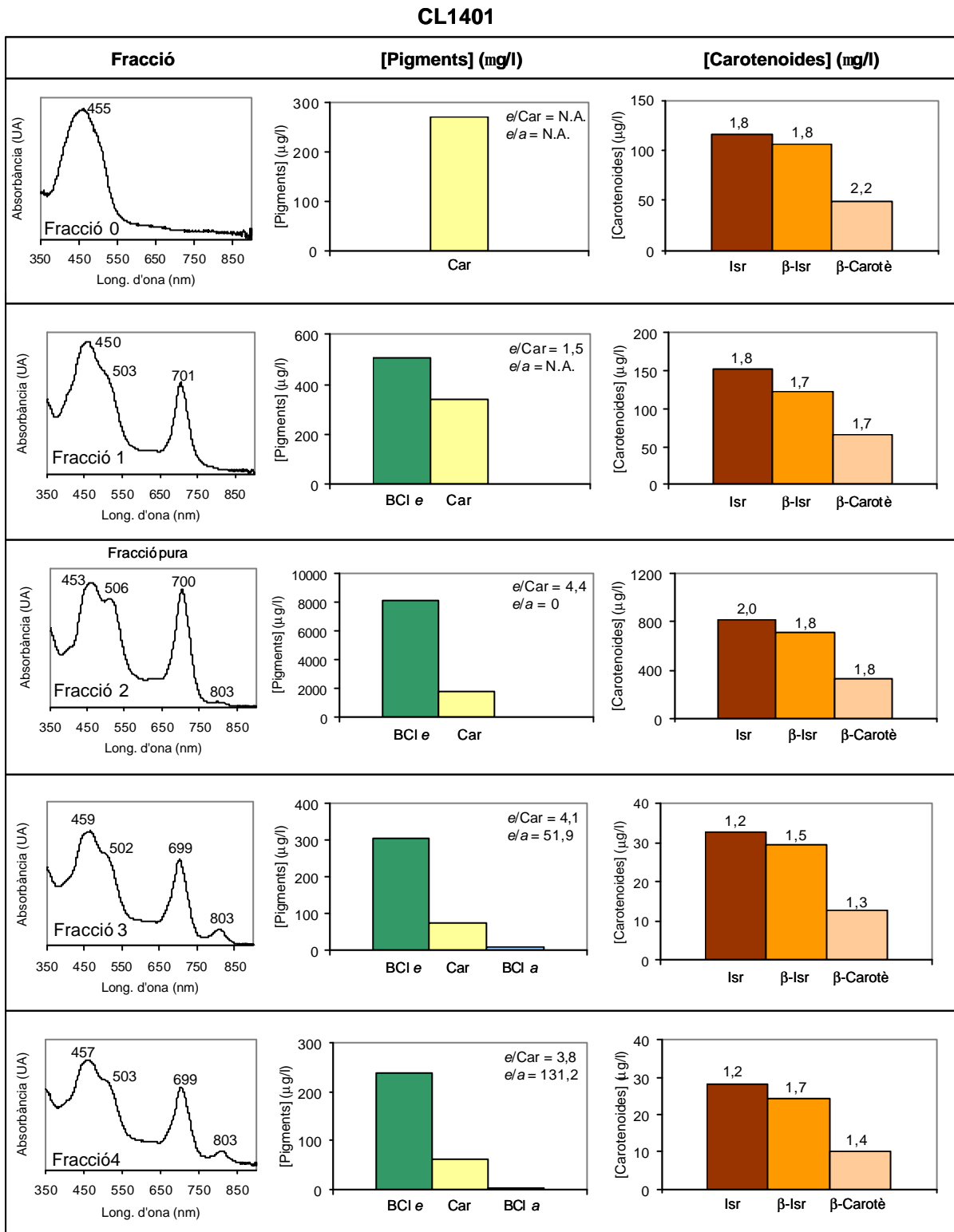


Figura 4.12. Espectre d'absorció (esquerra), concentració de pigments i relacions molars entre aquests (centre) i concentració dels diferents carotens (dreta) de les diferents fraccions analitzades després del gradient de sacarosa de *Chl. phaeobacteroides* CL1401. Els valors sobre les columnes en el panell dret expressen la relació molar entre els isòmers *trans* i *cis* de cada carotenoide. N.A.: no aplicable.

Figure 4.12. Absorption spectra (left), pigment concentration and molar ratios (middle) and carotene concentration (right) of the different fractions analysed after the sucrose density gradients from *Chl. phaeobacteroides* CL1401. Values above the bars in the right pannel show the molar ratios between *trans* and *cis* isomers for each carotene.

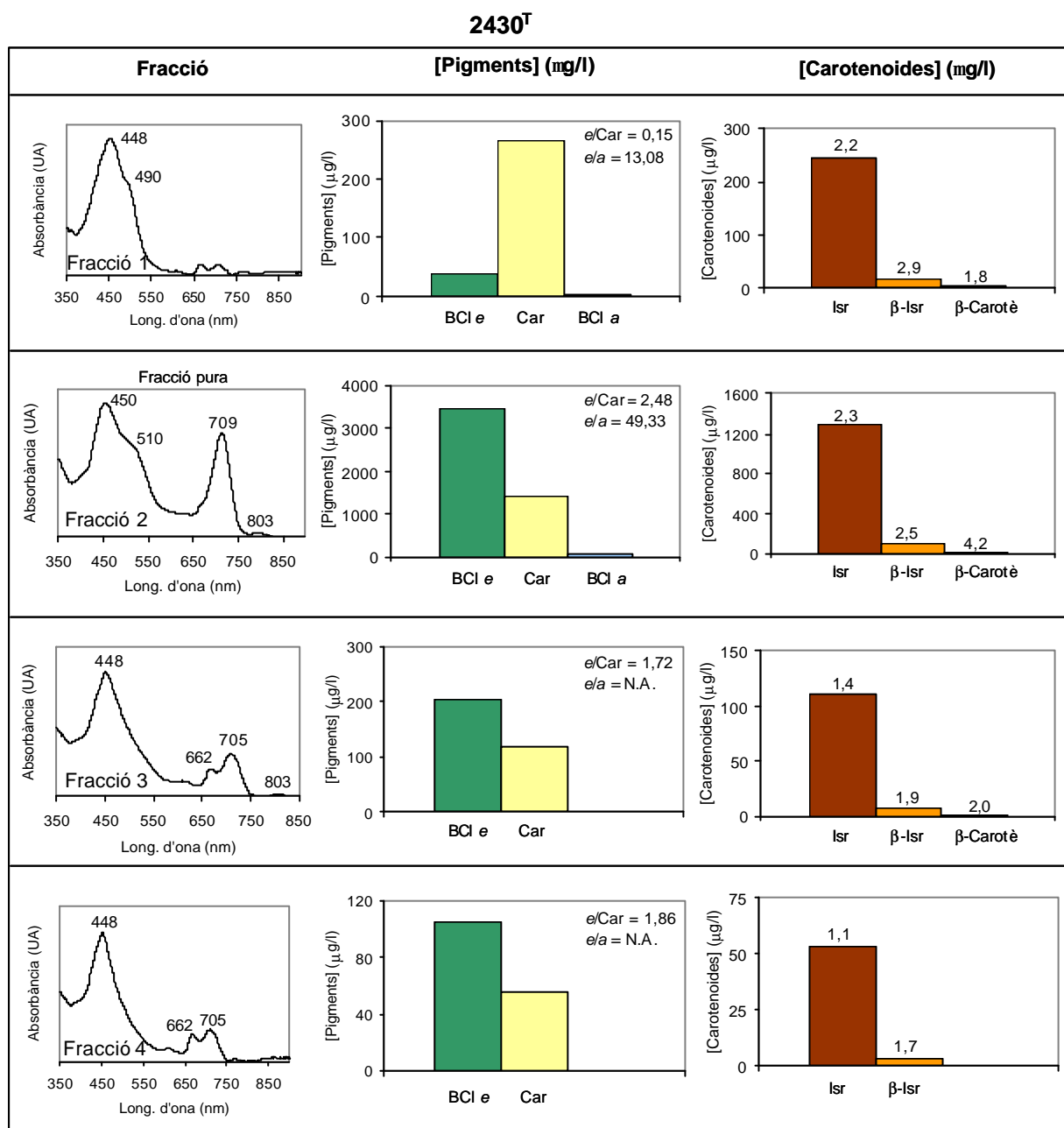


Figura 4.13. Espectre d'absorció (esquerra), concentració de pigments i relacions molars entre aquests (centre) i concentració dels diferents carotens (dreta) de les diferents fraccions analitzades després del gradient de sacarosa de *Chl. phaeobacteroides* 2430^T. Els valors sobre les columnes en el panell dret expressen la relació molar entre els isòmers *trans* i *cis* de cada carotenoide. N.A.: no aplicable.

Figure 4.13. Absorption spectra (left), pigment concentration and molar ratios (middle) and carotene concentration (right) of the different fractions analysed after the sucrose density gradients from *Chl. phaeobacteroides* 2430^T. Values above the bars in the right pannel show the molar ratios between *trans* and *cis* isomers for each carotene.

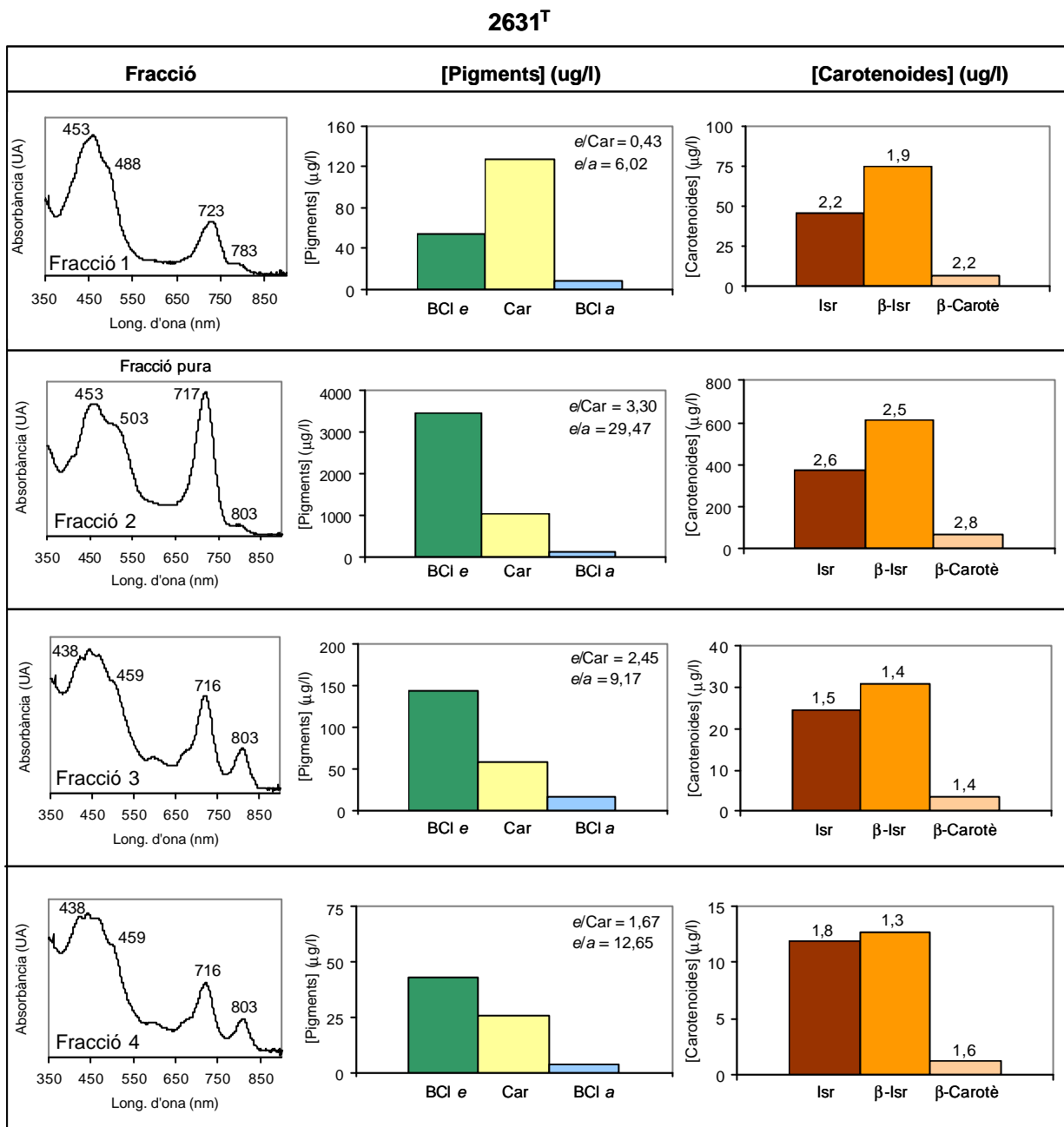


Figura 4.14. Espectre d'absorció (esquerra), concentració de pigments i relacions molars entre aquests (centre) i concentració dels diferents carotens (dreta) de les diferents fraccions analitzades després del gradient de sacarosa de *Chl. phaeovibroides* 2631^T. Els valors sobre les columnes en el panell dret expressen la relació molar entre els isòmers *trans* i *cis* de cada carotenoide.

Figure 4.14. Absorption spectra (left), pigment concentration and molar ratios (middle) and carotene concentration (right) of the different fractions analysed after the sucrose density gradients from *Chl. phaeovibroides* 2631^T. Values above the bars in the right panel show the molar ratios between *trans* and *cis* isomers for each carotene.

Pel que fa al contingut de pigments, destaca, en tots els casos, l'elevat contingut de BCl *e* de la fracció més pura (Fracció 2) respecte els altres pigments, carotenoides i BCl *a*, en cas que aquesta fos detectada (Figures 4.12–4.14). En el cas de *Chl. phaeovibroides*, per exemple, la relació BCl *e*/Car a la Fracció 2 fou de 3,3, mentre que a la Fracció 4 aquesta mateixa relació va disminuir fins al valor de 1,67. Degut, doncs, a l'elevat contingut de BCl antena a les fraccions fotosintètiques més pures (Fracció 2 en els tres casos), la relació BCl *e*/Car va ser més elevada en aquestes fraccions. Aquesta relació, calculada també pels clorosomes purs, obtinguts després del gradient de flotació, va augmentar unes 25 vegades respecte el valor obtingut per a les Fraccions 2, en totes les soques estudiades (Panells centrals. Figures 4.12–4.15).

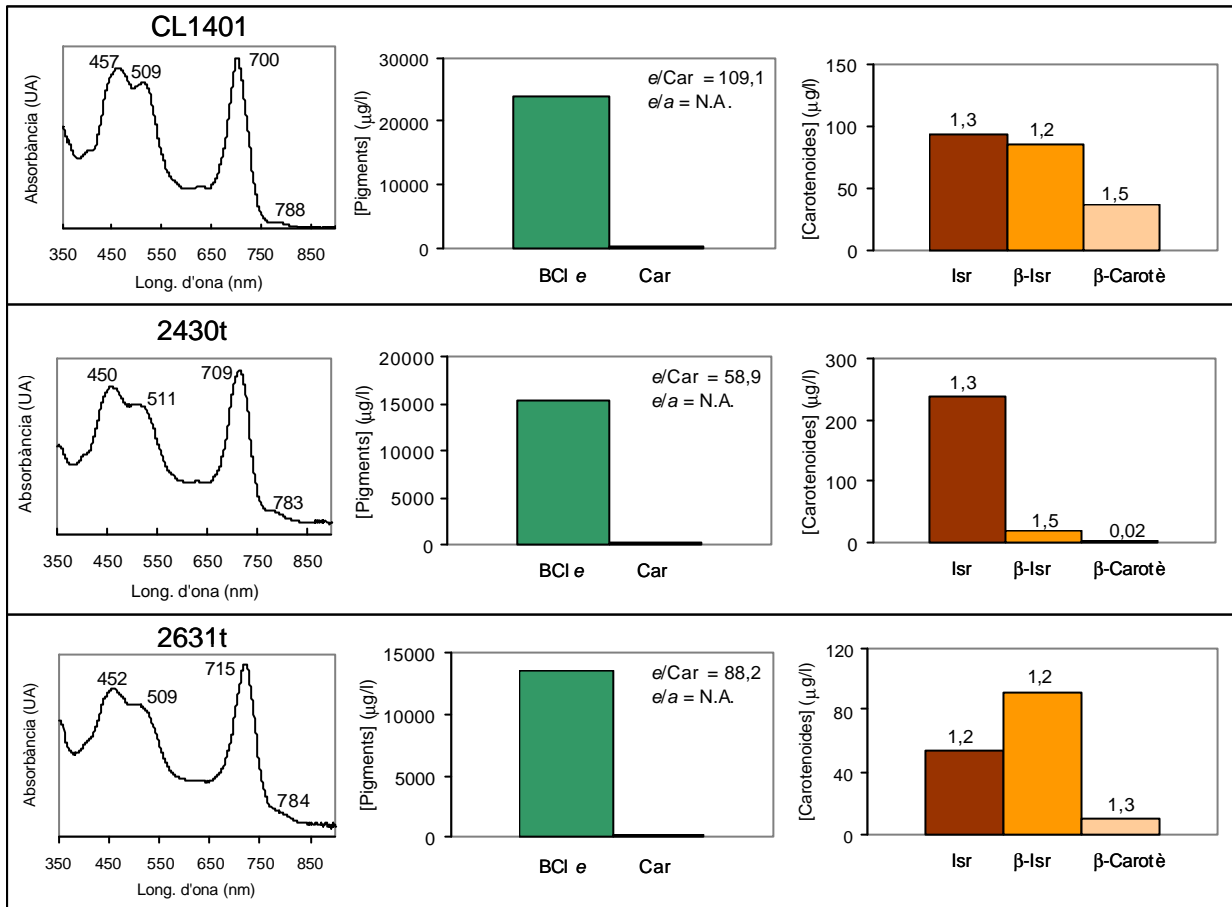


Figura 4.15. Fraccions clorosòmiques purificades per gradient de flotació de les dues soques de *Chl. phaeobacteroides* (CL1401 i 2430^T) i de la soca de *Chl. phaeovibroides* (2631^T) estudiades. Per cada soca es presenten tres figures: l'espectre d'absorció (esquerra), la concentració de pigments de la mostra i les relacions molars entre aquests (centre), i la concentració dels diferents carotens (dreta). En aquest últim cas, el valor numèric que apareix sobre cada barra expressa la relació molar entre els isòmers *trans* i *cis* de cada carotenoide. N.A.: no aplicable.

Figure 4.15. Absorption spectra (left), pigment concentration and molar ratios (middle) and carotene concentration (right) from pure fractions obtained after the flotation gradient of the chlorosomes from *Chl. phaeobacteroides* CL1401, *Chl. phaeobacteroides* 2430^T and *Chl. phaeovibroides* 2631^T. Values above the bars in the right pannel correspond to the ratios between *trans* and *cis* isomers for each carotenoid.

Pel que fa al contingut de carotenoides destaquen les diferències obtingudes entre les tres soques. A la Taula 4.8 es mostren els percentatges dels tres tipus de carotens, determinats a partir dels clorosomes purs, per a les tres soques estudiades. L'Isr fou el carotè majoritari a les dues soques de *Chl. phaeobacteroides*, mentre que per a la soca de *Chl. phaeovibroides* el carotè més abundant fou el β-Isr. Malgrat que l'Isr va ser el carotè més abundant per a les dues soques de *Chl. phaeobacteroides*, en el cas de la soca 2430^T el percentatge

d'aquest pigment respecte el total de carotens fou del 91,3 %, mentre que el mateix percentatge calculat per a la soca CL1401 fou del 43,3 %.

Taula 4.8. Abundància relativa (en %) de cada carotè en els clorosomes de les tres soques marrons estudiades.

Table 4.8. Relative abundance (in %) of each carotene in chlorosomes of the three studied brown cloured strains.

Carotenoide	CL1401	2430 ^T	2631 ^T
Isr	43,3	91,3	34,7
β-Isr	39,6	7,8	58,8
β-Car	17,1	0,9	6,5

Pel que fa a les relacions *trans/cis* dels carotenoides s'observa, en les tres soques, una disminució d'aquestes relacions en els clorosomes purs (Figura 4.15) respecte les fraccions més pures obtingudes després del primer gradient (Panells drets, Figures 4.12–4.14), indicant una menor presència d'isòmers tipus *trans* als clorosomes obtinguts després de la flotació. L'esmentada disminució de les relacions *trans/cis* va tenir lloc en totes les soques, pels tres carotens analitzats. La disminució més aparent d'aquesta relació fou detectada pel β-carotè de *Chl. phaeobacteroides* 2430^T, que va passar del valor 4,2 (Fracció 2) al valor 0,02 als clorosomes purs.

4.2.3. Variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre procedents de mostres naturals

L'objectiu d'aquesta part del treball fou comparar les variacions en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides en una població natural de *Chl. phaeobacteroides* amb els valors d'aquestes mateixes relacions obtinguts amb cultius de laboratori (veure Apartat 4.2.1).

Les mostres analitzades es varen obtenir a l'estanyol del Vilar, localitzat a la zona lacustre de Banyoles i considerat com a meromíctic eutròfic, amb estratificació química permanent (veure Apartat 2.8).

En aquest tipus de llacs estratificats les poblacions de microorganismes fotosintètics es distribueixen en la columna d'aigua en funció dels gradients verticals de condicions fisico-químiques: intensitat i qualitat de la llum, pH, salinitat, concentració de sulfhídric i nutrients (van Gemerden i Mas, 1995). En concret les comunitats de bacteris fotosintètics solen trobar-se associades a les interfases oxigen-sulfhídric, suficientment il·luminades d'acord als seus requeriments fisiològics (Montesinos, 1981; Pfennig, 1989; Montesinos i van Gemerden, 1986).

Els diferents treballs i anàlisis realitzats amb mostres procedents de l'estanyol del Vilar revelen l'existència de dos poblacions de bacteris fotosintètics, bacteris vermells del sofre (PSB, de l'anglès *Purple Sulfur Bacteria*) representades bàsicament per espècies del gènere *Thiocystis* spp. i bacteris verds del sofre (GSB), representades com s'ha comentat per *Chlorobium phaeobacteroides*. En aquest tipus de llacs també es troben presents poblacions algals, normalment localitzades en la zona aeròbica de la columna d'aigua, just sobre la quimioclina. Aquestes poblacions algals actuen de filtre biològic modificant la qualitat de la llum que reben les poblacions bacterianes de la zona d'interfase (Montesinos *et al.*, 1983). Els perfils verticals dels paràmetres fisico-químics determinats *in situ* (Figura 4.16) van permetre localitzar la zona d'interfase oxigen-sulfhídric a l'entorn dels 6 m de fondària. Això va facilitar la localització de la zona de la columna d'aigua on es trobava la màxima abundància de bacteris fotosintètics (també anomenat *plate*) (Montesinos i van Gemerden, 1986).

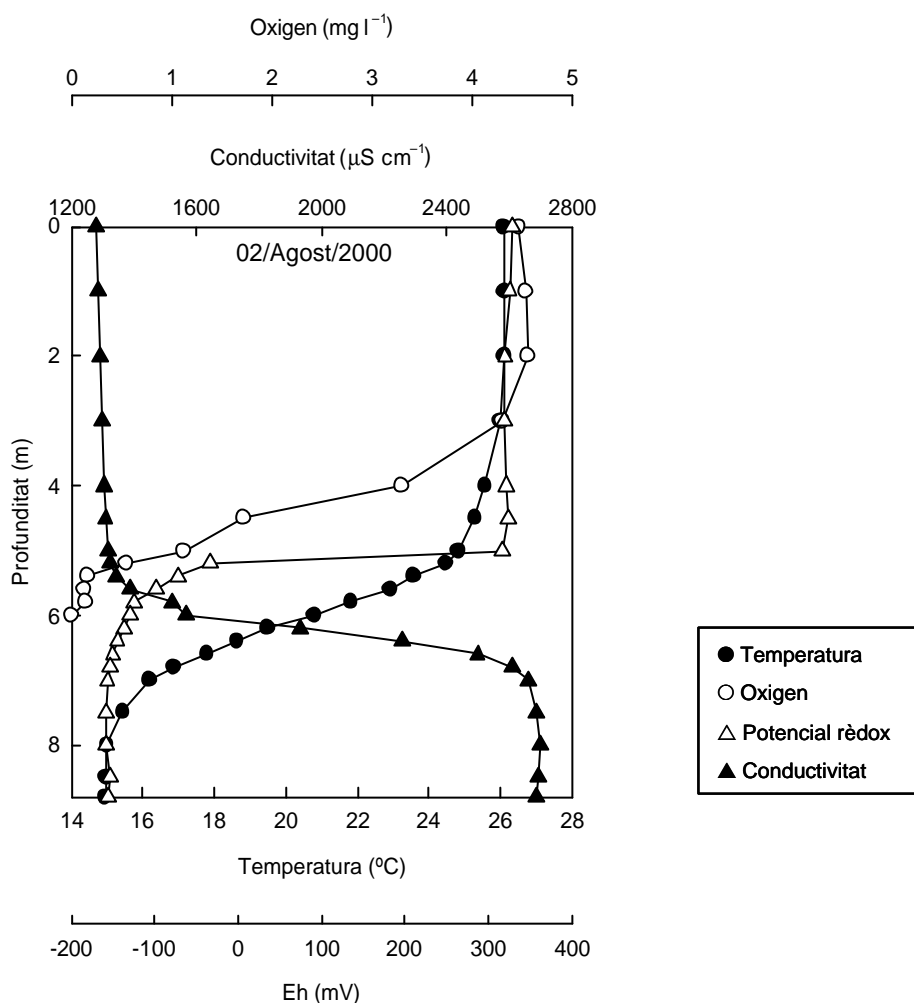


Figura 4.16. Perfils verticals dels diferents paràmetres fisico-químics a l'estanyol del Vilar durant el mostratge del 2 d'agost del 2000.

Figure 4.16. Vertical profile of the physico-chemical parameters determined in lake Vilar on August 2nd, 2000.

Tenint en compte que l'objectiu d'aquesta part del treball no va ser l'anàlisi de les variacions al llarg del temps de la composició pigmentària de la comunitat fotosintètica, el mostratge a l'estanyol del Vilar no va comprendre tot un cicle anual sinó que es va seguir la població bacteriana durant el seu creixement estacional (juny-setembre). El càlcul de les relacions molars entre pigments es va realitzar a partir del mostratge en què la població de *Chl. phaeobacteroides* estava plenament estructurada i activa (Figura 4.17). Aquests valors es van comparar amb els obtinguts en cultius de laboratori d'espècies marrons de GSB. S'ha d'esmentar també que durant finals del mes d'agost l'estanyol va estar sotmès a un fort període de pluges que pertorbaren tant l'estructura de l'estratificació de la columna

d'aigua com les pròpies poblacions de microorganismes fotosintètics objecte d'estudi. Això va provocar una forta disminució de l'abundància de les diferents poblacions que constituïen la comunitat fotosintètica. Concretament, la concentració de BCl *e* va passar d'un valor a l'entorn de 100 µg/l el 17 de juliol als 30 µg/l el dia 2 d'agost.

Tot i que la mesura dels paràmetres fisico-químics *in situ* permet localitzar en la columna d'aigua la zona d'interfase oxico-anòxica la localització precisa del *plate*, la zona de màxima abundància de microorganismes, tant per a la població de GSB (Figura 4.18) com per a la de PSB (Figura 4.19) només va ser possible amb el recompte de cèl·lules mitjançant citometria de flux. En el cas dels GSB la zona de màxima abundància es va situar a l'entorn del 6 m de profunditat durant tots els mostratges, mentre que en el cas dels PSB el *plate* es localitzava uns pocs cm per sobre aquesta fondària.

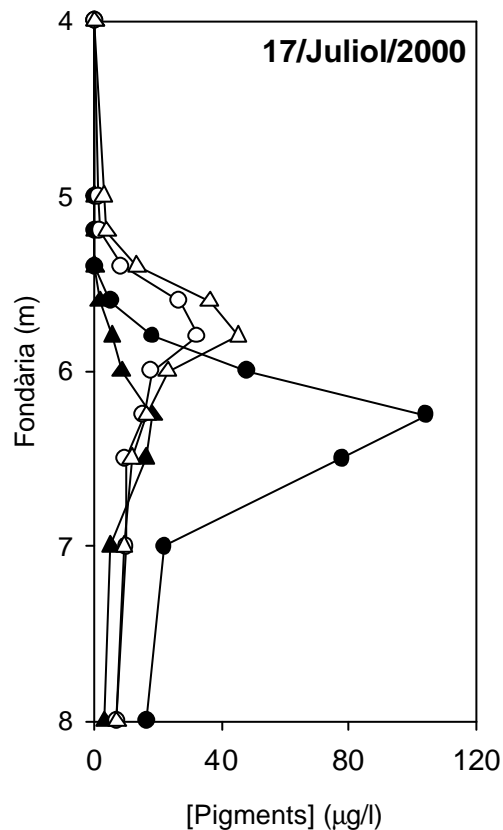


Figura 4.17. Perfil vertical dels pigments fotosintètics (en µg/l) detectats a l'estanyol del Vilar el 17 de juliol del 2000. Llegenda: (●) BCl *e*, (○) BCl *a*, (▲) Isr + β-Isr i (△) Okn.

Figure 4.17. Vertical distribution of the photosynthetic pigments (µg/l) in lake Vilar on July, 17th, 2000. Legend: (●) BCl *e*, (○) BCl *a*, (▲) Isr + β-Isr and (△) Okn.

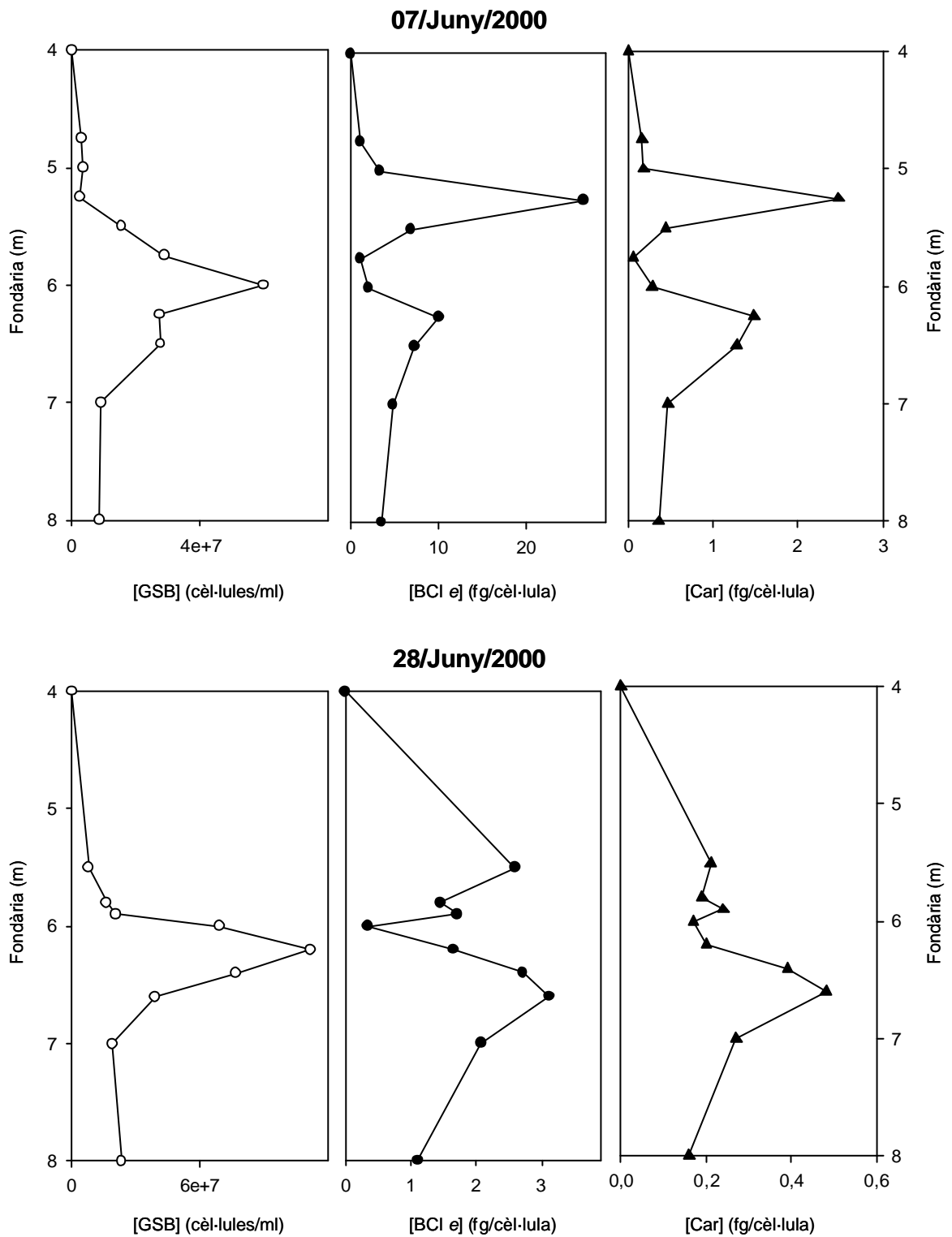


Figura 4.18. Perfils verticals del nombre dels GSB (cèl·lules/ml) i del contingut específic de BChl *e* i de carotenoides (Isr + β -Isr) (fg de pigment/cèl·lula) pels mostratges de Juny.

Figure 4.18. Vertical distribution of GSB (cells/ml) and the specific content of BChl *e* and carotenoids (Isr + β -Isr) (fg pigment/cell) for June samplings.

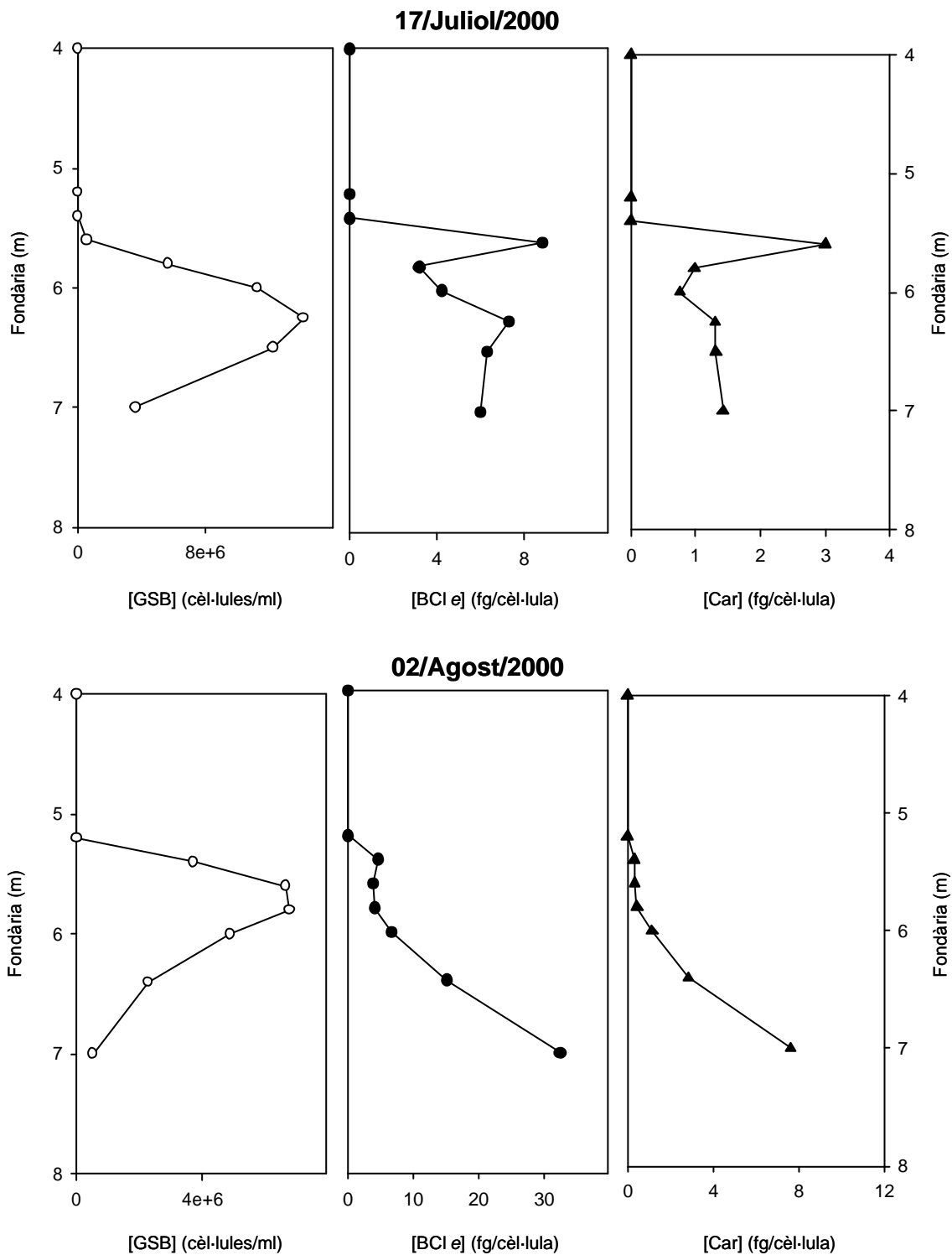


Figura 4.18 (continuació). Perfils verticals dels GSB (cèl·lules/ml) i del contingut específic de BChl e i de carotenoides (Isr + β -Isr) (fg de pigment/cèl·lula) pels mostratges de Juliol i Agost.

Figure 4.18 (continuation). Vertical distribution of GSB (cells/ml) and the specific content of BChl e and carotenoids (Isr + β -Isr) (fg pigment/cell) for July and August samplings.

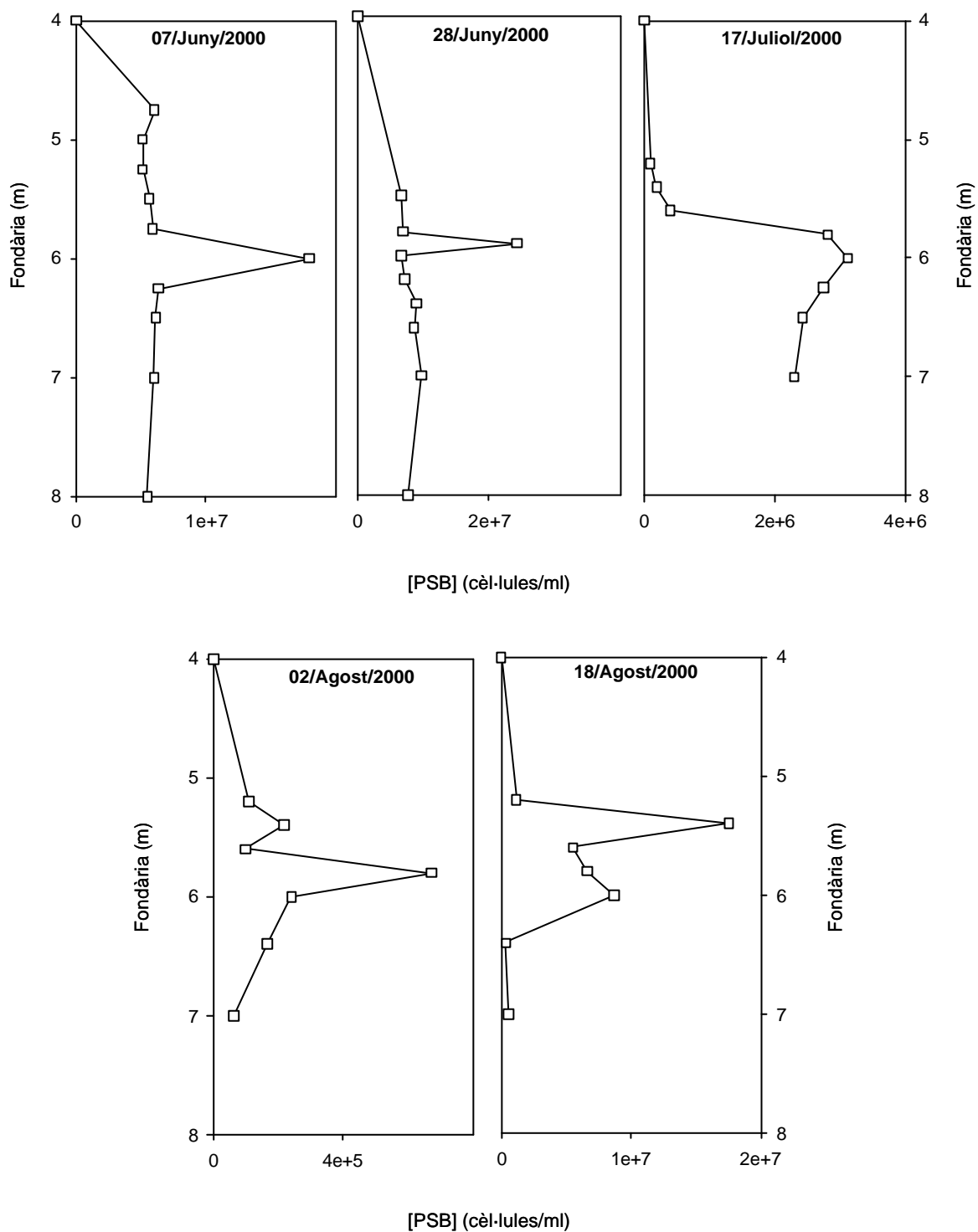


Figura 4.19. Perfils verticals dels PSB (cèl·lules/ml) durant el període estudiat a l'estanyol del Vilar.

Figure 4.19. Vertical distribution of PSB (cells/ml) during the study period in lake Vilar.

Els màxims continguts específics per a la BCl *e* i els carotenoides (Isr + β -Isr) dels GSB es van trobar sempre per sobre del màxim d'abundància cel·lular i en alguns casos (7/June i 17/Juliol) aquests màxims van coincidir amb el *plate* dels PSB (Figures 4.18 i 4.19). Aquesta observació suggereix que les cèl·lules de la part superior de la població de GSB (*top*) tenien un contingut de BCl *e* i carotenoides superior al de les zones inferiors (*plate* i *bottom*), segurament en resposta a la limitació lumínica imposada pel filtre biològic de poblacions de PSB localitzades per sobre. D'altra banda i tal i com s'aprecia a la Figura 4.20 les dues poblacions de bacteris fotosintètics van seguir una evolució paral·lela durant el període estudiat.

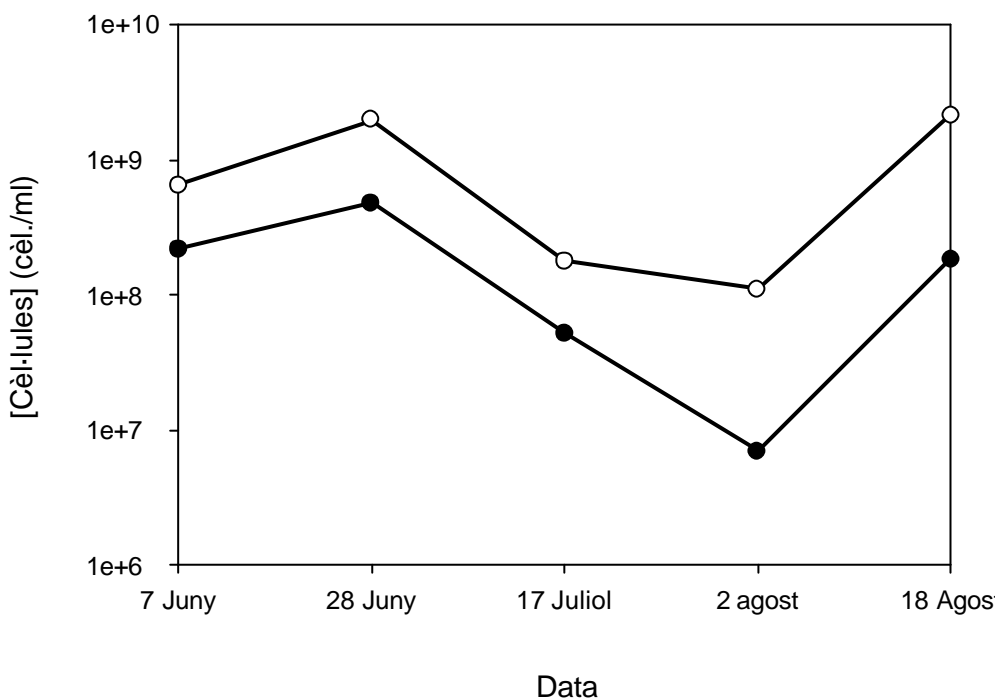


Figura 4.20. Concentració de cèl·lules a la fondària del *plate*: (○) GSB i (●) PSB durant el període estudiat a l'estanyol Vilar.

Figure 4.20. Cells concentration in the *plate*: (○) GSB and (●) PSB during the studied period in lake Vilar.

Pel que fa a les relacions *trans/cis* dels carotenoides dels GSB es va analitzar tant la seva variació en fondària per a cada mostratge, com l'evolució d'aquesta variació durant el període estudiat. En ambdós casos destaca la uniformitat en els valors obtinguts, que no van variar pràcticament en els quatre mesos de mostratge. Els valors promig calculats per a les relacions Isr *trans/cis* i β -Isr *trans/cis* es mostren a les Taules 4.9 i 4.10, respectivament.

Taula 4.9. Valors promig de les relacions molars *trans/cis* calculades per l'Isr al llarg del període estudiat per a tres fondàries diferents: la més superficial on es va detectar Isr (*top*), la fondària del *plate* de GSB (a l'entorn dels 6 m) i la més profunda (*bottom*).

Table 4.9. Average values of trans/cis ratio calculated for the Isr at three different depths: top, plate and bottom during the study.

Data	Top	Plate	Bottom
7-Juny	1,8	2,0	1,6
28-Juny	3,0	1,6	1,9
17-Juliol	2,0	2,0	2,1
2-Agost	1,3	1,6	1,9
18-Agost	2,2	1,5	1,9
8-Setembre	1,2	1,7	1,8
Mitjana	1,9 ± 0,66	1,7 ± 0,22	1,9 ± 0,16

Taula 4.10. Valors promig de les relacions molars *trans/cis* calculades pel β -Isr al llarg del període estudiat per a tres fondàries diferents: la més superficial on es va detectar Isr (*top*), la fondària del *plate* de GSB (a l'entorn dels 6 m) i la més profunda (*bottom*).

Table 4.10. Average values of trans/cis ratio calculated for the β -Isr at three different depths: top, plate and bottom during the study.

Data	Top	Plate	Bottom
7-Juny	2,1	1,7	1,8
28-Juny	2,0	2,0	1,9
17-Juliol	1,9	2,2	2,3
2-Agost	1,7	1,8	2,1
18-Agost	1,6	1,6	2,4
8-Setembre	2,5	1,7	1,9
Mitjana	2,0 ± 0,32	1,8 ± 0,22	2,1 ± 0,24

A més de les relacions *trans/cis* calculades per l'Isr i el β -Isr, també es va determinar la proporció entre ambdós. Els valors promig obtinguts per a aquest quocient es mostren a la Taula 4.11 i curiosament, foren 3 vegades superiors als valors obtinguts al laboratori amb cultius purs d'espècies marrons de GSB (veure Apartat 4.2.1.1).

Taula 4.11. Valors promig de la relació Isr/ β -Isr al llarg del període estudiat per a tres fondàries diferents: la més superficial on es va detectar Isr (*top*), la fondària del *plate* de GSB (a l'entorn dels 6 m) i la més profunda on es va detectar Isr (*bottom*).

Table 4.11. Average values of Isr/ β -Isr ratio calculated during the studied period in three different depths: top, plate and bottom.

Data	Top	Plate	Bottom
7-Juny	7,4	4,9	3,9
28-Juny	6,0	6,0	4,3
17-Juliol	7,1	5,8	5,2
2-Agost	2,7	4,5	5,6
18-Agost	1,9	1,9	4,8
8-Setembre	4,9	4,4	5,4
Mitjana	5,4 \pm 2,25	4,6 \pm 1,47	4,9 \pm 0,66

Finalment, en relació als carotenoides dels GSB també es va fer un seguiment de la seva relació amb la BCl *e* al llarg del període d'estudi (Taula 4.12). Els valors promig obtinguts per a aquestes relacions es van comparar amb els valors calculats pels cultius marrons de GSB tal i com es discuteix més endavant (Apartat 4.3.3).

Taula 4.12. Valors promig de la relació BCl e/Car al llarg del període estudiat per a tres fondàries diferents: la més superficial (*top*), la fondària del *plate* de GSB (a l'entorn dels 6 m) i la més profunda (*bottom*).

Table 4.12. Average values of BCl e/Car ratio calculated during the studied period in three different depths: *top*, *plate* and *bottom*.

Data	Top	Plate	Bottom
7-Juny	6,4	7,3	10,3
28-Juny	11,9	8,4	7,6
17-Juliol	3,0	5,6	4,3
2-Agost	14,5	8,8	4,3
18-Agost	8,8	6,1	4,7
8-Setembre	13,2	13,6	6,4
Mitjana	9,6 ± 4,39	8,3 ± 2,88	6,7 ± 2,38

4.3. Discussió

4.3.1. Adaptació a diferents condicions d'il·luminació i dinàmica de síntesi dels pigments fotosintètics en Bacteris Verds del Sofre

L'estudi de la dinàmica de síntesi dels diferents pigments fotosintètics durant el creixement a diferents condicions d'il·luminació ha permès aprofundir en qüestions relacionades amb l'adaptació de l'aparell fotosintètic dels GSB. El més interessant en aquest estudi ha estat la possibilitat d'analitzar amb detall els canvis quantitius i qualitius dels diferents carotenoides i també el monitoritzar els canvis en el nombre de centres de reacció (CR), establint estequiometries en relació a aquests complexos per clorosoma i d'aquests últims per cèl·lula.

4.3.1.1. Dinàmica de síntesi durant el creixement

Per tal de comparar les adaptacions pigmentàries de les espècies de GSB estudiades a diferents condicions lumíniques, els cultius es van incubar a dos tractaments: un a 100

$\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensitat saturant) i l'altra a $1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sota ambdues condicions l'aparell fotosintètic d'aquests bacteris necessita una adaptació ja sigui qualitativa o quantitativa per tal d'adequar-se a les condicions lumíniques a les quals són exposats.

Adaptacions a baixes intensitats de llum

Pel que fa a l'adaptació a baixes intensitats de llum cal tenir present que aquesta ha estat àmpliament estudiada per a diferents autors. Basant-nos en aquests resultats previs (Broch-Due *et al.*, 1978; Fuhrmann *et al.*, 1993; Borrego i Garcia-Gil, 1995) hem assumit que l'augment en la síntesi de pigments, sobretot pel que fa a l'antena, respon a la necessitat d'afavorir la captació de la poca llum incident sota condicions limitants de llum. En el cas que ens ocupa, l'adaptació s'ha donat bàsicament per un canvi quantitatiu, consistent en augmentar la síntesi de pigments antena. En cap de les soques estudiades aquest increment en el nombre de pigments ha anat acompanyat del rearranjament d'homòlegs. Aquest fet es deu a que aquesta estratègia és només observable a intensitats crítiques de llum ($<1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Borrego, 1996).

El contingut de carotenoides, a diferència de les BCl's, fou inferior a baixa intensitat de llum respecte condicions saturants. Sota aquestes condicions d'alta intensitat lumínica el contingut de carotenoides és més elevat per poder dur a terme la fotoprotecció de la BCl *a* de la làmina basal. Malgrat que en condicions limitants semblaria que aquesta funció fotoprotectora no és necessària, la relació d'aquests pigments amb la BCl *a* de la làmina basal també és suficient per garantir la protecció d'aquesta. De totes maneres, tot i que la funció fotoprotectora sigui possible per ambdós tractaments lumínics, cal plantejar-se si la disminució en el contingut de carotenoides a baixa intensitat de llum pot portar a conseqüències sobre l'estructura dels propis clorosomes. La inhibició selectiva de carotenoides (Arellano *et al.*, 2000a) provoca una alteració notable en l'estructura de la làmina basal dels clorosomes, tot i que per a les soques estudiades la disminució del contingut de carotenoides estimada a $1 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (que fou del 90 % del total) és inferior a la inhibició obtinguda tractant els clorosomes amb hidroxibifenil. El descens de la relació Car/BCl *a* de la làmina basal és a l'entorn d'un 50 % en relació al valor de la mateixa relació sota condicions saturants, amb l'excepció de *Prosthecochloris aestuarii* (Taula 4.13) (veure apartat següent).

Adaptacions a altes intensitats de llum

L'adaptació a condicions saturants de llum sobretot a les dues espècies verdes estudiades, es va donar en dues etapes diferenciades (Figura 4.4). La primera va consistir en un desajust entre la divisió cel·lular i la síntesi de pigments. La disminució inicial observada en el contingut específic de pigments implica que en poc més de 10 h (temps de generació promig calculat per a les espècies verdes estudiades) la població es va duplicar sense que es donés una síntesi neta de pigments. Tenint en compte que els cultius es trobaven sota condicions saturants de llum, el contingut inicial de pigments semblaria doncs suficient per garantir la viabilitat del cultiu en aquestes condicions. La segona etapa va consistir en un augment en el contingut específic de pigments fins que aquest s'estabilitza.

Per a les soques marrons aquesta estratègia en dues etapes no fou tan evident. Després de 20 h d'incubació a $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (temps de generació calculat per a les soques marrons estudiades) el contingut específic de pigments, sobretot de carotenoides, es va doblar. De fet, la resposta més notable davant les intensitats elevades de llum, per a totes les espècies, fou l'increment en el contingut de carotenoides juntament amb l'augment de la relació entre aquests pigments i la BCl *a* de la làmina basal clorosòmica, la qual cosa aporta una evidència més de la funció fotoprotectora dels carotenoides en aquestes condicions de llum. Això contrasta amb els canvis observats en aquesta relació en condicions de limitació lumínica, sobretot en espècies marrons i també en el cas de *Chl. limicola*, per a les quals aquesta relació disminueix (Taula 4.13). El fet que en *Prosthecochloris aestuarii* la relació Car/BCl *a* de la làmina basal es mantingués uniforme sota ambdues condicions podria relacionar-se amb les característiques morfològiques d'aquest bacteri, adaptat a ambients en els quals les condicions d'il·luminació són realment limitants (a l'entorn de $0,5 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Pringault *et al.*, 1998). Sota limitació lumínica, doncs, aquesta espècie característica de tapets microbians és capaç d'augmentar la longitud de les prosteques i disposar d'una major superfície per donar cabuda a més clorosomes, els quals no experimentarien canvis en el contingut de pigments (Guyoneaud *et al.*, 2001), motiu pel qual la relació estudiada (Car/BCl *a* de la làmina basal) presenta valors equivalents a les dues intensitats de llum.

D'altra banda, estudis amb *Chl. phaeobacteroides* CL1401 confirmen que la inhibició en la síntesi de carotenoides afecta a l'organització dels agregats de BCl *e* (Arellano *et al.*, 2000a). Tot i així, els carotenoides no intervenen en la fotoprotecció d'aquests agregats

supramoleculars, ja que aquests últims poden per si mateixos extingir l'excés d'excitació que els hi arriba i per tant protegir-se. No obstant els carotenoides si són indispensables alhora de protegir la BCl *a* davant un excés d'excitació. Per aquest motiu s'ha suggerit que han de trobar-se en contacte íntim amb la BCl *a* de la làmina basal ja que és aquí on la seva funció fotoprotectora és realment necessària. Darreres investigacions amb *Chloroflexus aurantiacus* confirmen aquesta localització (Montaño *et al.*, 2000). Aquesta funció protectora, aparentment dispensable sota condicions limitants de llum, es podria portar a terme encara que el contingut de carotenoides disminuís dràsticament ja que una sola molècula de carotenoide és suficient per protegir una molècula de BCl *a* (Arellano *et al.*, 2000b). Aquesta estequiometria, tal i com pot observar-se a la Taula 4.13 és àmpliament superada per a totes les espècies estudiades i per a ambdues condicions d'il·luminació.

Taula 4.13. Relació molar (mitjana \pm desviació típica) entre els carotenoides i la BCl *a* de la làmina basal (1 % de la BCl antena, Gerola i Olson, 1986; van Noort *et al.*, 1994) a les quatre soques estudiades a 100 i 1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Table 4.13. Molar ratio (mean \pm standard deviation) between carotenoids and BChl *a* from baseplate (1 % of antenna BChl, Gerola and Olson, 1986; van Noort *et al.*, 1994) of the four strains at 100 and 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CL1401	13,8 \pm 0,79	6,2 \pm 0,51
UdG6030	13,2 \pm 1,96	7,1 \pm 0,07
UdG6038	5,0 \pm 0,07	1,2 \pm 0,00
CE2404	6,9 \pm 0,15	6,3 \pm 0,30

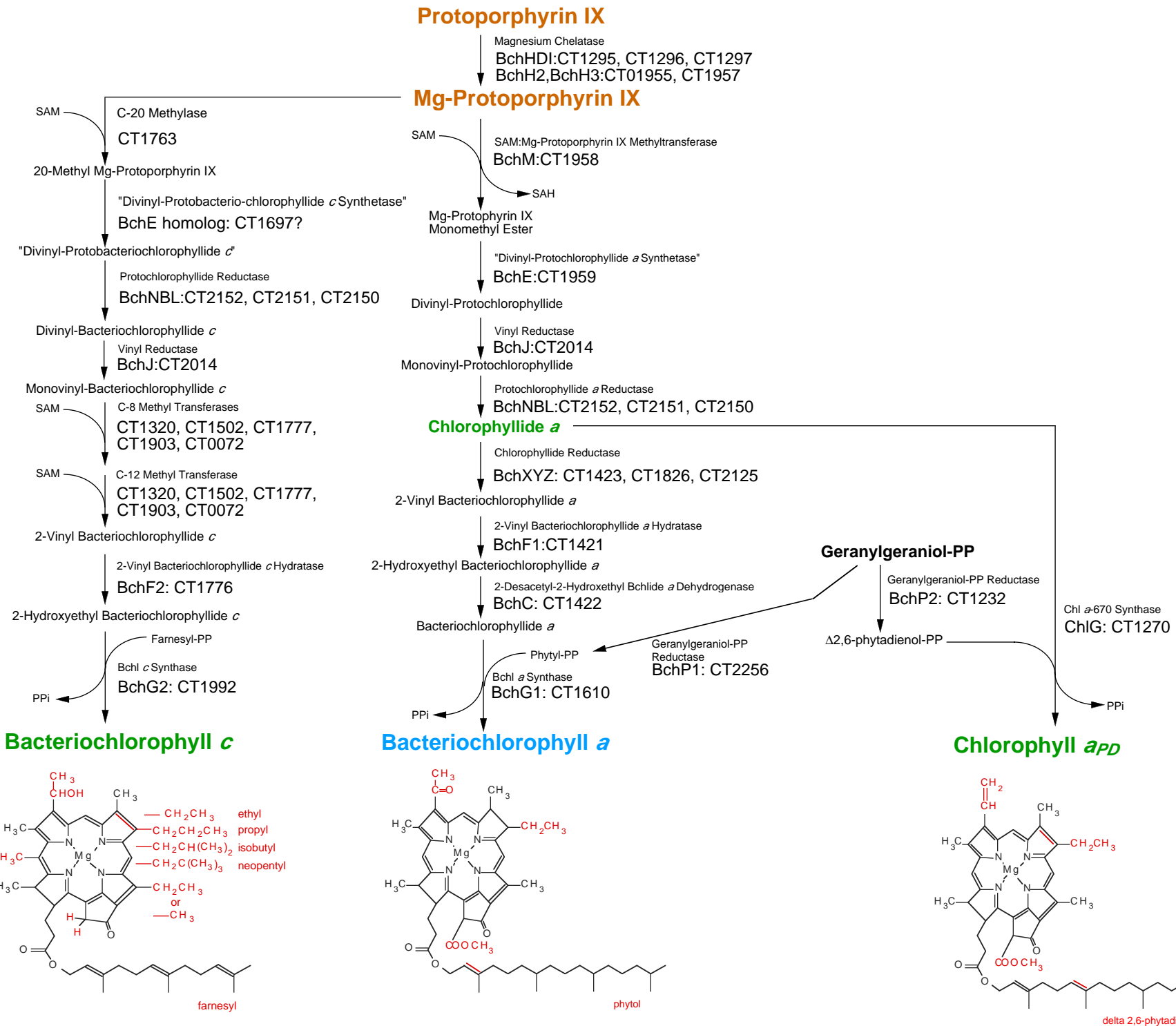
Dinàmica de síntesi de carotenoides

Encara que les relacions determinades entre la BCl *e* i els carotenoides no són suficients per explicar una dinàmica de síntesi dels carotenoides en relació als pigments antena, permeten deduir que la síntesi d'aquests pigments al llarg del creixement pot donar-se simultàniament a la síntesi de BChl. De fet un dels precursors en la síntesi de carotenoides (el geranilgeraniol pirofosfat, GGPP) és necessari per sintetitzar els alcohols

de cadena llarga que s'esterifiquen a les molècules de BCl, com poden ser el farnesol, el geranil-geraniol, l'estearol o el fitol. La síntesi de fitol, per exemple (cadena de 20 carbonis) requereix de la presència del GGPP (veure Figura 4.21 i Figura 5.1 del Capítol 5). El fitol és l'alcohol que es troba esterificat en alguns homòlegs de BCl antena i també en la BCl *a*. Les relacions establertes entre aquests homòlegs i els carotenoides, al igual que amb la BCl antena total i la BCl *e* esterificada amb farnesol, és també linial, la qual cosa intueix l'esmentada co-regulació en la síntesi d'aquests grups de pigments (Figures 4.6–4.9).

Figura 4.21 (pàgina següent). Ruta de síntesi de les molècules de BCl per a l'espècie verda de GSB *Chl. tepidum* (Eisen *et al.*, 2002).

Figure 4.21 (next page). Predicted biosynthetic pathway for BChl molecules in green-coloured GSB *Chl. tepidum* (Eisen *et al.*, 2002).



4.3.1.2. Estequiometria de l'aparell fotosintètic

Malgrat l'esmentat increment del contingut específic de pigments antena, i el de CR, a baixa intensitat de llum (apartat anterior), el quocient entre l'antena i els CR es va mantenir relativament constant per a gairebé totes les soques estudiades. En el cas de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 les relacions entre l'antena i la BCl *a*, i els CR, respectivament, experimentaren una davallada a baixa intensitat lumínica. La relació BCl *e*/CR va disminuir aproximadament un 20 %, mentre que la mateixa relació amb la BCl *a* ho feu en gairebé un 30 %. Això sembla indicar que les espècies estudiades, sota condicions limitants d'il·luminació, s'han adaptat fisiològicament augmentant el nombre de clorosomes, mantenint però la seva composició pigmentària, que seria igual o pràcticament invariable a la que trobem a $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Aquesta estratègia, consistent en augmentar el nombre d'unitats fotosintètiques a baixes intensitats de llum, es tradueix en un increment de l'activitat fotosintètica (Sánchez *et al.*, 1998) i ja ha estat prèviament estudiada tant per a espècies marrons com verdes de GSB (van Gemerden i Mas, 1995). A més, la uniformitat de la relació Antena/CR permet deduir que cada CR pot controlar un nombre fix de molècules antena independentment de la intensitat de llum a la que es dona el creixement. Per a totes les soques estudiades aproximadament unes 2.500 molècules de BCl antena serien controlades per un únic CR.

La relació entre els Car i els CR, a diferència del que succeeix amb el quocient Antena/CR, va variar en funció del tractament lumínic. En el cas de *Chl. phaeobacteroides* CL1401, per exemple, a alta intensitat de llum, per cada 2.000 molècules antena n'hi haurien 300 de carotenoides, tot sota el control d'un únic CR, mentre que a baixa intensitat de llum hi hauria el mateix nombre de molècules antena però 3 vegades menys carotenoides per CR (100). El quocient BCl *a*/CR, en canvi, es mantindria gairebé constant en tots els casos, independentment a les condicions lumíniques, indicant que els CR controlarien no tan sols un nombre fix de molècules antena, sinó també de BCl *a*. A alta intensitat de llum, l'increment de carotenoides per CR reforça la idea de que aquests pigments portarien a terme una funció fotoprotectora, motiu pel qual la relació carotenoides/BCl *a* també va ser més elevada a $100 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la majoria de soques estudiades (Taules 4.1 i 4.2. Apartat 4.2.1).

4.3.1.3. Estimació del nombre de centres de reacció per clorosoma

El càlcul del nombre de CR a partir de la quantificació de la BCl₆₆₃ ha permès l'estimació del nombre de CR presents per clorosoma. L'esmentat quocient va ser determinat a partir de tres aproximacions diferents. Les dues primeres es van realitzar a partir de dades teòriques utilitzant valors de relacions estequiomètriques i mesures biomètriques presents a la bibliografia. La tercera aproximació es va dur a terme a partir de les dades experimentals obtingudes en aquest treball de recerca (Apartat 4.2.1.2 del present capítol). Aquesta darrera estimació també va permetre analitzar les variacions del quocient CR/clorosoma en funció de la intensitat lumínica.

Els càlculs es realitzaren utilitzant valors mínims i màxims, tant de les relacions estequiomètriques com de les mesures morfomètriques, amb l'objectiu d'obtenir un interval de la relació objecte d'estudi per a cadascuna de les tres aproximacions. Les dades obtingudes de la bibliografia foren valors mitjans entre el treball de revisió dels clorosomes dels bacteris verds fotosintètics (Olson, 1998) i els valors determinats mitjançant microscopia de força atòmica (MFA) per Martínez-Planells *et al.* (2002).

Aproximació estequiomètrica

Els càlculs realitzats a partir de relacions estequiomètriques presents a la bibliografia han tingut en compte les dades següents:

- Es va assumir que un clorosoma conté entre 100.000–250.000 molècules de BCl antena per clorosoma (Martínez-Planells *et al.*, 2002).
- Que el percentatge total de BCl *a* d'una cèl·lula és del 3 %, respecte el contingut total de BCl antena.
- Que d'aquest 3 %, un 1% correspondria a la BCl *a* present a la làmina basal i el 2 % restant faria referència a la BCl *a* associada als CR i a les proteïnes FMO (Gerola i Olson, 1986; van Noort *et al.*, 1994).

Així un clorosoma amb 100.000–250.000 molècules de BCl antena, tindria 3.000 i 7.500 molècules de BCl *a*. D'aquestes, entre 1.000 i 2.500 serien les molècules de BCl *a* de la làmina basal, mentre que les 2.000–5.000 restants es trobarien associades als CR i proteïnes FMO.

D'altra banda, considerant un bloc funcional de 2 FMO/CR, i tenint en compte que cada monòmer de FMO s'associa a 7 molècules de BCl *a*, tenim que 42 molècules de BCl *a* s'associen a 2 proteïnes FMO (21 per cada trímer). Si a aquestes 42 molècules s'hi sumen les 16 presents per CR (Hauska *et al.*, 2001), la suma dóna un total de 58 molècules de BCl *a* per a cada bloc funcional (1CR+2FMO). Dividint les 2.000–5.000 molècules de BCl *a* associades als CR+FMO de les unitats fotosintètiques entre les molècules de BCl *a* d'un bloc funcional (58), obtenim un valor a l'entorn dels 35–86 CR/clorosoma. Assumint un valor intermedi de 175.000 molècules de BCl antena/clorosoma la relació seria d'uns 60 CR/clorosoma. S'ha de tenir present que aquests valors són calculats en funció d'uns percentatges que possiblement no es mantenen a totes les soques de GSB, i que fins i tot varien en funció de les condicions de creixement, però que permeten tenir una estima del nombre màxim de CR que pot contenir un clorosoma.

Aproximació morfològica

En aquest cas es van utilitzar valors referents a l'àrea dels clorosomes i a la dels complexos CR. Dividint el valor de l'àrea del clorosoma entre l'àrea del CR va ser possible conèixer quants CR poden ensamblar-se, com a màxim, a cada clorosoma.

L'àrea del clorosoma es va calcular coneixent les dades d'Olson (1998) i les dades obtingudes mitjançant AFM (microscopia de força atòmica) per Martínez-Planells *et al.* (2002) (veure apartat a i Figura 4.22). A partir d'aquests dos treballs es van escollir els valors de longitud i amplada que s'han utilitzat pel càlcul de la superfície del clorosoma, concretament de la làmina basal (Taula 4.14). L'àrea del CR (veure apartat b) es va calcular a partir de les mesures determinades per Rémigy *et al.* (2002) mitjançant microscopia electrònica de transmissió. En aquest cas es va assumir que el CR com a unitat funcional, unit a 2 proteïnes FMO, es pot ajustar a un rectangle més que no pas a una el·lipse (veure apartat b i Figura 4.23)

- a) L'àrea del clorosoma en contacte amb la membrana es va calcular utilitzant la fórmula: $A_C = (a \times b \times \pi)$ on,

a = meitat de la longitud de l'eix major de l'el·lipse

b = meitat de la longitud de l'eix menor de l'el·lipse

Aquests càlculs es van fer utilitzant les dades d'Olson (1998) i de Martínez-Planells *et al.* (2002). Els resultats es mostren a la Taula 4.14. A la Figura 4.22 s'esquematitza l'aproximació de la superfície de la làmina basal del clorosoma a una estructura el·lipsoidal.

Taula 4.14. Valors d'amplada i llargada utilitzats per calcular la superfície de la làmina basal del clorosoma estimada com una el·lipse (Figura 4.22). Valors d'acord a Olson (1998) i Martínez-Planells *et al.* (2002).

Table 4.14. Width and length values used to estimate the area of the chlorosome baseplate. Values according to Olson (1998) and Martínez-Planells *et al.* (2002).

	Amplada (nm)	Llargada (nm)	$A = \pi \times a \times b$ (nm ²)
Mínim	40	100	3140
Mitjana	70	150	8250
Màxim	100	200	15.700

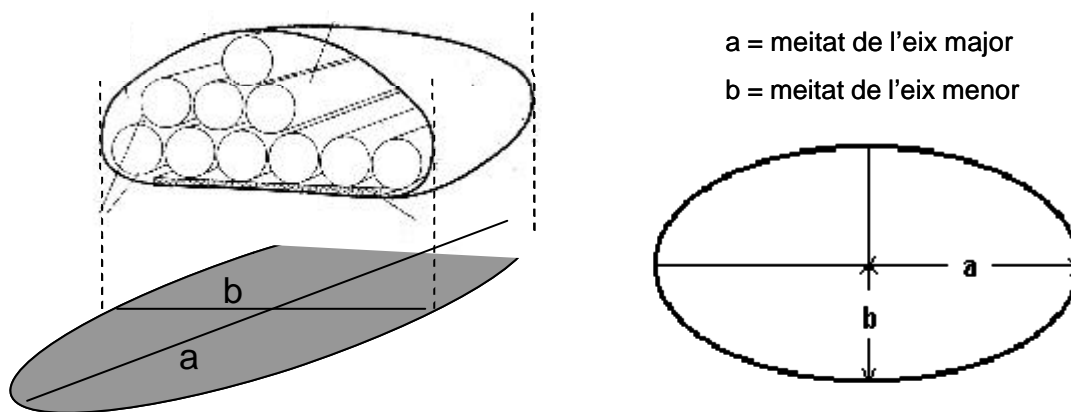


Figura 4.22. Esquema d'un clorosoma i de la superfície el·lipsoidal de la corresponent làmina basal.

Figure 4.22. Chlorosome diagram where the ellipsoidal morphology of the baseplate is showed.

- b) La superfície que ocupa el CR es va calcular considerant el bloc funcional (1CR + 2FMO) com si fos un rectangle, però tenint en compte que la projecció d'1 trímer de FMO sobre el CR, cau bàsicament sobre el mateix CR (Figura 4.23 i 4.24). Això significa que l'àrea sobre el pla de la membrana del complex 1CR + 2FMO és pràcticament equivalent al CR sense un dels complexos proteics units (Figura 4.24. Rémigy *et al.*, 2002). D'aquesta manera l'àrea del bloc funcional calculada fou de 152 nm^2 (19×8) (Rémigy *et al.*, 2002).

A la Taula 4.15 es recullen els valors de la relació CR/clorosoma obtinguts després de realitzar els quocients entre la superfície del clorosoma (Taula 4.14) i la superfície del CR. Com a partir de l'estimació estequiomètrica exposada anteriorment, aquests valors farien referència a nombres màxims, és a dir, implicarien que tota la superfície de la làmina basal es troba ocupada per CR.

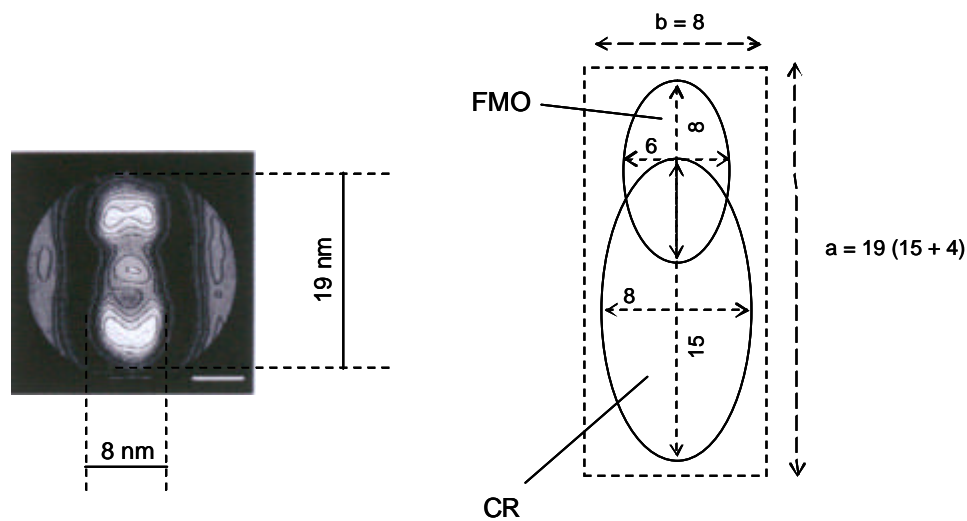


Figura 4.23. La imatge de l'esquerra correspon a una projecció obtinguda del complex CR + FMO (visió en planta) d'acord a Rémigy *et al.* (2002). La imatge de la dreta correspon a l'esquema de la unitat funcional (CR + FMO) en planta amb els corresponents valors (en nm) utilitzats pels càlculs.

Figure 4.23. Left: projection of the RC + FMO complex (top view) (Rémigy *et al.*, 2002). Right: schematic view of the functional complex (CR + FMO) and the values for the calculation (in nm).

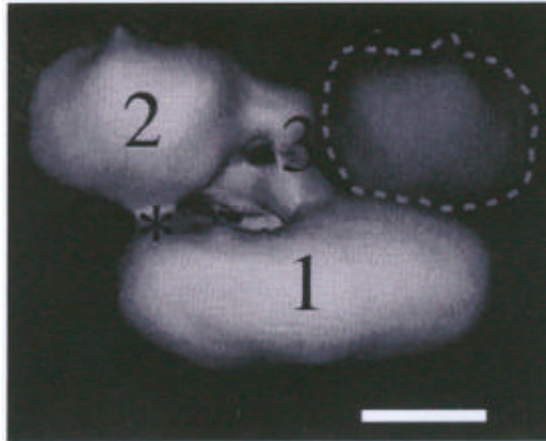


Figura 4.24. Reconstrucció en 3D del complex FMO-CR (Rémigy *et al.*, 1999; 2002). Identificació: (1) Nucli homodimèric del CR, format a partir de 2 proteïnes PscA i la subunitat PscC; (2) trímer FMO; (3) proteïna PscB, en contacte amb la regió 1, i proteïna PscD, en contacte amb la regió 2 i (*) possible àrea de transferència d'energia. La línia discontinua engloba l'àrea ocupada pel trímer de FMO que es perd en el procés de purificació.

Figure 4.24. 3D reconstruction of the FMO-RC complex (Rémigy *et al.*, 1999; 2002). Identification: (1) homodimeric core composed of 2 PscA proteins together with the PscC subunit; (2) FMO trimer; (3) PscB protein, closed to region 1, and PscD protein, closed to region 2 and (*) possible energy transfer area. The dashed-line shows the location of the FMO trimer lost during the purification of the complex.

Taula 4.15. Nombre estimat de centres de reacció per clorosoma a partir del quocient entre l'àrea superficial del clorosoma (A_C) i l'àrea superficial del CR (A_{CR}).

Table 4.15. Number of reaction centers per chlorosome calculated from the ratio between the chlorosome area (A_C) and the RC area (A_{CR}).

$A_C = \pi \times a \times b \text{ (nm}^2\text{)}$	$A_{CR} = a \times b \text{ (nm}^2\text{)}$	CR/clorosma
3140	152	21
8250	152	54
15.700	152	103

Aproximació experimental

Per calcular el nombre de centres de reacció per clorosoma a partir de les dades obtingudes experimentalment es van haver d'assumir les següents estequiometries. D'una banda, que cada clorosoma conté entre 100.000–250.000 molècules de BCl antena, i de l'altra que a cada CR s'associen 4 molècules d'acceptor primari (BCl₆₆₃). Del quocient entre les molècules de BCl antena i el nombre de molècules de BCl antena per clorosoma (100.000–250.000) es va obtenir el nombre de clorosomes. El nombre de CR es va estimar a partir del quocient entre les molècules totals d'acceptor primari (BCl₆₆₃) i les molècules de BCl₆₆₃ presents a un CR (4).

A les Taules 4.16–4.17 es recullen els valors de la relació analitzada per a les quatre soques de GSB estudiades, les quals foren incubades a dues intensitats lumíniques diferents (veure Apartat 4.2.1). Amb l'excepció de *Chl. phaeobacteroides* UdG6030 s'observa que el nombre de CR/clorosoma fou més elevat quan les cèl·lules creixien sota limitació lumínica, fet que indica un augment dels CR a baixes intensitats de llum. Tenint en compte que el contingut específic de pigments antena i el de CR augmenta en aquestes condicions però que en canvi, la relació entre l'antena i els CR es manté relativament constant, es pot deduir que aquestes espècies no només augmenten els CR per clorosoma, sinó també el nombre de clorosomes (veure l'apartat anterior, 4.3.1.2).

Taula 4.16. Nombre mitjà de CR/clorosoma per a les 4 soques estudiades a la intensitat lumínica de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Es mostra la desviació típica.

Table 4.16. Mean RC/chlorosome ratio for the four strains growing at 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Standard deviation is shown.

Soques	100.000 molècules antena/clorosoma	175.000 molècules antena/clorosoma	250.000 molècules antena/clorosoma
CL1401	44,7 \pm 0,00	78,3 \pm 0,00	111,8 \pm 0,00
UdG6030	41,2 \pm 0,86	72,1 \pm 1,51	103,0 \pm 2,15
UdG6038	36,3 \pm 0,06	63,5 \pm 0,10	90,7 \pm 0,15
CE2404	35,3 \pm 0,00	61,7 \pm 0,00	88,1 \pm 0,00
Mitjana	40	70	100

Taula 4.17. Nombre mitjà de CR/clorosoma per a les 4 soques estudiades a la intensitat lumínica de 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Es mostra la desviació típica.

Table 4.17. Mean RC/chlorosome ratio for the four strains growing at 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Standard deviation is shown.

Soques	100.000 molècules antena/clorosoma	175.000 molècules antena/clorosoma	250.000 molècules antena/clorosoma
CL1401	57,7 \pm 7,34	100,9 \pm 12,85	144,2 \pm 18,36
UdG6030	31,6 \pm 2,07	55,4 \pm 3,62	79,1 \pm 5,17
UdG6038	40,0 \pm 2,47	70,0 \pm 4,33	100,0 \pm 6,19
CE2404	47,6 \pm 6,08	83,2 \pm 10,64	118,9 \pm 15,20
Mitjana	45	80	110

Cal destacar el bon ajustament obtingut entre els resultats experimentals i les estimacions teòriques. S'ha de considerar, però, que les aproximacions teòriques ofereixen valors màxims de la relació CR/clorosoma, ja que impliquen que tota la superfície de la làmina basal es troba ocupada per CR. Aquest fet, malgrat que les cadenes de transport d'electrons

poguessin ser compartides entre diferents CR (Blankenship, comunicació personal) no sembla probable que es doni degut als impediments d'espai que s'originarien. Aquesta similitud, doncs, entre els resultats experimentals i els obtinguts prèviament a partir de referències bibliogràfiques, dóna solidesa als resultats del present treball. A partir d'aquests es pot assumir que l'ordre de magnitud del nombre màxim de CR que poden ser acollits per clorosoma està a l'entorn dels 70. A més, és important destacar que aquest valor estimat, equivalent amb les tres aproximacions, és del mateix ordre de magnitud que el citat recentment per Hauska *et al.* (2001) en treballs sobre els CR en GSB (40 CR/clorosoma).

A partir d'aquest estudi podem assumir que el nombre de CR per clorosoma està en funció de les condicions lumíniques en les quals s'incuben els cultius. No obstant s'ha de tenir present que els càlculs es van realitzar assumint estequiometries fixes, com és el cas de la relació del nombre de molècules antena/clorosoma, la qual és conegut que pot variar depenent de les condicions de creixement (Borrego i Garcia-Gil, 1995; Borrego, 1996). Assumint, per tant, que aquesta estequiometria pot variar també en funció de les condicions lumíniques, el nombre de CR/clorosoma pot mostrar una major variació respecte l'obtinguda en el present treball. De totes maneres, estudis recents duts a terme amb *Chl. tepidum*, espècie verda de GSB (Montaño *et al.*, 2003) estimen que el nombre de molècules antena presents per clorosoma és a l'entorn de les 215.000, valor amb el mateix ordre de magnitud als valors obtinguts per Martínez-Planells *et al.* (2002) i que han estat els utilitzats en el present estudi.

De forma paral·lela a l'estimació morfomètrica del nombre de CR/clorosoma, també es va poder determinar el nombre màxim de clorosomes que pot contenir una cèl·lula. En aquest cas l'àrea superficial de la cèl·lula es va calcular assumint que el cos cel·lular és l'àrea d'un cilindre més la de dues mitges esferes (Figura 4.25). Les dimensions d'una cèl·lula del gènere *Chlorobium* utilitzades foren d'acord al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

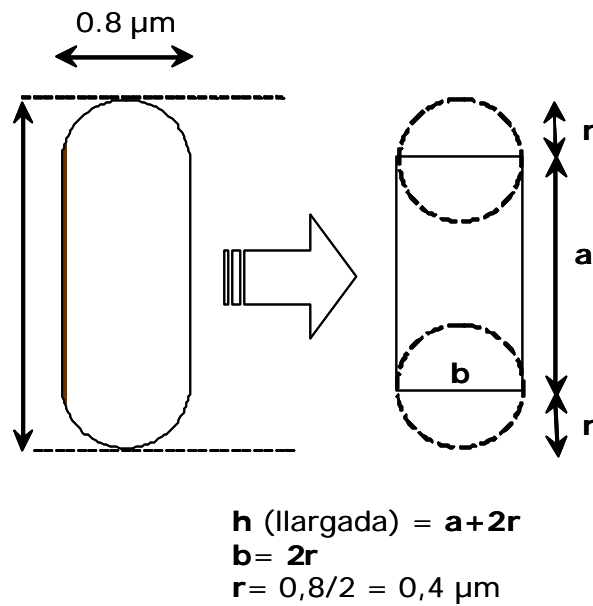


Figura 4.25. Paràmetres per estimar l'àrea superficial d'una cèl·lula, amb morfologia bacilar, com la suma de l'àrea d'un cilindre més l'àrea d'una esfera.

Figure 4.25. Cartoon where the different values to estimate the surface area of a *Chlorobium* sp. cell are shown.

Segons les dimensions assenyalades a la Figura 4.25, l'àrea superficial del cilindre (A_c) es pot obtenir a partir de la fórmula:

$$A_c = (2 \times \pi \times r) \times h \text{ on,}$$

- la primera part del producte ($2 \times \pi \times r$) fa referència al perímetre cel·lular i
- h correspondria a la longitud de la cèl·lula.

El valor obtingut per a la superfície del cilindre és d'aproximadament $3 \times 10^6 \text{ nm}^2$.

L'àrea superficial de l'esfera (A_e) es pot calcular a partir de la fórmula:

$$A_e = 4 \times \pi \times (0,4)^2$$

i tindria un valor d'uns $2 \times 10^6 \text{ nm}^2$.

L'àrea superficial de tota la cèl·lula ($A_c + A_e$) seria per tant, d'uns $5 \times 10^6 \text{ nm}^2$. El quocient entre aquest valor i el valor corresponent a la superfície de la làmina basal segons les dades mostrades a la Taula 4.15 ens donaria un nombre promig d'uns 600

clorosomes/cèl·lula. Al igual que amb la relació CR/clorosoma, els valors obtinguts fan referència al nombre màxim de clorosomes que pot contenir una cèl·lula, ja que han estat calculats considerant que tota la superfície disponible es troba ocupada pels clorosomes, quelcom que sembla improbable per problemes d'espai. Creiem que un valor d'uns 400 clorosomes per cèl·lula és el que s'ajusta més al valor real, tot i que fins al moment no disposem de dades experimentals per reforçar aquesta hipòtesi.

4.3.2. Diferències en les relacions molars *trans/cis* dels carotenoides dels clorosomes d'espècies marrons de Bacteris Verds del Sofre

Les tres soques marrons de GSB estudiades posseeixen els mateixos carotenoides: Isr, β -Isr i β -Car, tot i que a les soques de *Chl. phaeobacteroides* l'Isr fou el carotenoide majoritari, i a *Chl. phaeovibroides* ho fou el β -Isr. Això suggereix que tant l'Isr com el β -Isr poden dur a terme les mateixes funcions dins les unitats fotosintètiques dels GSB.

Com ja ha estat discutit en l'Apartat anterior la funció fotoprotectora dels carotenoides descrita per Arellano *et al.* (2000a; b) a *Chl. phaeobacteroides* CL1401, és possible amb tan sols una molècula de carotè per molècula de BCl *a*. Aquesta relació molar no es va poder determinar en el cas dels clorosomes objecte d'estudi, ja que als esmentats clorosomes la detecció de BCl *a* no va ser possible. Això va portar a pensar en pèrdues de BCl *a* ocasionades o bé durant el procés d'extracció dels pigments, o bé durant el procés d'aïllament i purificació dels clorosomes. Pel que fa a la deficient extracció de BCl *a* del clorosoma es podria pensar que la unió existent entre les molècules de BCl *a* i les proteïnes CsmA de la làmina basal dificultés l'extracció. Cal tenir en compte que els altres pigments del clorosoma no es troben units a proteïnes que puguin afectar l'extracció dels pigments. Una altra possibilitat a contemplar seria que l'espècie estudiada contingués un percentatge de BCl *a* a la làmina basal més baix del què ha estat determinat per a d'altres espècies de GSB (inferior a l'1 % respecte el total de BCl antena) (Gerola i Olson, 1986; van Noort *et al.*, 1994).

Pel que fa al contingut d'isòmers amb configuració *trans*, aquests són dominants respecte els isòmers *cis* als clorosomes de les tres soques estudiades. Això indicaria que els isòmers *trans* podrien ser els responsables de dur a terme les funcions fotoprotectors de la BCl *a* de la làmina basal. Tenint en compte l'estructura linial dels isòmers amb configuració *trans*

seria possible que aquestes molècules es situessin entre els elements cilíndrics de BCl o entre la pròpia làmina de BCl *a* i les proteïnes CsmA del clorosoma, on podrien dur a terme la seva funció de fotoprotecció (Arellano *et al.*, 2000a; b). Assumint, en canvi, que els isòmers amb configuració *cis* porten a terme funcions relacionades amb la fotoprotecció dels CR (Koyama i Fujii, 1999) la localització d'aquests isòmers hauria de ser més propera als CR que no pas la dels isòmers amb configuració *trans*. Les torsions a les molècules amb configuració *cis* semblarien més aptes per adequar-se a l'estructura de les proteïnes dels CR, les quals determinarien quina configuració ha de presentar el carotè per poder mantenir-se acoblat a l'estructura de les proteïnes que formen part del complex fotoquímic.

Per tal de conèixer amb precisió quin carotè i en quina configuració es troba associat a la làmina basal del clorosoma i quin, en canvi, es manté en contacte amb els CR, caldria disposar d'una banda de clorosomes lliures de BCl antena i d'altra de CR aïllats. Treballs realitzats amb *Chloroflexus aurantiacus* han permès obtenir clorosomes en els quals s'ha eliminat la BCl *c* en un 80 %, sense pèrdues significatives de BCl *a* ni de carotenoides (Sakuragi *et al.*, 1999). Treballs més recents han permès identificar com a β -carotè el carotenoide que es troba associat a la làmina basal dels clorosomes d'aquest bacteri (Montaño *et al.*, 2000). D'altra banda, i tenint en compte que l'aïllament i purificació de les làmines basals dels clorosomes és un procés difícil utilitzant tècniques bioquímiques tradicionals, actualment s'està treballant amb tècniques moleculars, concretament mitjançant la inactivació de gens encarregats de la síntesi de pigments (tècnica de *knock-out*). En *Chl. tepidum* s'han obtingut amb èxit clorosomes residuals, sense BCl *c*, que han estat anomenats carotenosomes (Frigaard *et al.*, 2002). Aquests clorosomes sense antena es varen obtenir a partir de cèl·lules mutants on s'havia inactivat el gen *bchK*, implicat en la síntesi de BCl *c*. Això va permetre obtenir clorosomes sense BCl *c* però amb un contingut de BCl *a*, carotenoides i proteïnes CsmA equivalent al de l'espècie original. Malgrat que l'espectre d'absorció *in vivo* d'aquests carotenosomes és equivalent al de la Fracció 0 de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 obtinguda en el present treball (veure Figura 4.12), s'ha de tenir present que en l'esmentada fracció no es va detectar absorció deguda a la BCl *a*, ja que es tractava de clorosomes vestigials, més semblants a fragments de membrana units a carotenoides que no pas a clorosomes complets.

4.3.3. Variacions en el contingut de carotenoides en poblacions naturals de Bacteris Verds del Sofre

Les característiques de l'estany de Banyoles, així com les de tots els estanyols de la seva conca lacustre, són idònies pel desenvolupament de poblacions de bacteris fotosintètics anoxigènics. En el cas concret de l'estanyol del Vilar són nombrosos els treballs que descriuen la presència de dos poblacions bacterianes d'aquest tipus, concretament de GSB i PSB (Guerrero *et al.*, 1980; Montesinos *et al.*, 1983; Montesinos i van Gemerden, 1986). Tot un seguit de característiques fisiològiques, com són l'afinitat pel sulfhídric, la utilització del sofre elemental, el metabolisme dels polisulfats, així com les seves propietats espectrals complementàries, permeten la co-existència d'aquests dos grups de microorganismes en la columna d'aigua (Van Gemerden i Beeftink, 1983).

En el present estudi, i tenint en compte l'àmplia varietat de treballs duts a terme en relació a la composició i dinàmiques temporals d'aquestes poblacions, no es va realitzar un seguiment anual de la població ja que no es pretenia analitzar les variacions en el contingut de pigments de les mostres de camp. El principal objectiu fou el de comparar les relacions entre els isòmers *trans* i *cis* dels carotenoides de les espècies marrons de GSB amb les mateixes relacions obtingudes al laboratori amb cultius purs d'aquestes mateixes espècies creixent sota diferents condicions d'il·luminació.

Pel que fa a les relacions dels isòmers *trans* i *cis* dels principals carotenoides dels GSB (Isr i β -Isr) destaca la uniformitat obtinguda, tant al llarg del temps d'estudi com en fondària. Quan la població es trobava ben desenvolupada el valor de la relació d'Isr *trans/cis* a la fondària del *plate* fou de 2 (Taula 4.18). Aquesta mateixa relació es va trobar en *Chl. phaeobacteroides* CL1401 amb independència a les condicions lumíniques en les quals s'incuben els cultius (Taula 4.18). Resultats similars es van obtenir pel β -Isr, on la proporció *trans/cis* fou també aproximadament de 2. La constància en aquestes relacions en poblacions naturals indica que la composició d'isòmers per a un carotenoide és independent tant de la fondària com del creixement estacional de la població. A partir d'aquestes relacions és possible plantejar la hipòtesi que tant al camp com al laboratori cada tipus d'isòmer presenta unes funcions determinades necessàries pel bon funcionament cel·lular de les espècies estudiades i que tant els isòmers amb configuració *trans* com els que presenten configuració *cis* són constitutius d'aquestes espècies. Aquesta idea ve reforçada per l'absència de variacions d'aquestes relacions determinades pels cultius de

Chl. phaeobacteroides al laboratori (Apartat 4.2.1). A partir de les relacions entre isòmers també és possible considerar que la conversió d'una configuració a una altra per a un determinat carotenoide es basa en reaccions d'equilibri termodinàmic entre les diferents configuracions tant en l'hàbitat natural com al laboratori.

Taula 4.18. Relacions molars calculades per a *Chl. phaeobacteroides* CL1401, incubat a dues intensitats lumíniques diferents, i per a mostres de camp de dues fondàries diferents (mostratge del 17 de juliol).

Table 4.18. Molar ratios for *Chl. phaeobacteroides* CL1401 incubated at two different light intensities and for a vertical population of the same species at the top and the plate depths.

Relació molar	<i>Chl. phaeobacteroides</i> CL1401		<i>Chl. phaeobacteroides</i>	
	100 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1 $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Top	Plate
BCI <i>e</i> /Car	7,2	16,2	3,0	5,6
Isr/ β -Isr	1,4	1,8	7,1	5,8
Isr <i>trans/cis</i>	2,4	2,1	2,0	2,0
β -Isr <i>trans/cis</i>	2,6	2,4	1,9	2,2

La proporció entre l'Isr i el β -Isr, tot i mantenir-se sense variacions a les fondàries del *plate* (valor promig de $4,5 \pm 1,44$) és unes 3 vegades més elevada a les mostres de camp respecte els cultius purs d'espècies marrons de GSB, pels quals l'esmentada relació també és manté uniforme al voltant d'un valor de 1,5 (Taula 4.18). Aquesta diferència entre les mostres de camp i els cultius de laboratori permet intuir possibles funcions dels carotenoides, concretament de l'Isr, que requereixin d'un major contingut d'aquest pigment en ambients naturals. Encara que la funció com a antena accessòria dels carotenoides als GSB no hagi estat confirmada fins al moment, aquesta és una opció que no ha de ser descartada tenint en compte les limitacions lumíniques a les quals poden estar sotmeses les poblacions bacterianes degut a la presència de poblacions algals per sobre la quimioclina dels llacs estratificats. De totes maneres les espècies marrons de GSB presenten una banda extra d'absorció a 520 nm, ocasionada per la BCI *e* oligomèrica, que també ajuda a incrementar el rang d'absorció de llum. A més, el fet que en mostres de camp la relació BCI *e*/Car sigui més baixa que en cultius de laboratori limitats per la llum (Taula 4.18) permet deduir que

la població natural estudiada no estava especialment afectada en termes d'intensitat lumínica.

Una altra possible funció que requeriria d'un contingut més alt de carotenoides en poblacions naturals respecte els cultius de laboratori seria la de protegir l'aparell fotosintètic davant processos oxidatius portats a terme per radicals de l'oxigen o bé pel propi oxigen *singlet*. Tot i que aquests microorganismes es troben sempre en la zona anòxica de la columna d'aigua no deixen d'estar en contacte puntual amb l'oxigen, o bé degut a la producció d'oxigen per part de les poblacions algals o de cianobacteris, o bé degut a fenòmens de turbolesa o pertorbacions en la columna d'aigua. Assumint que la funció fotoprotectora davant altes intensitats de llum no és prioritària a les fondàries on es localitzen les poblacions de GSB, si que ho podria ser la seva funció protectora per combatre els esmentats episodis d'oxigenació. De fet això explicaria perquè l'abundància relativa dels carotenoides al *top* sigui més elevada respecte la fondària del *plate* (Figura 4.26). No és estrany doncs que la relació BCl *e*/Car determinada en cultius incubats a alta intensitat de llum sigui més propera a les relacions calculades per a les mostres de camp que no pas a la mateixa relació determinada pels cultius incubats a baixa intensitat lumínica. Tot i així, cal esmentar que en el cas dels cultius de laboratori, un elevat contingut de carotenoides serviria per fotoprotegir la BCl *a* de la làmina basal de l'excés d'excitació mentre que en poblacions naturals aquest elevat contingut de carotenoides serviria per protegir l'aparell fotosintètic de l'efecte perjudicial de l'oxigen.

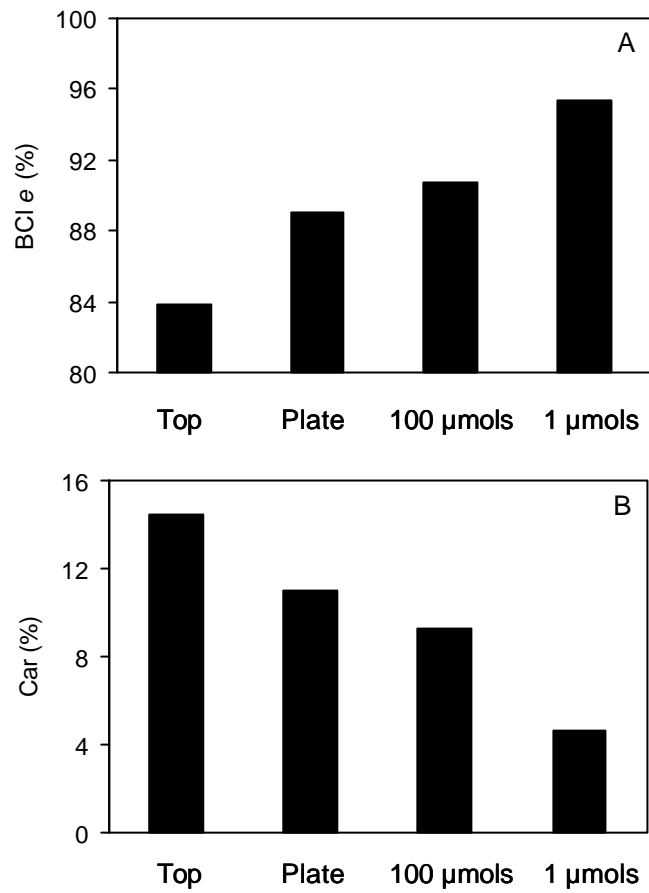


Figura 4.26. Abundància relativa de la BChl e (A) i dels Car (B) per a la població natural de GSB el 17 de juliol (fondària del *top* i del *plate*) i per a cultius d'espècies marrons de GSB incubats a diferents intensitats lumíniques ($\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Figure 4.26. Relative abundance of BChl e (A) and Car (B) for natural population of GSB on July 17th (*top* and *plate*) and for cultures of brown-species of GSB incubated at different light intensities.

5. Disseny d'un marcador molecular per a la
detecció específica de Bacteris Verds del Sofre
de coloració marró

5. Disseny d'un marcador molecular per a la detecció específica de Bacteris Verds del Sofre de coloració marró

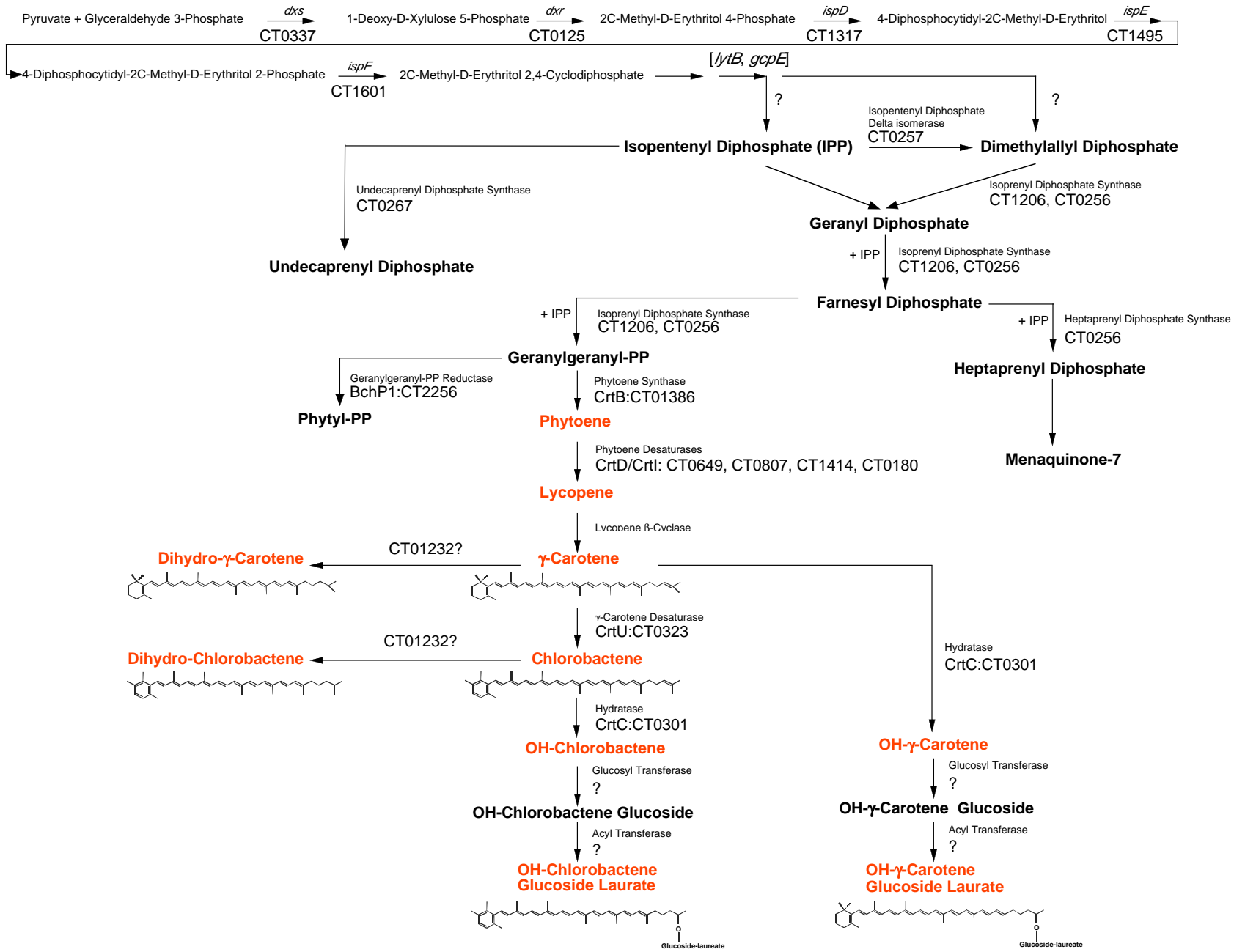
5.1. Introducció

Els carotenoides són pigments sintetitzats per una àmplia varietat d'organismes: bacteris, fongs, algues i plantes superiors. Tots els carotenoids provenen de la ruta de síntesi dels isoprenoids i comparteixen les primeres etapes de les rutes biosintètiques (Figura 5.1). La condensació d'una molècula de dimetilalil difosfat (DMADP) i la de tres molècules d'isopentil difosfat (IDP), originen el diterpè geranylgeranyl difosfat (GGDP), el qual constitueix la meitat de la molècula de tots els carotenoides C₄₀. La condensació de dues molècules de GGDP dona lloc al fitoè, carotenoide a partir del qual divergeixen les diferents rutes de síntesi (Schmidt-Dannert, 2000).

En el cas dels bacteris fotosintètics anoxigènics es coneixen cinc rutes principals de síntesi de carotenoides: (1) la via de l'espíril·loxantina, que inclou la via normal de l'espíril·loxantina i la via inusual d'aquest mateix carotenoide, la de l'esferoidè i la via dels carotenals, (2) la via de l'okenona, que inclou la síntesi d'okenona i de ceto-carotenoids, (3) la via de l'isorenieratè, en la qual s'inclou la ruta de síntesi d'isorenieratè i de clorobactè, (4) la via del γ i β -carotè i finalment (5) la via del diapocarotè (Takaichi, 1999).

Figura 5.1 (pàgina següent). Ruta de síntesi predita pels carotenoides a l'espècie verda de GSB *Chl. tepidum* (Eisen *et al.*, 2002).

Figure 5.1. (next page). Predicted biosynthetic pathway for carotenoids in the green-coloured GSB *Chl. tepidum* (Eisen *et al.*, 2002).



En el cas dels bacteris vermells fotosintètics, existeixen nombrosos treballs relacionats amb les rutes de síntesi dels carotenoides, incloent estudis amb els gens implicats en la síntesi dels enzims que intervenen en aquestes vies metabòliques. Concretament, els gens involucrats en la síntesi de carotenoides a dues espècies de bacteris vermells no del sofre, *Rhodobacter (Rb.) capsulatus* i *Rb. sphaeroides* han estat clonats i seqüenciats i es coneixen com a: *crtA*, *crtB*, *crtC*, *crtD*, *crtE*, *crtF* i *crtI* (Armstrong, 1995). En ambdues espècies aquests gens formen part del mateix *cluster*, el qual a la seva vegada es troba inclòs en el *cluster* dels gens implicats en la fotosíntesi. L'organització dels gens fotosintètics d'una d'aquestes espècies, concretament *Rb. capsulatus* es mostra a la Figura 5.2.

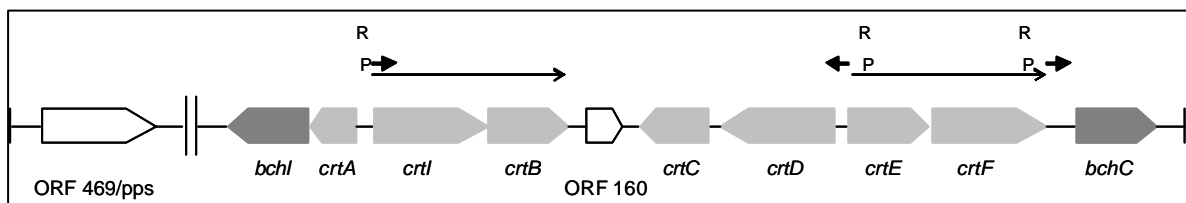


Figura 5.2. Gens implicats en la ruta biosintètica dels carotenoides del gènere *Rb. capsulatus*. Els gens *crt* es marquen en gris clar, en gris fosc s'assenyalen els gens *bch* i en blanc les regions corresponents a gens de funció desconeguda. Les fletxes indiquen les orientacions dels gens. Símbols: (P) possibles regions promotores i (R) seqüències reguladores palindròmiques (modificat d'Armstrong, 1995).

Figure 5.2. Carotenoid biosynthesis gene clusters in *Rb. capsulatus*. *Crt* genes, *bch* genes and genes of uncertain function are shaded gray, dark gray and white, respectively. Gene transcription orientations are shown. Symbols: (P) possible promoters and (R) palindromic regulatory sequences (modified from Armstrong, 1995).

La síntesi de carotenoides als bacteris verds del sofre (GSB, de l'anglès *Green Sulfur Bacteria*) és actualment objecte d'estudi. Encara no es coneixen amb exactitud tots els gens implicats en la síntesi d'aquests pigments, tot i que actualment la seqüència completa del genoma de *Chl. tepidum*, espècie tipus dins els GSB, ja ha estat publicat (Eisen *et al.*, 2002). Aquests autors han identificat de forma temptativa els gens implicats en la síntesi dels principals carotenoides en aquesta espècie verda de GSB (Figura 5.1). S'ha de tenir present que tant per les espècies verdes com per les marrons, la ruta de síntesi dels carotenoides s'inicia a partir d'un precursor comú, el licopè, a partir del qual la ruta biosintètica es bifurca (Takaichi, 1999) (Figura 5.3). Les espècies marrons de GSB, amb

BCI *e* com a pigment antena, presenten, com a principals carotenoides, Isr i β -Isr. Les espècies verdes, en canvi, amb BCI *c* o *d* com a pigment antena, presenten Cbt com a carotenoide majoritari (Schmidt, 1978).

En la ruta de síntesi de l'Isr, la ciclació del licopè, reacció catalitzada per una licopè ciclasa, donaria lloc al β -carotè. A partir d'aquest carotenoide, i mitjançant reaccions d'aromatització de la molècula, s'originarien el β -Isr i l'Isr (Takaichi, 1999) (Figura 5.3). El gen responsable de la síntesi de la licopè ciclasa, objecte d'estudi d'aquest treball, s'anomena *crtY*.

A les espècies verdes, en les quals el carotenoide dominant és el Cbt, es sintetitzaria γ -carotè a partir del licopè. L'enzim responsable d'aquesta reacció podria ser una γ -carotè sintasa o bé una licopè ciclasa (Takaichi, 1999) (Figura 5.3). Tot i que el gen que codifica per aquest enzim no és encara conegut, els treballs de Eisen *et al.* (2002) apunten que el responsable de la síntesi de γ -carotè podria ser també una licopè ciclasa. Segons els mateixos autors, la síntesi posterior de Cbt, a partir del γ -carotè, seria mitjançant una γ -carotè desaturasa. El gen responsable d'aquest enzim es coneix com a *crtU* i a *Chl. tepidum* li correspon el codi CT0323 per accedir a la base de dades. La seqüència completa del genoma de *Chl. tepidum* pot ser consultada al NCBI amb el número d'accés AE006470, disponible a l'adreça electrònica <http://www.tigr.org/tdb>.

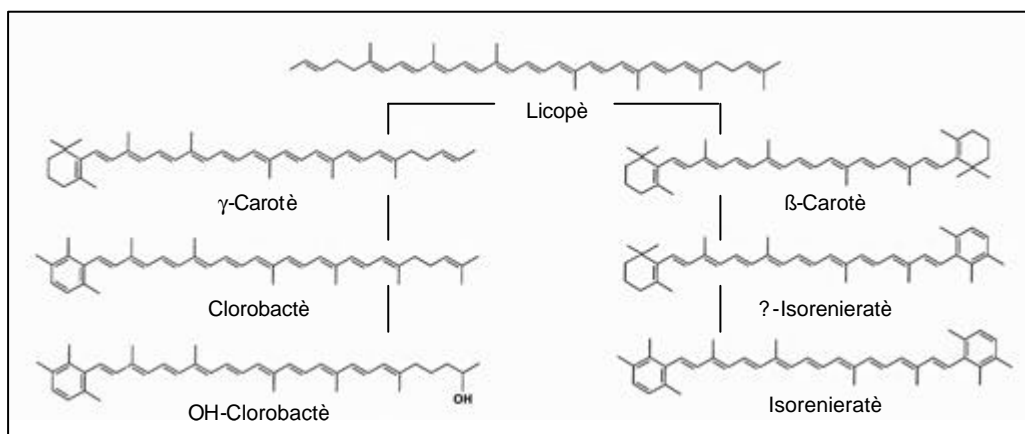


Figura 5.3. Ruta predisa per la biosíntesi de l'Isr i el Cbt (Takaichi, 1999).

Figure 5.3. Predicted pathway for the biosynthesis of Isr and Cbt (Takaichi, 1999).

El producte gènic del *crtY*, tal i com s'ha esmentat anteriorment, és la licopè ciclasa. Es tracta d'un enzim àmpliament distribuït a la natura, tenint en compte que tant plantes com nombrosos bacteris i alguns fongs, són capaços de sintetitzar carotenoides. Estudis evolutius amb aquest enzim han permès descriure dos grans tipus funcionals de licopè ciclasa (Krubasik i Sandmann, 2000): la β -ciclasa bacteriana monomèrica i la licopè ciclasa heterodimèrica.

El tipus monomèric, d'una banda, es troba present a plantes superiors i bacteris. Es tracta d'un polipèptid d'uns 400 aminoàcids i 43 KDa de pes molecular. Tot i que existeixen diferències en les seqüències dels gens que codifiquen per les licopè ciclasses monomèriques, es pot assumir un origen comú d'aquestes a partir del gen *crtY* bacterià. Aquest gen va ser clonat per primera vegada a partir d'*Erwinia uredovora* (Misawa *et al.*, 1990) i d'ell se'n deriva el gen *crtL*, present al cianobacteri *Synechococcus* sp. PCC7942 (Cunningham *et al.*, 1994). A partir del *crtL* dels cianobacteris s'evoluciona cap al gen de la licopè ciclasa de plantes superiors.

D'altra banda, el tipus heterodimèric es troba present a bacteris Gram positius i va ser descrit per primera vegada a *Brevibacterium linens* (Krubasik i Sandmann, 2000). En aquest cas, cada monòmer dels que constitueixen l'enzim funcional es troba codificat per un gen diferent, anomenats *crtYc* i *crtYd*. La combinació dels dos productes gènics, de 125 i 107 aminoàcids, respectivament, permet la síntesi de β -carotè a partir de licopè. Aquesta licopè ciclasa heterodimèrica també es troba present en diferents espècies del gènere *Mycobacterium* (Ramakrishnan *et al.*, 1997; Viveiros *et al.*, 2000) i en algunes espècies d'actinomicets, tot i que totes les espècies del gènere *Streptomyces* presenten la licopè ciclasa monomèrica (Krügel *et al.*, 1999). Les seqüències dels gens que codifiquen per les licopè ciclasses heterodimèriques no presenten regions homòlogues amb les licopè ciclasses monomèriques, malgrat compartir la funció. Existeix un tercer tipus de gen, anomenat *crtYB*, específic de fongs. En aquest cas aquest gen codifica per una licopè ciclasa amb dues funcions catalítiques (Verdoes *et al.*, 1999).

A part dels dos tipus de licopè ciclasses descrits, recentment s'han descobert dos més. El primer tipus correspon a una espècie de cianobacteri marí (*Prochlorococcus marinus* MED4) i és codificat per dos gens, descrits com a *crtL-b* i *crtL-e* (Stickforth *et al.*, 2003). El segon tipus s'ha descrit a una espècie d'heliobacteri, concretament *Halobacterium salinarium* (Peck *et al.*, 2002). La licopè ciclasa d'aquests bacteris presentaria similituds

amb la licopè ciclasa de *Brevibacterium linens* i *Mycobacterium aurum* (Krubasik i Sandmann, 2000; Peck *et al.*, 2002).

L'objectiu d'aquesta part del treball va ser la utilització d'aquest gen involucrat en la síntesi de carotenoides com a eina molecular per a la detecció específica de les espècies marrons de GSB, procedents de mostres naturals. Tenint en compte que amb les eines moleculars existents actualment no és possible discriminar entre les espècies verdes i les marrons del grup bacterià objecte d'estudi, es va proposar un nou marcador per a la detecció exclusiva de les espècies marrons. Una diferència important entre els dos grups de GSB són els carotenoides. La ruta biosintètica d'aquests pigments, tal i com s'ha esmentat anteriorment, és comuna fins al licopè, carotenoide a partir del qual la ruta es bifurca. Per aquest motiu, un bon candidat per a ser utilitzat com a marcador específic d'espècies marrons seria aquell que codifiqués per algun enzim específic de la ruta biosintètica dels carotenoides, a partir de la bifurcació entre verds i marrons. El gen que codifica per la licopè ciclasa, és a dir, el *crtY*, responsable de la síntesi de β -carotè a partir del licopè, seria un bon candidat, ja que les espècies verdes no presenten β -carotè. No obstant això, cal tenir present que malgrat no es conegui el gen responsable de la síntesi de β -carotè a les espècies verdes de GSB, l'enzim implicat en l'esmentada reacció de síntesi és també probablement una licopè ciclasa (Eisen *et al.*, 2002). Un altre possible candidat per a l'estudi seria el gen *crtU*, el qual codifica per una desaturasa responsable de la síntesi d'Isr a partir de β -Isr. Aquest gen va ser finalment descartat ja que actualment es coneix que també intervé en la síntesi de Cbt (Eisen *et al.*, 2002). Com a conseqüència l'estudi que a continuació es presenta ha estat centrat en el gen *crtY*. El protocol seguit fins a l'obtenció de les seqüències objecte d'estudi ha estat prèviament descrit a l'Apartat 2.9.7 de Material i Mètodes.

5.2. Resultats

5.2.1. Disseny d'encebadors

El primer pas en aquest treball fou el disseny d'encebadors degenerats a partir de les seqüències de *crtY* disponibles a les bases de dades en el moment d'iniciar l'estudi. Totes elles pertanyien a espècies no fotosintètiques del sofre, degut a la manca de seqüències del gen *crtY* en aquestes espècies (Taula 2.6 de Material i Mètodes). Mitjançant l'alineament de les seqüències d'aminoàcids, del producte gènic de *crtY*, d'aquestes soques font utilitzades, es van identificar les regions amb major homologia (Figura 5.4), a partir de les quals es va fer el disseny dels encebadors degenerats (Taula 5.1). Concretament aquest disseny es va fer utilitzant el programa CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer), accessible a la següent adreça electrònica: <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>. El primer pas va consistir en aplicar l'opció *Blockmaker* de l'esmentat programa (Rose *et al.*, 1998) amb l'objectiu d'obtenir blocs consens entre les seqüències d'aminoàcids emprades per dissenyar els encebadors. De tots el blocs obtinguts s'escolliren els marcats a la Figura 5.4 ja que eren els que permetien amplificar una regió més extensa del gen. El següent pas del disseny va ser l'obtenció de les seqüències de nucleòtids dels dos blocs escollits, donant lloc als encebadors *forward* i *reverse*, respectivament.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

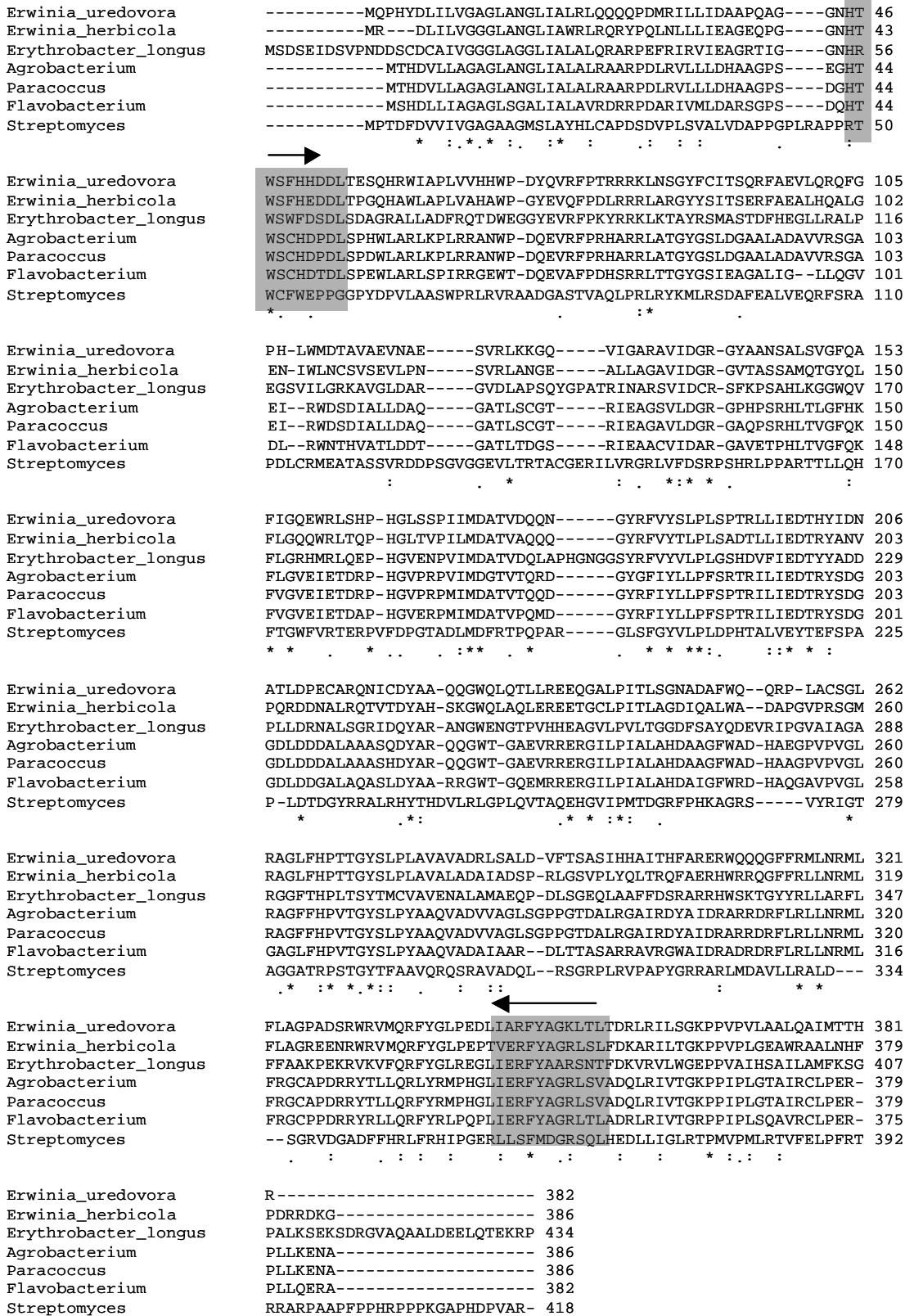


Figura 5.4. Alineació de les seqüències d'aminoàcids dels microorganismes font emprades pel disseny dels encebadors degenerats. Els quadres grisos assenyalen les regions amb homologia utilitzades (blocs consens).

Figure 5.4. CrtY protein alignment of the sequences used to design degenerate primers. Grey boxes indicate the homologues regions used (blocks).

Taula 5.1. Encebadors degenerats dissenyats pel gen *crtY*. Les regions conservades dels oligonucleòtids es mostren en lletres majúscules, mentre que les regions degenerades corresponen a les lletres en minúscula (alfabet degenerat segons el CODEHOP: r-AG, y-CT, m-AC, k-GT, w-AT, s-CG, b-CGT, d-AGT, h-ACT, v-ACG i n-ACGT).

Table 5.1. Degenerate primers designed for *crtY* gene. Conserved region of the oligonucleotides are shown in capital letters whereas degenerate regions are shown in lower-case (degenerate alphabet from CODEHOP: r-AG, y-CT, m-AC, k-GT, w-AT, s-CG, b-CGT, d-AGT, h-ACT, v-ACG and n-ACGT).

ID	Seqüències dels oligonucleòtids	# Deg	Anellament (°C)
crtY43f (forward)	H T W S C H D P D 5'-CACACCTGGTCCTGCcaygayscnga-3'	32	60.2
crtY365r (reverse)	F Y A G R L T V aaratrcgnccGGCGGACTGGC 5'-CGGTCAGGCGGccngertaraa-3'	16	59.2

5.2.2. Comprovació de l'especificitat dels encebadors

Per tal de comprovar l'eficiència dels encebadors degenerats, es va amplificar ADN genòmic de les soques font, utilitzades pel disseny dels esmentats encebadors (Figura 5.5). Posteriorment, els mateixos encebadors varen ser provats amb diferents soques de GSB (Figura 5.6). Les amplificacions amb aquests encebadors foren positives per a totes les soques font emprades, així com per a totes les espècies de GSB analitzades, tant les verdes com les marrons.

En tots els casos, i degut a la degeneració dels encebadors, els productes de PCR obtinguts foren una mescla de fragments de diferents grandàries, compreses aproximadament entre els 250 i els 1500 parells de bases (pb). La grandària del fragment d'interès esperada, segons les regions bloc consens escollides pel disseny dels encebadors, fou de 966 pb.

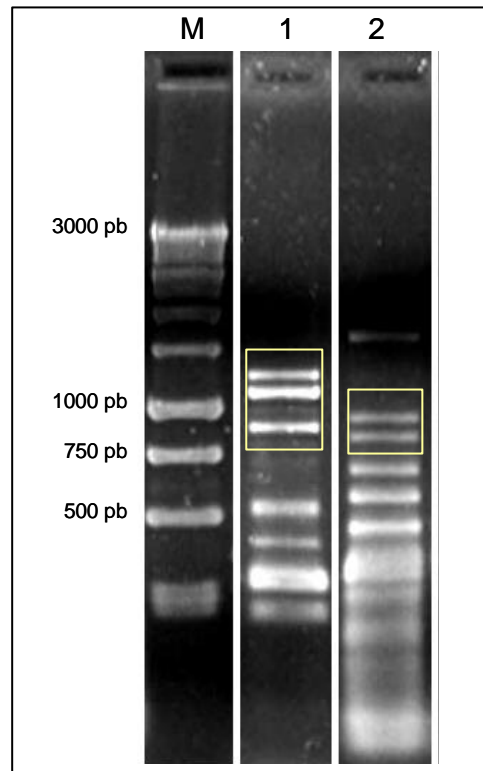


Figura 5.5. Productes de PCR obtinguts amb dues de les soques font utilitzades per al disseny dels encebadors degenerats. La grandària dels fragments esperats era al voltant de 1000 pb (bandes marcades).

Identificació: (M) marcador de pes molecular, (1) *Erwinia herbicola* i (2) *Erytrobacter longus*.

Figure 5.5. PCR products from genomic DNA of *Erwinia herbicola* (1) and *Erytrobacter longus* (2), two of the source strains used to design the degenerate primers. The fragment size of interest was 1000 bp. (M) molecular weight ladder.

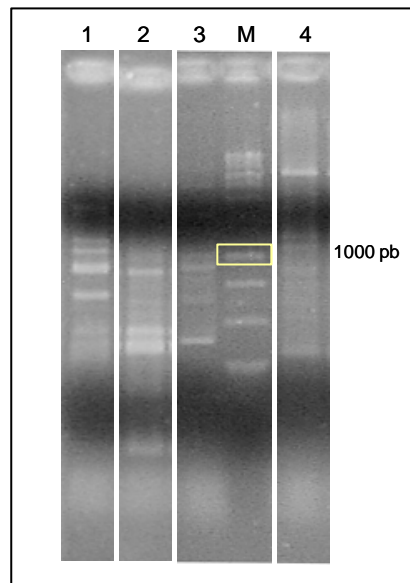


Figura 5.6. Productes de PCR, obtinguts amb els encebadors degenerats, per quatre soques de GSB. Identificació: (1) *Chl. tepidum* ATCC49652, (2) *Chl. limicola* UdG6008, (3) *Pelodictyon phaeum* CIB2410 i (4) *Chl. phaeobacteroides* CL1401. (M) marcador de pes molecular.

Figure 5.6. PCR products obtained with degenerative primers for different GSB strains. Identification: (1) *Chl. tepidum* ATCC49652, (2) *Chl. limicola* UdG6008, (3) *Pelodictyon phaeum* CIB2410 and (4) *Chl. phaeobacteroides* CL1401. (M) molecular weight ladder.

El següent pas de l'estudi consistia en amplificar únicament els fragments de la grandària d'interès, és a dir, els de 966 pb. Amb aquest objectiu, i a partir dels productes de PCR obtinguts amb els encebadors degenerats, calia procedir a una segona amplificació, més específica, per tal d'obtenir únicament els fragments d'ADN a l'entorn de 1000 pb. Degut a les dificultats d'amplificar aquests productes de forma directa (veure Apartat 5.3. d'aquest mateix capítol), utilitzant els encebadors dissenyats prèviament però sense el fragment degenerat, la re-amplificació específica dels fragments d'interès es va dur a terme clonant-los prèviament en cèl·lules d'*Escherichia coli*. A la Figura 5.7 es mostra, per la soca marró *Chl. phaeobacteroides* CL1401, les bandes a partir de les quals es va obtenir l'ADN que va ser lligat al vector de clonació p-GEM i posteriorment transformat en cèl·lules competents d'*Escherichia coli* (Apartat 2.9.7.2 de Material i Mètodes).

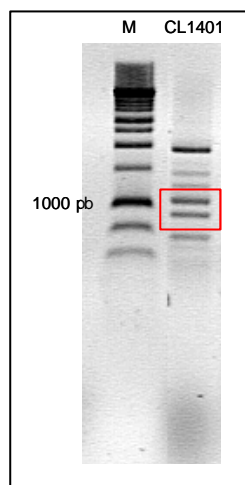


Figura 5.7. Fragments d'ADN, de 1100 i 900 pb respectivament, amplificats amb els encebadors degenerats, que posteriorment van ser clonats al vector p-GEM.

Figure 5.7. DNA fragments, of 1100 and 900 bp, amplified with degenerative primers, before the cloning in p-GEM.

A continuació, a partir dels clons positius obtinguts, es va dur a terme el disseny d'encebadors, en aquest cas específics. Amb aquests es pretenia poder amplificar únicament espècies marrons de GSB. L'obtenció de l'ADN d'aquests clons, així com la seva amplificació es descriu a l'Apartat 2.9.7.2. de Material i Mètodes. El disseny dels encebadors, en aquest cas, fou manual.

L'ADN dels clons positius obtinguts per *Chl. phaeobacteroides* CL1401 va ser seqüenciat. A la Figura 5.8 s'assenyalen les bandes concretes, corresponents a fragments de 900 i 1100 pb, respectivament, que foren seqüenciats. La seqüència del fragment de 900 pb va ser la utilitzada pel disseny manual, tenint en compte la degeneració del codi genètic, dels encebadors específics. Els encebadors dissenyats (Taula 5.2) foren anomenats PKT, degut a l'homologia existent entre la seqüència d'aminoàcids del clon (Figura 5.9) i la superfamília de proteïnes de les policètid-ceto-sintases.

Aquesta superfamília de proteïnes es troba present a plantes, fongs i cèl·lules procarites i els seus membres es caracteritzen per presentar un domini comú, anomenat domini

cetosintasa (KS), el qual està implicat en la síntesi de nombrosos metabolits secundaris (Moffitt i Neilan, 2003).

Taula 5.2. Seqüències dels encebadors específics dissenyats per l'amplificació del gen *crtY*.

Table 5.2. Specific sequences from specific primers designed for the *crtY* gene amplification.

ID	Seqüències dels oligonucleòtids
PKT <i>forward</i>	144-AAG TTG CCA TGT TCG AAA ACT CG
PKT <i>reverse</i>	330-CGC TAA TGC AAC CTG GGA AAG A

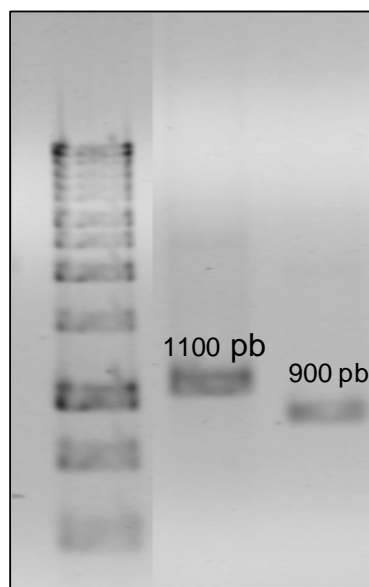


Figura 5.8. Bandes dels clons de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 que foren seqüenciats.

Figure 5.8. Sequenced clones from *Chl. phaeobacteroides* CL1401.

```

XXXXXXXXXXKQGTRLKLPCSKTRLLPILAXPKQAIKRGFSTEYLYLKKQVW
AQNRLCKKXGSPXPXRStopQQQGSSVRNXQQXGKRGCLKXGXNGFNGQQX
MetXNYSXXXXGXFXIXRXXKFXNXXTIFXLRNFXGXXXXXXXXXXXXX

KKIXXXFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXIXXXNEAVFXAXFXFLVTVNRPK
FRLTANFRSIHXFLPFHELTXTFXILSQVALALRIYRGXRKIFCREFQGRGRT
RCESLSEFRGRLQVDHLGELPTRWMetPGXVFYSDTStopLAWRNQXSStopLFX

```

Figura 5.9. Seqüències d'aminoàcids (aa's) del clon de *Chl. phaeobacteroides* CL1401 a partir de les quals es varen dissenyar els encebadors PKT: *forward*, a partir dels aa marcats en blau del quadre superior i *reverse*, a partir dels aa marcats en blau del requadre inferior. Aquesta seqüència va presentar homologia amb una proteïna de la família de les policètid-ceto-sintases (PKT).

Figure 5.9. Sequences from the clone of *Chl. phaeobacteroides* CL1401 used to design the PKT primers: *forward*, from the blue label aa's in the first rectangle and *reverse*, from the blue label aa's in the second rectangle. This sequence was homologous with a protein of polyketide synthases family (PKT).

Per tal de comprovar l'especificitat dels encebadors PKT aquests varen ser assajats amb ADN de diferents soques de GSB, tant verdes com marrons. Els resultats obtinguts, mostrats a la Figura 5.10, permeten apreciar l'especificitat que presentaren els encebadors PKT per les espècies marrons de GSB i la manca d'amplificació obtinguda en el cas de les espècies verdes d'aquest mateix grup bacterià. La grandària del fragment esperat (558 pb) es correspon amb la obtinguda.

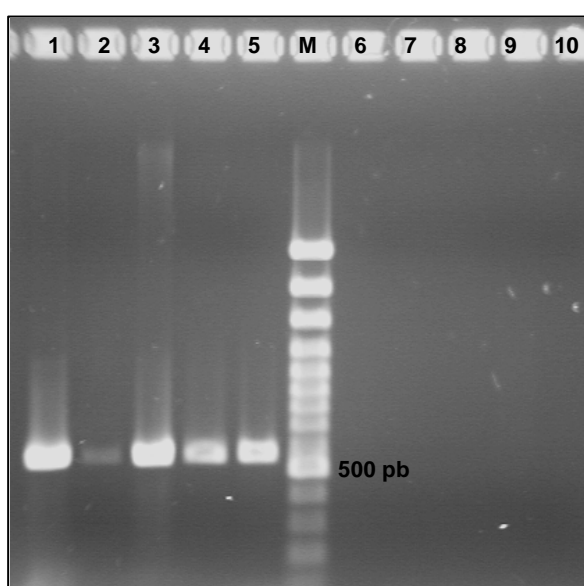


Figura 5.10. Amplificacions obtingudes amb els encebadors específics per les espècies marrons de GSB (PKT). Els productes de PCR dels carrils de l'esquerra del marcador de pes molecular (M) corresponen a les espècies marrons, mentre que l'absència d'amplificació (carrils de la dreta del M) correspon a les espècies verdes. Identificació: (1) *Chl. phaeobacteroides* CL1401, (2) *Chl. phaeovibroides* 2631^T, (3) *Chl. phaeobacteroides* 2430^T, (4) *Pelodictyon phaeum* CIB2401, (5) *Chl. phaeobacteroides* UdG6053, (6) *Chl. limicola* UdG6008, (7) *Chl. vibrioforme* NCBI8327, (8) *Chl. tepidum* ATCC49652, (9) *Prosthecochloris aestuarii* CHP3401 i (10) control negatiu (ddH₂O).

Figure 5.10. Amplification products obtained with specific primers for brown-GSB (PKT). The PCR products on the left of the molecular weight ladder (M) are amplifications from brown species, while the non-PCR products on the right of the ladder are green species. Identification: (1) *Chl. phaeobacteroides* CL1401, (2) *Chl. phaeovibroides* 2631^T, (3) *Chl. phaeobacteroides* 2430^T, (4) *Pelodictyon phaeum* CIB2410, (5) *Chl. phaeobacteroides* UdG6053, (6) *Chl. limicola* UdG6008, (7) *Chl. vibrioforme* NCBI8327, (8) *Chl. tepidum* ATCC49652, (9) *Prosthecochloris aestuarii* CHP3401 and (10) negative control (ddH₂O).

A continuació, es van repetir les amplificacions amb els encebadors específics (PKT), en aquest cas amb cua GC (Figura 5.11) sobre ADN genòmic procedent de mostres naturals, per tal de realitzar anàlisis de diversitat mitjançant DGGE (Apartat 2.9.6) i comprovar l'especificitat dels encebadors PKT, per les espècies marrons de GSB, en mostres de camp. Totes les mostres analitzades foren potencialment riques en espècies marrons de GSB (Figura 5.12). Algunes d'elles corresponien a l'ADN obtingut dels enriquiments realitzats a partir de mostres de diferents ambients aquàtics: estanyol del Sisó, de la zona lacustre de Banyoles i Hopkins River, riu australià. La resta eren mostres d'ADN obtingudes a partir de mostres del llac Vilar, de diferents mesos i/o fondàries, també de la zona lacustre de Banyoles.

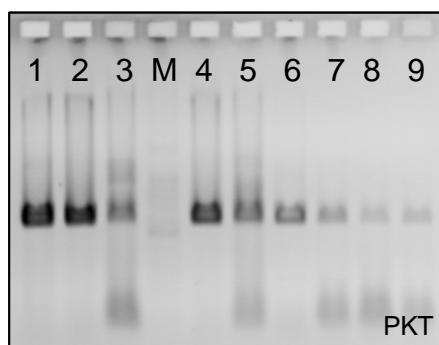


Figura 5.11. Amplificacions obtingudes amb els encebadors PKT (amb cua GC). Mostres carregades a la DGGE: (1) *Chl. phaeobacteroides* CL1401, (2) *Chl. phaeobacteroides* 2430^T, (3) *Pelodictyon phaeum* CIB2401, (M) marcador de pes molecular, (4) enriquiment del Sisó, (5) enriquiment del Hopkins River, (6) Vilar Juny 6,5 m, (7) Vilar Juliol 6,5 m, (8) Vilar Agost 6,5 m i (9) Vilar Març 10 m.

Figure 5.11. Amplification products obtained with PKT primers (with GC-clamp). Samples carried in DGGE: (1) *Chl. phaeobacteroides* CL1401, (2) *Chl. phaeobacteroides* 2430^T, (3) *Pelodictyon phaeum* CIB2401, (M) molecular weight ladder, (4) enrichment from Sisó, (5) enrichment from Hopkins River, (6) Vilar June 6,5 m, (7) Vilar July 6,5 m, (8) Vilar August 6,5 m and (9) Vilar March 10 m.

La DGGE realitzada amb les mostres anteriorment esmentades es mostra a la Figura 5.12. L'ADN extret de les bandes mitjançant electroelució va ser seqüenciat seguint el protocol descrit a la secció 2.9.7.3 de Material i Mètodes. El fet més destacat de la DGGE fou la conservació del patró de bandes per totes les mostres prèviament amplificades amb els encebadors PKT. Malgrat que per totes les mostres analitzades, tant pels cultius purs com per les mostres de camp, es detectaren dues bandes, i assumint que els gens funcionals als GSB són molt conservats (Garcia-Gil *et al.*, 2003), no és d'estranyar l'absència de

diferències clares entre totes les seqüències obtingudes. D'aquesta manera es va obtenir una única seqüència consens, a partir de l'alineament de totes les seqüències obtingudes, amb la qual es van realitzar dos tipus d'anàlisis de *blast*. D'una banda es va realitzar un *blast*, a partir de la seqüència de nucleòtids, contra totes les seqüències de nucleòtids presents a la base de dades del GenBank i, d'altra banda, es va dur a terme una cerca de les seqüències d'aminoàcids, amb homologia amb la seqüència de nucleòtids obtinguda (*blastx*), presents també a les bases de dades (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

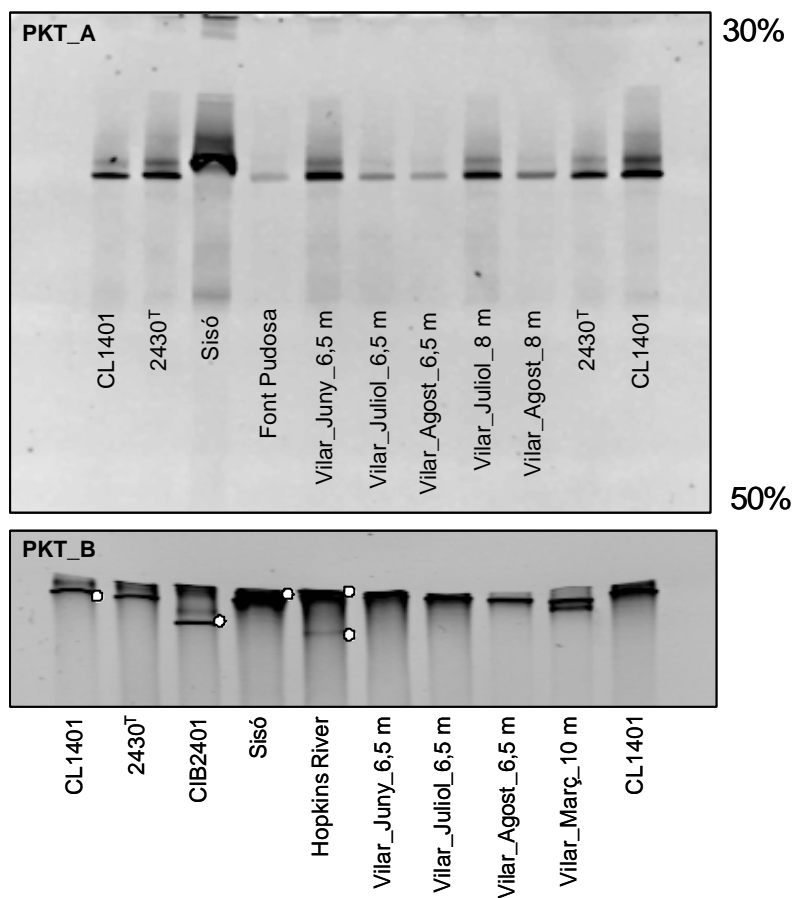


Figura 5.12. Separació específica de les seqüències corresponents als fragments del gen *crtY* d'espècies marrons de GSB i mostres naturals, procedents de diferents ambients, mitjançant gradient en gel desnaturalitzant. De les mostres del gel PKT_A no es va poder recuperar l'ADN. A partir de les bandes marcades al gel PKT_B es va extreure l'ADN que posteriorment va ser seqüenciat. Els percentatges indicats a la dreta del gel mostren les concentracions d'agent desnaturalitzant.

Figure 5.12. Sequence-specific separation of *crtY* gene from fragments of brown-species of GSB and natural samples by denaturing gradient gel electrophoresis. From samples of PKT_A gel were impossible obtain DNA. The sequences were from samples in PKT_B gel. Percent values on the right give concentrations of denaturalization.

Cal assenyalar que només una seqüència bacteriana, concretament de *Chl. tepidum* TLS, va mostrar una certa homologia amb la seqüència consens obtinguda. La resta de seqüències amb homologia foren totes d'organismes superiors. La seqüència de *Chl. tepidum* TLS amb la qual es va obtenir homologia, amb el codi d'accés AE012785.1, correspon a un fragment de genoma pel qual no ha estat descrita cap funció (Figura 5.13).

Pel que fa a les seqüències d'aminoàcids que varen presentar major homologia amb la seqüència consens objecte d'estudi, destaca el fet que totes elles, malgrat pertànyer a espècies bacterianes diferents, corresponen a la proteïna N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o bé a fragments de proteïnes de funció desconeguda. El codi d'accés a la base de dades del GenBank en el cas de *Chl. tepidum* TLS és el següent: NP_660960.1 (Figura 5.14).

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21645940 gb AE012785.1 Chlorobium tepidum TLS section ...	<u>64</u>	2e-07
gi 31542324 ref NM_021151.2 Homo sapiens carnitine O-octan...	<u>38</u>	8.9
gi 28488535 ref XM_287860.1 Mus musculus hypothetical gene...	<u>38</u>	8.9
gi 1255814 gb U53334.1 Caenorhabditis elegans cosmid R105,...	<u>38</u>	8.9
gi 24660331 gb BC039004.1 Homo sapiens, carnitine O-octano...	<u>38</u>	8.9
gi 21553205 gb AC025477.6 Homo sapiens chromosome 5 clone ...	<u>38</u>	8.9
gi 19917779 gb AE011083.1 Methanosarcina acetivorans str. ...	<u>38</u>	8.9
gi 4508117 gb AC005045.2 Homo sapiens BAC clone CTB-12D21 ...	<u>38</u>	8.9
gi 25955760 emb AL831710.8 Mouse DNA sequence from clone R...	<u>38</u>	8.9
gi 24474477 emb AL844553.4 Mouse DNA sequence from clone R...	<u>38</u>	8.9
gi 7243888 gb AC010721.2 AC010721 Homo sapiens BAC clone RP...	<u>38</u>	8.9
gi 30698345 dbj AB088224.1 Streptomyces rochei plasmid pSL...	<u>38</u>	8.9
gi 5305442 gb AF073770.1 AF073770 Homo sapiens carnitine oc...	<u>38</u>	8.9
gi 26092141 dbj AK047392.1 Mus musculus 10 days neonate ce...	<u>38</u>	8.9
gi 3858902 gb AC005884.1 AC005884 Homo sapiens chromosome 1...	<u>38</u>	8.9
gi 3360499 gb AF052187.1 AF052187 Homo sapiens clone 24511 ...	<u>38</u>	8.9

Figura 5.13. Seqüències de nucleòtids amb major homologia amb la seqüència consens obtinguda.

Figure 5.13. Nucleotide sequeneces producing significant alignment with the obtained consensus sequence.

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 21672895 ref NP_660960.1 		N-acetylmuramoyl-L-alanine ami...	150	6e-36
gi 23135845 ref ZP_00117579.1 		hypothetical protein [Cytoph...	80	9e-15
gi 23135328 ref ZP_00117078.1 		hypothetical protein [Cytoph...	77	8e-14
gi 23014706 ref ZP_00054509.1 		hypothetical protein [Magnet...	65	2e-10
gi 15606778 ref NP_214158.1 		N-acetylmuramoyl-L-alanine ami...	64	5e-10
gi 16121324 ref NP_404637.1 		N-acetylmuramoyl-L-alanine ami...	63	9e-10
gi 22127037 ref NP_670460.1 		putative amidase [Yersinia pes...	63	9e-10
gi 29347551 ref NP_811054.1 		putative N-acetylmuramoyl-L-al...	63	1e-09
gi 25166223 dbj BAC24414.1 		b2817 [Wigglesworthia brevipalpis]	62	3e-09
gi 23469303 ref ZP_00124637.1 		hypothetical protein [Pseudo...	62	3e-09

Figura 5.14. Seqüències d'aminoàcids amb major homologia amb la seqüència consens obtinguda.

Figure 5.14. Aminoacid sequences producing significant alignment with the obtained consensus sequence.

5.3. Discussió

Treballs recents amb gens funcionals com ara el *bchG* (Garcia-Gil *et al.*, 2003) permeten dur a terme estudis comparatius entre els microorganismes en base a les seqüències del gen objecte d'estudi. Tot i això, malgrat l'existència d'encebadors específics per a la detecció tant de bacteris fotosintètics (Achenbach *et al.*, 2001) com de GSB (Overmann *et al.*, 1999 i Achenbach *et al.*, 2001), fins al moment no s'havien descrit uns marcadors específics només per a espècies marrons de GSB.

Per a l'obtenció d'aquest marcador calia, en primer lloc, escollir una característica diferencial entre les espècies marrons i les espècies verdes de GSB. Tenint en compte d'una banda, que la present memòria es centra en l'estudi dels carotenoides a les espècies marrons de GSB i que de l'altra són pocs els estudis realitzats fins al moment amb gens funcionals de GSB, semblava interessant abordar un treball d'aquest tipus.

Sorprenentment, malgrat l'especificitat dels encebadors PKT dissenyats, les seqüències obtingudes no presentaren homologia amb proteïnes de la família de les licopè ciclases. Aquest fet possiblement sigui degut a què el disseny dels encebadors degenerats es va realitzar a partir de microorganismes no fotosintètics, degut a l'absència de seqüències del gen *crtY* pel grup de GSB. A més, l'esmentat disseny es va fer només a partir d'un fragment de la seqüència íntegra del gen. Malgrat aquestes limitacions, la utilització

d'encebadors degenerats és de gran utilitat especialment quan, com en el cas d'aquest estudi, no es coneix el gen que vol ser amplificat en el grup de microorganismes d'interès, però en canvi sí es coneix en d'altres grups filogenètics. En el cas que ens ocupa els encebadors degenerats no varen poder ser utilitzats per re-amplificar els productes primaris (fins i tot eliminant la part degenerada de l'encebador), motiu pel qual les re-amplificacions del fragment de 1000 pb es dugueren a terme mitjançant clonació.

El fet de no poder re-amplificar els productes primaris de PCR obtinguts amb els encebadors degenerats pot ser degut a diferents motius. Una possibilitat seria que el fragment d'interès formés estructura secundària i aquest fet impedís la seva amplificació. Una altra opció podria ser la formació de quimeres, per part dels encebadors. Aquestes serien responsables de l'obtenció de productes inespecífics, aproximadament d'uns 250 pb, amb la conseqüent absència d'amplificació del fragment objecte d'anàlisi, és a dir, el fragment de 1000 pb.

Els encebadors específics, en canvi, foren dissenyats a partir d'una seqüència de CL1401, que va presentar homologia amb una proteïna de la superfamília de les policètid-ceto-sintases. Totes les proteïnes d'aquesta superfamília, els enzims de les quals es troben presents a procariotes, fongs i plantes superiors, tenen en comú la presència d'un domini cetosintasa. Malgrat la diversitat, a nivell funcional, de les policètid-ceto-sintases, tots els enzims d'aquesta superfamília es troben implicats en la síntesi de metabolits secundaris, la funció dels quals difereix en funció de l'organisme (Moffitt i Neilan, 2003). En el cas del gènere bacterià *Streptomyces* sp. la informació obtinguda a partir de l'anàlisi comparativa de seqüències pel gen de la policètid-ceto-sintasa, permet estudiar la diversitat en la producció d'antibiòtics en diferents espècies d'actinomicets (Metsä-Ketelä *et al.*, 2002).

Tot i que el disseny dels encebadors PKT va ser realitzat a partir d'una seqüència amb homologia a proteïnes de la superfamília de les policètid-ceto-sintases, la seqüència consens obtinguda, a partir de l'alineament de totes les seqüències d'ADN obtingut de les bandes de la DGGE, no va presentar homologia amb cap proteïna d'aquesta superfamília. La similitud més elevada d'aquesta seqüència consens (consens_PKT) es va obtenir, en canvi, amb una proteïna anomenada N-acilmuramoil-L-alanina amidasa, tal i com ha estat esmentat anteriorment. Aquest fet indica que malgrat l'especificitat dels encebadors PKT per a les espècies marrons de GSB, no s'estava amplificant cap gen implicat en la síntesi de carotenoides a les espècies estudiades. A la Figura 5.15 es mostra l'alineament

entre la seqüència consens_PKT i la seqüència del clon a partir del qual es van dissenyar els encebadors específics o PKT. Tot i que la seqüència del clon (XF3F a la Figura 5.15) va presentar homologia amb una proteïna de la família de la policètid-ceto-sintases, la seqüència consens obtinguda de l'alineament entre la seqüència consens_PKT i la seqüència del clon, en canvi, no va presentar homologia amb cap proteïna d'aquesta família. Malgrat això es va aconseguir amb l'objectiu principal d'aquesta part experimental de la memòria, és a dir, es va aconseguir l'amplificació específica d'espècies marrons de GSB.

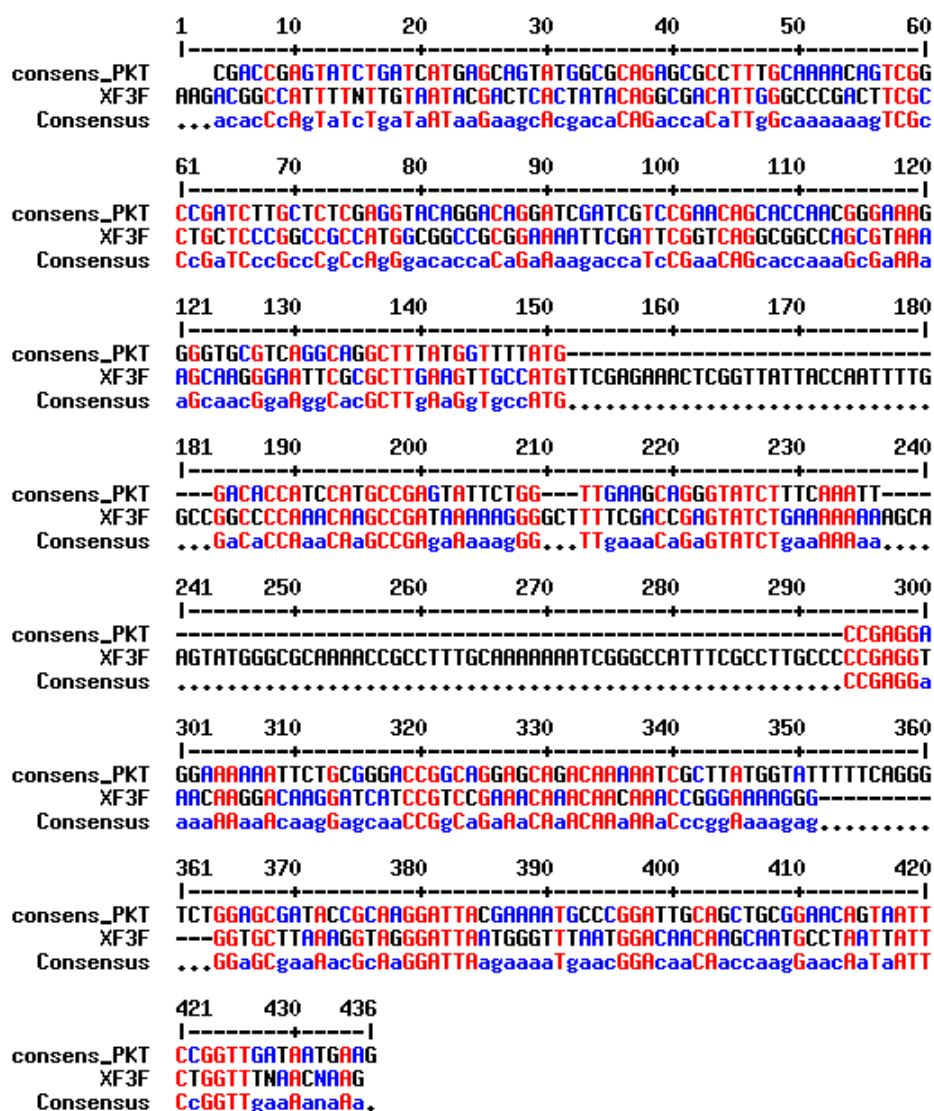


Figura 5.15. Alineament entre la seqüència del clon de *Chl. phaeobacteroides* emprada pel disseny dels encebadors PKT (XF3F) i la seqüència consens_PKT.

Figure 5.15. Alignment between the clon of the *Chl. phaeobacteroides* sequence used to design the PKT primers(XF3F) and the consens_PKT sequence.

A partir de l'eina dissenyada, és a dir, mitjançant l'ús dels encebadors PKT específics per a les espècies marrons de GSB, és possible plantejar un seguit d'experiments encaminats a detectar activitats *in vivo* d'aquestes espècies, encara que l'activitat no pogués ser directament relacionada amb la síntesi de carotenoides. Això implicaria, d'una banda, l'ús de tècniques de PCR a temps real, per a la quantificació específica de les espècies marrons de GSB, i d'altra banda, en combinació amb amplificacions mitjançant transcriptasa inversa, es podrien plantejar experiments de caire fisiològic en funció de la concentració de l'ARN missatger corresponent. Per dur a terme aquestes anàlisis es podrien dissenyar sondes del tipus *Taqman* i realitzar les esmentades quantificacions mitjançant PCR a temps real (Figura 5.16).

CGACCGAGTATCTGATCATGAGCAGTATGGCGCAGAGCGCCTTTGCAAAAC	50
AGTCGGCCGATCTTGCTCTCGAGGTACAGGACAGGATCGAICGTCCGAACA	100
GCACCAACGGGAAGGGGTGCGTCAGGCAGGCTTTATGGT'TTTATGGACAC	150
CATCCATGCCGAGTATTCTGGTTGAAGCAGGGTATCTTTCAAAT'TCCGAGG	200
AGGAAAAAATTCTGCGGGACCGGCAGGAGCAGACAAAAATCGCTTATGGTA	250
TTTTTTCAGGGTCTGGAGCGATAACCGCAAGGATTACGAAAATGCCCGGATTG	300
CAGCTGCGGAACAGTAATTCCGGTTGATAATGAAG	341

Figura 5.16. Fragments de la seqüència consens_PKT que podrien ser utilitzats com a encebadors *forward* i *reverse* (quadres negres) i com a sonda *Taqman* (quadre vermell) per a la quantificació per PCR a temps real.

Les esmentades regions han estat determinades mitjançant el programa *Primer express 1.5* (*Applied Biosystems*).

Figure 5.16. Fragments from consens_PKT sequence that could be used as forward and reverse primers (black boxes) and as *Taqman* probe (red box) to real-time PCR quantification. The shown regions have been found using the *Primer express 1.5* software (*Applied Biosystems*).

Finalment, es pot concloure que aquest treball aporta elements que justifiquen la necessitat de seqüenciar el genoma complet d'una espècie marró de GSB, per tal de facilitar els treballs de genètica funcional. Disposar de la seqüència completa del genoma d'una espècie marró de GSB permetria dur a terme treballs d'inactivació gènica i conseqüent

obtenció de mutants. En el cas que ens ocupa seria de gran interès disposar de mutants a nivell de síntesi de carotenoides que permetessin aprofundir en l'estudi de les funcions d'aquests pigments a les espècies objecte d'estudi.

6. Discussió general

6. Discussió general

En bacteris vermells del sofre són molts els treballs que tracten de l'estudi dels carotenoides. En aquest grup bacterià, la funció d'aquests pigments ha estat àmpliament investigada. Fraser *et al.* (2001) han descrit recentment tres funcions per aquests pigments: (1) fotoprotecció de l'aparell fotosintètic, (2) antena accessòria i (3) paper estructural.

La funció fotoprotectora ja va ser descrita l'any 1955 per Griffiths amb experiments duts a terme amb l'espècie *Rhodobacter sphaeroides*. Les cèl·lules sense carotenoides, sotmeses a condicions d'oxigenació i sota il·luminació morien, mentre que les cèl·lules a les quals no se'ls modificava el contingut de carotenoides eren capaces de sufocar l'excés d'excitació i protegir-se de l'oxidació mitjançant dues vies d'actuació. Els carotenoides són capaços, d'una banda, d'extingir directament l'excitació de l'oxigen molecular i, d'altra banda, de fotoprotegir les molècules de bacterioclороfil·la (BCl), extingint la fluorescència dels monòmers excitats de BCl(en estat *triplet*). Aquesta segona estratègia de fotoprotecció és la que domina *in vivo* (Fraser *et al.*, 2001) i implica certa proximitat entre les molècules de BCl i les de carotenoides, la qual cosa ha estat confirmada gràcies a la resolució de l'estructura cristal·logràfica dels centres de reacció (CR) i els complexos LH 2 de *Rhodobacter sphaeroides* (Yeates *et al.*, 1988; McDermott *et al.*, 1995 i Koepke *et al.*, 1996).

En bacteris verds del sofre però els carotenoides no han estat ben estudiats ni des del punt de vista funcional ni estructural. Només recentment aquests pigments han despertat l'interès dels investigadors tant pel que fa a la seva localització dins l'antena dels GSB com per les relacions que estableixen amb els altres pigments de l'aparell fotosintètic. Arellano i col·laboradors en una sèrie de treballs (2000a, b; 2001 i 2002) han descrit un seguit de propostes pel que fa a la funció d'aquests pigments dins l'aparell fotosintètic dels GSB i que poden resumir-se en fotoprotecció i cohesió estructural dels clorosomes. El present treball posa de manifest dos conclusions evidents; per una banda que el contingut de carotenoides a les espècies marrons de GSB supera àmpliament el necessari per dur a terme les seves funcions i que els isòmers *cis* dels carotenoides no són artefactes generats durant la manipulació de les mostres sinó que són pigments constituents del sistema i que porten a terme una funció ben definida. De fet, alguns autors ja han descrit que els carotenoides, depenent de la configuració que presentin, realitzaran una funció o altre dins

l'aparell fotosintètic. Els isòmers tipus *trans* durien a terme funcions com a pigments accessoris de l'antena i els tipus *cis* realitzarien funcions de fotoprotecció dels CR (Koyama i Fujii, 1999). Un exemple concret seria l'existència de carotenoides amb configuració *cis* en l'aparell fotosintètic de *Chlorobium tepidum*. En els CR d'aquesta espècie s'han trobat 13-*cis* i 15-*cis*-carotenoides (Grazyna, 1998), demostrant que la presència de carotenoides amb configuració *cis* no és exclusiva dels CR de tipus II (Bacteris Vermells del Sofre i *Chloroflexus*).

Una hipòtesi que permetria explicar l'elevat contingut de carotenoides en espècies marrons de GSB estaria relacionada amb les funcions estructurals que desenvolupen aquests pigments en l'organització dels clorosomes. Això implica que aquests pigments han de trobar-se molt propers a la làmina basal del clorosoma, o bé per sota els elements cilíndrics de BCl antena, en contacte amb la làmina basal, o bé dins la pròpia làmina basal, reforçant la unió dels clorosomes a la membrana plasmàtica. L'estructura lineal dels isòmers amb configuració *trans*, trobats en una proporció de 2 a 1 respecte els isòmers *cis* a totes les mostres estudiades, tant poblacions naturals com cultius de laboratori, recolzarien aquesta hipòtesi, encara que no hagi estat publicat cap treball al respecte.

Una altra possibilitat seria considerar que els carotenoides actuïn d'antena accessòria, malgrat que tampoc hagi estat demostrada la transferència d'energia entre aquests pigments i les molècules de BCl en GSB. L'elevada relació entre l'Isr i el β -Isr determinada en poblacions naturals en el present treball recolzaria aquesta hipòtesi alhora que assegura la protecció davant episodis d'oxigenació als quals poden estar sotmeses les poblacions naturals.

Una darrera hipòtesi per explicar l'elevat contingut de carotenoides als GSB, especialment a les espècies marrons, estaria relacionada amb la síntesi d'aquests pigments com a embornals de carboni. Atès que a l'aparell fotosintètic dels GSB no hi hauria les restriccions espacials imposades per un entorn proteic fix com ocorre en el cas dels bacteris vermells del sofre, no seria arriscat pensar en els clorosomes com a dipòsits de carboni (en forma de pigment). L'acumulació de carboni no respondria a un emmagatzematge per una futura re-utilització sinó més aviat com un lloc on es dipositarien els excedents de biosíntesi pigmentaria quan les condicions ambientals no permetessin un creixement actiu de la població. L'esmentada acumulació doncs podria atribuir-se simplement al fet que sense impediments d'espai, com s'ha intuït anteriorment, es pot crear una situació

d'equilibri termodinàmic entre les configuracions *trans/cis*, pel qual els diferents isòmers es van acumulant en un entorn favorable. Situació similar seria aplicable als homòlegs secundaris de BCI. La poca quantitat de carotenoides i la pràctica absència d'homòlegs secundaris de BCI observada en cultius de GSB creixent en quimiostats, on les condicions de creixement estan plenament controlades i on es pot evitar el dèficit de nutrients i es garanteix el creixement actiu, dóna suport a aquesta hipòtesi. Assumint la manca de corroboracions experimentals al respecte un nou treball de recerca pot ser plantejat com a línia d'investigació per a un futur proper.

Finalment cal assenyalar que la seqüenciació d'una soca marró de GSB seria de gran ajut per tal d'acabar de resoldre els interrogants entorn a les funcions i localització dels carotenoides als GSB. Disposar de mutants per a la síntesi de carotenoides, mitjançant tècniques moleculars d'inactivació gènica i/o mutagènesi dirigida, permetria acabar de resoldre els interrogants plantejats al voltant d'aquests pigments en GSB.

7. Conclusions

7. Conclusions

Primera. Els dos mètodes de cromatografia líquida d'alta resolució utilitzats en aquest treball permeten una anàlisi detallada i precisa de la diversitat de carotenoides bacterians així com les seves variacions qualitatives i quantitatives.

Segona. La combinació d'un pre-tractament dels extractes pigmentaris amb columnes d'alúmina amb el mètode EP està indicat quan interessa conèixer de manera detallada la composició en carotenoides sense prendre especial atenció a d'altres pigments. En canvi, el mètode NP permet la discriminació de tot tipus de pigments i ofereix una resolució excel·lent per a les bacterioclòrfiles i els seus homòlegs així com pels diferents tipus de carotenoides i els seus isòmers. Aquest mètode està indicat per a mostres complexes ja siguin de camp, sediments o cultius de laboratori.

Tercera. L'aplicació del mètode NP a mostres de sediments lacustres de 0,7–1,5 milions d'anys d'antiguitat ha permès la identificació de pigments signatura de les espècies marrons de GSB, sobretot Isr i β -Isr. Això permet suggerir que aquests microorganismes han estat presents a l'àrea lacustre de Banyoles al menys des del Pleistocè inferior i que la cubeta ancestral d'on pertanyen els sediments registrava episodis d'anòxia fòtica.

Quarta. Les relacions molars *trans/cis* de l'Isr i el β -Isr no varien després de tractar els extractes pigmentaris de *Chlorobium phaeobacteroides* CL1401 durant 2h a la foscor amb diferents agents químics amb caràcter reductor i amb caràcter oxidant. Això permet concloure que el contingut d'isòmers de l'Isr, β -Isr i β -Car són constitutius de la cèl·lula i no són artefactes produïts durant la manipulació de les mostres. D'acord amb això s'assumeix que les possibles variacions d'aquestes relacions molars així com del contingut d'aquests pigments són conseqüència de la resposta fisiològica de les cèl·lules davant canvis en les condicions de creixement.

Cinquena. Per a diferents espècies de GSB, les relacions molars *trans/cis* de l'Isr i el β -Isr es mantenen constants, al voltant de dos isòmers *trans* per cada isòmer *cis*, independentment a les condicions d'il·luminació. Aquestes relacions tampoc varien ni en clorosomes de dos espècies marrons de GSB ni en mostres obtingudes de poblacions

naturals d'aquests microorganismes. Això semblaria indicar que cada tipus d'isòmer presenta unes funcions determinades dins l'aparell fotosintètic dels GSB.

Sisena. La proporció entre l'Isr i el β -Isr en mostres de poblacions naturals de *Chl. phaeobacteroides* és entre 3 i 5 vegades superior a la calculada pels cultius de laboratori, indicant un major contingut d'Isr en ambients naturals. Aquesta dominància pot tenir a veure amb el paper fotoprotector d'aquest carotè o bé amb la capacitat d'aquest de protegir la BCl *a* davant possibles episodis d'oxigenació de la zona d'interfase. D'altra banda, no es pot descartar tampoc que l'Isr, o el β -Isr, actuïn d'antena accessòria, facilitant l'absorció de llum en situacions limitants.

Setena. La relació lineal observada entre la concentració dels diferents homòlegs de BCl antena (*e* o *c*) i els carotenoides en les espècies de GSB estudiades suggereix una regulació conjunta de la seva síntesi, necessària pel bon funcionament i estructuració de l'aparell fotosintètic. Aquesta regulació es donaria a nivell molecular i tindria els seu punt clau a nivell del geranilgeraniol pirofosfat, el precursor metabòlic de la síntesi tant de BCl_f, BCl secundaris, BCl *a* i carotenoides.

Vuitena. La detecció i quantificació per cromatografia líquida d'alta resolució de BCl₆₆₃, l'acceptor primari d'electrons en la cadena de transport electrònica dels GSB, permet la quantificació del nombre de centres de reacció en extractes pigmentaris d'aquests microorganismes.

Novena. Sota condicions de baixa llum ($1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el nombre de centres de reacció (CR) per clorosoma augmenta en la majoria d'espècies estudiades. Tot i així, cada CR tindria un domini fix d'unes 2.000 BCl antena, la qual cosa implica que la cèl·lula sintetitzaria les molècules adients per mantenir aquesta proporció constant durant el creixement. D'acord amb aquestes dades la resposta adaptativa dels GSB per fer front a situacions de limitació lumínica implicaria un augment en el nombre d'unitats fotosintètiques.

Desena. El nombre promig de centres de reacció per clorosoma en GSB és de 70. S'ha de destacar però que aquest valor pot oscil·lar depenent de l'espècie estudiada i de les condicions d'il·luminació a les que creixen els microorganismes.

Onzena. L'estimació del nombre de clorosomes per cèl·lula dona uns resultats d'uns 400, depenent de l'espècie estudiada i de les condicions de creixement, considerant que aquesta estimació dona un valor màxim de la relació estudiada, com si tota la superfície cel·lular es trobés ocupada per clorosomes.

Dotzena. Els encebadors específics dissenyats permeten la detecció d'espècies marrons de GSB en comunitats naturals d'aquests bacteris o bé en cultius mixtes. Creiem que aquest marcador molecular pot ser de gran ajuda en estudis d'ecologia microbiana centrats en aquest grup de microorganismes i obre la porta a l'aplicació de tècniques de quantificació selectiva basades en biologia molecular com ara fluorescència d'hibridació *in situ* o la PCR en temps real.

8. Bibliografia

- Aaij, C. and P. Borst. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **269**: 192.
- Abellà, C.A. 1980. *Dinàmica poblacional comparada de bacterias fotosintéticas planctónicas*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Achenbach, L.A., J. Carey and M.T. Madigan. 2001. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (7): 2922–2926.
- Airs, R.L., J.E. Atkinson and B.J. Keely. 2001. Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *Journal of Chromatography A*, **917**: 167–177.
- Airs, R.L., J.E. Atkinson and B.J. Keely. 2002. Atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry of bacteriochlorophylls from Chlorobiaceae: characteristic fragmentations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**: 453–461.
- Arellano, J.B., J. Psencik, C.M. Borrego, Y.Z. Ma, R. Guyoneaud, J. Garcia-Gil and T. Gillbro. 2000a. Effect of carotenoid biosynthesis inhibition on the chlorosomes organization in *Chlorobium phaeobacteroides* strain CL1401. *Photochem. Photobiol.*, **71**(6): 715–723.
- Arellano, J.B., T.B. Melo, C.M. Borrego, J. Garcia-Gil and K.R. Naqvi. 2000b. Nanosecond laser photolysis studies of chlorosomes and artificial aggregates containing bacteriochlorophyll *e*: evidence for the proximity of carotenoids and bacteriochlorophyll *a* in chlorosomes from *Chlorobium phaeobacteroides* strain CL1401. *Photochem. Photobiol.*, **72**(5): 669–675.
- Arellano, J.B., C.M. Borrego, A. Martinez-Planells and J. Garcia-Gil. 2001. Effect of carotenoid deficiency on cells and chlorosomes of *Chlorobium phaeobacteroides*. *Arch. Microbiol.*, **175**(3): 226–233.
- Arellano, J.B., T.B. Melo, C.M. Borrego and K.R. Naqvi. 2002. Bacteriochlorophyll *e* monomers, but not aggregates, sensitize singlet oxygen: implications for a self-photoprotection mechanism in chlorosomes. *Photochem. Photobiol.*, **76**(4): 373–380.
- Armstrong, G.A. 1995. Structure and function of the *crt* genes and gene products. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic Bacteria*, pp: 1135–1157. Kluwer Academic Publishers.
- Bañeras, L. 1996. Ecologia i fisiologia dels bacteris fototròfics del sofre en relació amb el cicle del fòsfor. Tesi doctoral. Universitat de Girona.
- Bech, J.B. 1970. Nuevo hallazgo de Hippopotamus amphibius major en Banyoles (Girona). *Acta Geológica Hispánica*, **2**: 52–53.
- Beer-Romero, P., J.L. Favinger and H. Gest. 1988. Distinctive properties of bacilliform photosynthetic heliobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**: 451–454.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd edition). *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Boone, D.R. and R.W. Castenholz (eds.). Vol.I.
- Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). 1995. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, pp: 399–435. Kluwer Academic Publishers.

- Borrego, C.M. 1992. *Estudis sobre el creixement de Bacteris Fototròfics del sofre a l'Estany de Banyoles*. Tesina de Llicenciatura. Universitat de Girona.
- Borrego, C.M., L.J. Garcia-Gil, L. Bañeras and R.C. Brunet. 1993. Changes in the composition of phototrophic sulphur bacterial communities in three basins of lake Banyoles. *Vehr. Int. Verein. Limnol.*, **25**: 720–725.
- Borrego, C.M. and L.J. Garcia-Gil. 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynthesis Research*, **41**: 157–163.
- Borrego, C.M. and L.J. Garcia-Gil. 1995. Rearrangement of light harvesting bacteriochlorophyll homologues as a response of green sulphur bacteria to low light intensities. *Photosynthesis Research*, **45**: 21–30.
- Borrego, C.M. 1996. *Heterogeneïtat pigmentària en els bacteris fotosintètics verds. Fisiologia i significació ecològica*. Tesi doctoral. Universitat de Girona.
- Borrego, C.M., J.B. Arellano, C.A. Abellà, T. Gillbro and L.J. Garcia-Gil. 1999. The molar extinction coefficient of bacteriochlorophyll *e* and the pigment stoichiometry in *Chlorobium phaeobacteroides*. *Photosynthesis Research*, **60**: 257–264.
- Braumann, T., H. Vasmel, L.H. Grimme and J. Ames. 1986. Pigment composition of the photosynthetic membrane and reaction center of the green bacterium *Prosthecochloris aestuarii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **848**: 83–91.
- Britton, G. 1995. UV/Visible spectroscopy. In: Britton, G., S.Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds.). *Carotenoids*, vol. 1B, pp: 13–62. Birkhauser Verlag, Berlin.
- Broch-Due, M., J.G. Ormerod and B. Fjerdings. 1978. Effect of light intensity on vesicle formation in *Chlorobium*. *Arch. Microbiol.*, **116**: 269–274.
- Brock, T.D., M.L. Brock, T.L. Bott and M.R. Edwards. 1971. Microbial life at 90 °C: the sulfur bacteria of Boulder Spring. *J. Bacteriol.*, **107**: 303–314.
- Bruce, B.D., R.C. Fuller and R.E. Blankenship. 1982. Primary photochemistry in the facultatively aerobic green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 6532–6536.
- Brune, D.C., T. Nozawa and R.E. Blankenship. 1987. Antenna organization in green photosynthetic bacteria. Oligomeric bacteriochlorophyll *c* in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes. *Biochemistry*, **26**: 8644–8652.
- Brune, D.C., G.H. King and R.E. Blankenship. 1988. Interactions between bacteriochlorophyll *c* molecules in oligomers and in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. In: Scheer, H. and S. Schneider (eds.), *Photosynthetic light harvesting systems*, De Gruyter & Co., pp:141–151.
- Bryant, D., G. Guglielmi, N. Tandeau de Marsac, A.M. Castets and G. Cohen-Bazire. 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes : a model. *Arch. Microbiol.*, **123**: 113–127.
- Bryant, D., E. V. Vassilieva, N-U. Frigaard and Hui Li. 2002. Selective protein extraction from *Chlorobium tepidum* chlorosomes using detergents. Evidence that CsmA forms multimers and binds bacteriochlorophyll *a*. *Biochemistry* **41**(48): 14403-11.

- Büttner, M., D.L. Xie, H. Nelson, W. Pinther, G. Hauska and N. Nelson. 1992a. Photosynthetic reaction centers genes in green sulphur bacteria and in Photosystem-I are related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8135–8139.
- Büttner, M., D.L. Xie, H. Nelson, W. Pinther, G. Hauska and N. Nelson. 1992b. The Photosystem-I like reaction center of green sulphur bacteria is a homodimer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1101**: 154–156.
- Byrdwell, W.C. 2001. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, **36** (4): 327–346.
- Caple, M.B., H. Chow and C.E. Strouse. 1978. Photosynthetic pigments of green sulfur bacteria. The esterifying alcohols of bacteriochlorophylls *c* from *Chlorobium limicola*. *J. Biol. Chem.*, **253**: 6730–6737.
- Casamayor, O., H. Schäfer, Ll. Bañeras, C. Pedrós-Alió and G. Muyzer. 2000. Identification and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulphurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 499–508.
- Chiefari, J., K. Griebenow, N. Griebenow, T.S. Balaban, A.R. Holzwarth and K. Schaffner. 1995. Models for the pigment organization in the chlorosomes of photosynthetic bacteria: diastereoselective control of *in vitro* bacteriochlorophyll *c* aggregates. *J. Phys. Chem.*, **99**: 1357–1365.
- Clayton, R.K. 1980. *Photosynthesis: physical mechanisms and chemical patterns*. I.U.P.A.B. Biophysics Series, Cambridge University Press.
- Clifford, D.J., J.L. Clayton and J.S. Sinningue Damsté. 1998. 2,3,6-/ 3,4,5-Trimethyl substituted diaryl carotenoid derivatives (Chlorobiaceae) in petroleum of the Belarussian Pripyat River Basin. *Organic Geochemistry*, **29**: 1253–1267.
- Cogdell, R.J., T. Gillbro, P.O. Andersson, R.S.H. Liu and A.E. Asato. 1994. Carotenoids as accessory light-harvesting pigments. *Pure and Appl. Chem.*, **66**: 1041–1046.
- Cohen-Bazire, G. 1963. Some observations on the organization of the photosynthetic apparatus in purple and green bacteria. In: Gest, H., San Pietro, A. and Vernon, L.P. (eds.). *Bacterial Photosynthesis*, pp: 89–110. The Antioch Press. Yellow Springs, Ohio.
- Compton, T. 1990. Degenerate primers for DNA amplification. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. White (eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. pp: 39–45. Academic Press, San Diego.
- Connolly, J.S., E.B. Samuel, F. Janzen. 1982. Effects of solvent on the fluorescence properties of bacteriochlorophyll *a*. *Photochem. Photobiol.*, **36**: 565–574.
- Connor, A.E. and G. Britton. 1990. High performance liquid chromatography analysis of the pigments of purple photosynthetic bacteria. In: Baltscheffsky, M. (ed.). *Current Research in Photosynthesis*, Vol.II. Kluwer, Dordrecht, pp: 53–56.
- Coolen, M.J.L. and J. Overmann. 1998. Analysis of Subfossil Molecular Remains of Purple Sulfur Bacteria in a lake Sediment. *Appl. Envir. Microbiol.*, **64**: 4513–4521.
- Craft, N.E. 1992. Carotenoid Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Methods: Reference compendium. *Methods in Enzimology. Carotenoids*, vol. 213, pp: 185–205.

- Cristina, X.P. 2000. Ecologia Microbiana de bacteris fototròfics en llacs estratificats: Els consorcis fotosintètics. Aplicacions de la citometria de flux. Tesi doctoral. Universitat de Girona.
- Cunningham, F.X., Z. Sun, D. Chamovitz, J. Hirschberg and E. Gantt. 1994. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Plant Cell*, **6**: 1107–1121.
- Demmig-Adams, B. and W.W. Adams. 2002. Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, **298**: 2149–2153.
- Döring, G., G. Renger, J. Vater and H.J. Witt. 1969. *Properties of the photoactive chlorophyll a₁₁ in photosynthesis*. *Z. Naturforsch*, **24b**: 1139–1143.
- Dutton, H.J., W.M. Manning and B.M. Duggar. 1943. Chl fluorescence and energy transfer in the diatom *Nitzschia closterium*. *J. Phys. Chem.*, **47**: 308–317.
- Eisen, J.A., K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.F. Heidelberg, M. Wu, R.J. Dodson, R. Deboy, M.L. Gwinn, W.C. Nelson, D.H. Haft, E. K., *et al.* 2002. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (14): 9509–9514.
- Fasman, G.D. (ed.). 1976. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Physical Chem. I, 3rd, ed. CRC Press, Cleveland, Ohio, pp. 122–130.
- Feick, R.G., M. Fitzpatrick and R.C. Fuller. 1982. Isolation and characterization of cytoplasmic membrane and chlorosomes from the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.*, **150**: 905–915.
- Feick, R.G. and R.C. Fuller. 1984. Topography of the photosynthetic apparatus of *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochemistry*, **23**: 3693–3700.
- Feiler, U., D. Albouy, M. Lutz and B. Robert. 1994. Pigment interactions in chlorosomes of various green bacteria. *Photosynth. Res.*, **41**: 175–180.
- Feiler, U. and G. Hauska. 1995. The reaction center from green sulfur bacteria. In: Blankenship, R.E. *et al.* (eds.) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, pp. 665–685.
- Fenna, R.E., B.W. Mattheus, J.M. Olson and E.K. Shaw. 1974. Structure of bacteriochlorophyll-protein from the green photosynthetic bacterium *Chlorobium limicola*. Crystallographic evidence for a trimer. *J. Mol. Biol.*, **84**: 231–240.
- Ferris, M.J. and D.M. Ward. 1997. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(4): 1375–1381.
- Foidl, M., J.M. Golecki and J. Oelze. 1994. Bacteriochlorophyll *c* formation and chlorosome development in *Chloroflexus aurantiacus*. *Photosynth. Res.*, **41**: 145–150.
- Foppen, F.H. 1971. Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.*, **14**: 133–298.
- Foote, C.S., Y.C. Chang and R.W. Denny. 1970. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.*, **92**: 5216–5218.

- Francis, G.W., B. Huseby and Ø.M. Andersen. 1993. An improved HPLC system for the analysis of Photosynthetic pigments. *Chromatographia*, **35**: 189–192.
- Frank, H.A. and R.J. Cogdell. 1996. Carotenoids in Photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, **63**: 257–264.
- Fraser, N.J., H. Hashimoto and R.J. Cogdell. 2001. Carotenoids and bacterial photosynthesis: The story so far...*Photosynthesis Research*, **70**: 249–256.
- Frigaard, N.U., S. Takaichi, M. Hirota, K. Shimada, K. Matsuura. 1997. Quinones in chlorosomes of green sulfur bacteria and their role in the redox-dependent fluorescence studied in chlorosome-like bacteriochlorophyll *c* aggregates. *Archives of Microbiology*, **167**: 343–349.
- Frigaard, N.U., K. Matsuura, M. Hirota, M. Miller and R.P. Cox. 1998. Studies on the location and function of isoprenoid quinones in chlorosomes from green sulfur bacteria. *Photosynth. Res.*, **58**: 81–90.
- Frigaard, N.U., G.D. Voigt and D.A. Bryant. 2002. *Chlorobium tepidum* mutant lacking bacteriochlorophyll *c* made by inactivation of the *bchK* gene, encoding bacteriochlorophyll *c* synthase. *Journal of Bacteriology*, **184** (12): 3368–3376.
- Furhmann, S., J. Overmann, N. Pfennig and U. Fisher. 1993. Influence of vitamin B₁₂ and light on the formation of chlorosomes in green and brown-colored *Chlorobium* species. *Arch. Microbiol.*, **160**: 193–198.
- Gallagher, S.R. 1989. Quantification of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (eds.). *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Gantt, E. 1986. Phycobilisomes. In: Staehelin, L.A. and C.J. Arntzen (eds.). *Photosynthesis*, Vol. III, pp. 260–268. Springer-Verlag.
- Gasol, J.M. and P.A. del Giorgio. 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, **64** (2): 197–224.
- Garcia-Gil, L.J. 1990. *Bacteris fototròfics i cicle del ferro a l'estany de Banyoles*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Garcia-Gil, L.J., F.B. Gich and X. Fuentes-Garcia. 2003. A comparative study of *bchG* from green photosynthetic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **179**: 108–115.
- Gerola, P.D. and J.M. Olson. 1986. A new bacteriochlorophyll *a*-protein complex associated with chlorosomes of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **848**: 69–76.
- Gibson, J., W. Ludwig, E. Stackebrandt and C.R. Woese. 1985. The phylogeny of the green photosynthetic bacteria: absence of a close relationship between *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 152–156.
- Giovannoni, S. 1991. The polymerase chain reaction. In: Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Gloe, A. and N. Pfennig. 1974. Occurrence of phytol and geranylgeraniol in the bacteriochlorophylls of red and green sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **16**: 93–101.

- Gloe, A., N. Pfennig, H. Brockman and W. Trowitzsch. 1975. A new bacteriochlorophyll from brown-colored Chlorobiaceae. *Arch. Microbiol.*, **102**: 103–109.
- Golbeck, J.H. 1993. Shared thematic elements in photochemical reaction centers. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 1642–1646.
- Govindjee. 1999. Carotenoids in Photosynthesis: an historical perspective In: Frank, H.A., A.J. Young, G. Britton and R.E. Cogdell (eds.). *The photochemistry of carotenoids*, pp: 161–188. Kluwer Academic Publishers.
- Grazyna, E.B.B., R. Fujii, C.H. Chen, H. Oh-oka, A. Kamiesu, K. Satoh, H. Koike and Y. Koyama. 1998. 15-Cis-carotenoids found in the reaction center of a green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* and in the Photosystem I reaction center of a cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Photosynth. Res.*, **58**: 135–142.
- Guerrero, R., E. Montesinos, I. Esteve, and C.A. Abella. 1980. Physiological adaptations and growth of purple and green sulfur bacteria in a meromictic lake (Vilar) as compared to a holomictic lake (Siso). *Developments in hydrobiology*, **3**: 161–171.
- Guerrero, R., E. Montesinos, C. Pedrós-Alió, I. Esteve, J. Mas, H. van Gemerden, P.A.G. Hofman and J.F. Bakker. 1985. Phototrophic sulfur bacteria in two spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.*, **30** (5): 919–931.
- Guyoneaud, R., C.M. Borrego, A. Martínez-Planells, E.T. Buitenhuis and L.J. Garcia-Gil. 2001. Light responses in the green sulfur bacterium *Prosthecochloris aestuarii*: changes in prosthecae length, ultrastructure, and antenna pigment composition. *Arch. Microbiol.*, **176**: 278–284.
- Harwood, L.M. and T.D.W. Claridge. 1997. *Introduction to organic spectroscopy*. Oxford University Press, pp: 70–83.
- Hauska, G., T. Schoedl, H. Remigy and G. Tsiotis. 2001. The reaction center of green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1507**: 260–277.
- Hagiwara, T., T. Yasuno, K. Funayama and S. Suzuki. 1998. Determination of lycopene, alpha-carotene and beta-carotene in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **708** (1–2): 67–73.
- Hildebrandt, P., H. Tamiaki, A.R. Holzwarth and K. Schaffner. 1994. Resonance Raman spectroscopic study of metallochlorin aggregates. Implications for the supramolecular structure of chlorosomal bacteriochlorophyll *c* antennae from green bacteria. *J. Phys. Chem.*, **98**: 2191–2197.
- Hirschberg, J. 1998. Molecular biology of carotenoid biosynthesis. In: Britton, G., S. Liaaen-Jensen and H. Pfander (eds.). *Carotenoids. Biosynthesis and Metabolism*, Vol. III, pp: 149–191. Birkhäuser Verlag Basel.
- Holzwarth, A.R., K. Griebenow and K. Schaffner. 1992. Chlorosomes, photosynthetic antennae with novel self-organized pigment structures. *J. Photochem. Photobiol. A.*, **65**: 61–71.
- Humphrey, G.F. and M. Wooton. 1966. *Comparison techniques used in the determination of phytoplankton pigments. Report SCOR-UNESCO*.
- Imhoff, J.F. 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic*

- photosynthetic bacteria*, *Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp: 1–15. Kluwer Academic Publishers.
- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T. White (eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. pp: 3–12. Academic Press, San Diego.
- Jørgensen, B.B., J.G. Kuenen and Y. Cohen. 1979. Microbial transformation of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai). *Limnol.Oceanogr.*, **24**: 799–822.
- Juhler, R.K. and R.P. Cox. 1990. HPLC determination of chloroplast pigments with optimized separation of lutein and zeaxanthin. *Journal of Chromatography*, **508**: 232–235.
- Julià, R.B. 1980. *La conca lacustre de Banyoles-Besalú*. Monografies del Centre d'Estudis Comarcals de Banyoles.
- Keppen, O.I., T.P. Tourova, B.B. Kuznetsov, R.N. Ivanovsky and V.M. Gorlenko. 2000. Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **50**: 1529–1537.
- Kingsley S.R. 1989. *Photosynthetic pigments of algae*. Cambridge University Press.
- Kleepe, K., E. Ohtsua, R. Kleepe, I. Molineux and H.G. Khorana. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, **56**: 341–361.
- Knudsen, E., E. Jantzen, K. Bryn, J.G. Ormerod and R. Sirevag. 1982. Quantitative and structural characteristics of lipids in *Chlorobium* and *Chloroflexus*. *Arch. Microbiol.*, **135**: 149–154.
- Kobayashi, M., E.J. Van de Meent, H. Oh-oka, K. Inoue, S. Itoh and J. Amesz *et al.* 1992. Pigment composition of heliobacteria and green sulfur bacteria. In: Murata, N. (ed.). *Research in Photosynthesis* vol. I. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, pp. 393–396.
- Kobayashi, M., H. Oh-oka, S. Akutsu, M. Akiyama, K. Tominaga, H. Kise, F. Nishida, T. Watanabe, J. Amesz, M. Koizumi, N. Ishida and H. Kano. 2000. The primary electron acceptor of green sulfur bacteria, bacteriochlorophyll 663, is chlorophyll *a* esterified with Δ 2,6-fitadienol. *Photosynthesis Research*, **63**: 269–280.
- Konopka, A. T. Bercot and C. Nakatsu. 1999. Bacterioplankton community diversity in a series of thermally stratified lakes. *Microb. Ecol.*, **38**: 126–135.
- Koopmans, M.P., J. Köster, H.M.E. Kaam-Peters, F. Kenig, S. Schouten, W.A. Hartgers, J.W. de Leeuw and J.S. Sinningue Damsté. 1996a. Diagenetic and catagenetic products of isorenieratene: molecular indicators for photic zone anoxia. *Geochimica and Cosmoquimica Acta*, **57**: 4467–4496.
- Koopmans, M.P., S. Schouten, M.E.L. Kohnen and J.S. Sinningue Damsté. 1996b. Restricted utility of aryl isoprenoids as indicators for photic zone anoxia. *Geochimica and Cosmoquimica Acta*, **60**: 4873–4876.
- Koyama, Y. and R. Fujii. 1999. *Cis-Trans* Carotenoids in photosynthesis: configurations, excited-state properties and physiological functions. In: Frank, H.A., A.J. Young, G.

- Britton and R.E. Cogdell (eds.). *The photochemistry of carotenoids*, pp: 161–188. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Krasnovsky, A.A., M.I. Bystrova and E.V. Pakshina. 1966. Effect of the magnesium atom of the pigment molecule on the spectral properties of aggregated forms of chlorophyll analogs. *Doklady Acad. nauk. SSSR (English Trans)*, **167**: 109–112.
- Krinsky, N. 1968. The protective function of carotenoid pigments. In: Glese, A.C. (ed.). *Photophysiology*, vol III, pp: 123–195. Academic Press, New York.
- Krinsky, N. 1979. Carotenoid protection against photooxidation. *Pure appl. Chem.*, **51**: 649–660.
- Krubasik, P. and G. Sandmann. 2000. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochemical Society Transactions*, **28**: 806–810.
- Krügel, H., P. Krubasik, K. Weber, H.P. Saluz and G. Sandmann. 1999. Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1439**: 57–64.
- Leroy, S. 1986. In: J. Analyse palynologique de deux nouvelles sections du Pleistocene inferieur de Banyoles (Catalogne). In: Civis Llovera and M.H. Hernández (eds.). *Actas de Palinología*, pp: 307–313. Salamanca.
- Leroy, S. 1988. Image pollinique d'une steppe du Pliocène supérieur à Bòbila Ordis, Banyoles (Catalogne). *Inst. fr. Pondichéry. trav. sec. sci. tech.* **25**: 197–207.
- Liaaen-Jensen, S., E. Heggem and L.M. Jackman. 1964. Bacterial carotenoids: The carotenoids from photosynthetic green bacteria. *Acta Chemica Scandinavica*, **18**: 1703–1718.
- Liaaen-Jensen, S. 1965. Bacterial Carotenoids: XVIII. Aryl carotenes from phaeobium. *Acta. Chem. Scand.*, **19**: 1025–1030.
- Liaaen-Jensen, S. and A.G. Andrewes. 1972. Microbial carotenoids. *Annu. Rev. Microbiol.*, **26**: 227–247.
- Liaaen-Jensen, S. 1978. Chemistry of carotenoid pigments. In: Clayton, R.K. and W.R. Sistrom (eds.). *The photosynthetic bacteria*, pp: 233–247. Plenum Publishing Corp., New York.
- Liebl, U., M. Mockensturm-Wilson, J.T. Trost, D. Brune, R.E. Blankenship and W. Vermaas. 1993. Single core polypeptide in the reaction center of the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis* – structural implications and relations to other photosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**: 7124–7128.
- Lindström, E.S. 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **27**: 163–174.
- Lowry, O.H., N.H. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265–275.
- Mack, D and J.J. Sninsky. 1998. A sensitive method for the identification of uncharacterized viruses related to known virus groups: hepadnavirus model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6977–6981.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. *Brock. Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Magnin, N., R.P. Cox and M. Miller. 1998. Cloning of genes in the biosynthesis of bacteriochlorophyll and heme in *Chlorobium tepidum*. Proc. With International Congress on Photosynthesis. Budapest. pp: 2865–2868.
- Mantoura, R.F.C. and C.A. Llewellyn. 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase HPLC. *Analytica Chimica Acta*, **151**: 297–314.
- Mares-Perlman, J.A., A.E. Millen, T.L. Ficek and S.E. Hankinson. 2002. *J. Nutr.*, **132**: 518S
- Martínez-Planells, A., J.B. Arellano, C.M. Borrego, C. López-Iglesias, F. Gich and J. Garcia-Gil. 2002. Determination of the topography and biometry of chlorosomes by atomic force microscopy. *Photosynth. Res.*, **71**: 83–90.
- Matsuura, K., M. Hirota, K. Shimada and M. Mimuro. 1993. Spectral forms and orientation of bacteriochlorophylls *c* and *a* in chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Photochem. Photobiol.*, **57**: 92–97.
- McColl, R. and D. Guard-Friar. 1987. *Phycobiliproteins*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Metsä-Ketelä, M., L. Halo, E. Munukka, J. Hakala, P. Mäntsälä and K. Ylihonko. 2002. Molecular evolution of aromatic Polyketides and comparative sequence analysis of Poliketide Ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (9): 4472–4479.
- Meyer, T.E. and T.J. Donohue. 1995. Cytochromes, iron-sulfur, and copper proteins mediating electron transfer from the Cyt *bc*₁ complex to photosynthetic reaction center complexes. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp: 725–745. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Miller, M., T. Gillbro and J.M. Olson. 1993a. Aqueous aggregates of bacteriochlorophyll *c* as a model for pigment organization in chlorosomes. *Photochem. Photobiol.*, **57**(1): 98–102.
- Miller, M., D. Simpson and T.E. Redlinger. 1993b. The effect of detergent on the structure and composition of chlorosomes isolated from *Chloroflexus aurantiacus*. *Photosynth. Res.*, **35**: 275–283.
- Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura and K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of genes products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**: 6704–6712.
- Montaño, G., H.M. Wu, S. Lin, D.C. Brune and R.E. Blankenship. 2000. Isolation and characterization of the B795 baseplate light-complex from the chlorosomes of *Chloroflexus aurantiacus*. *Abstracts of 10th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*. Barcelona. Spain, August 26–31, 2000.
- Montesinos, E. 1981. Crecimiento y actividad de las bacterias fotosintéticas del azufre en relación con gradientes físico-químicos en ecosistemas acuáticos. *Actas del primer Congreso Español de Limnología*, pp: 131–137.

- Montesinos, E. 1982. *Ecofisiología de la Fotosíntesis Bacteriana*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Montesinos, E., R. Guerrero, C.A. Abella and I. Esteve. 1983. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium phaeobacteroides* in natural habitats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1007–1016.
- Montesinos, E. and H. van Gernerden. 1986. The distribution and metabolism of planktonic phototrophic bacteria. In: Megusar, F. and M. gantar (eds.), *Proceedings of the IV ISME*, pp: 349–359. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana.
- Moffitt, M.C and B.A. Neilan. 2003. *Evolutionary affiliations within the superfamily of Ketosynthases reflect complex pathway associations*. Springer-Verlag New York Inc.
- Mortensen, A. and L.H. Skibsted. 1999. Carotenoid photobleaching. *Methods in Enzimology*, **299**: 408–421.
- Mullis, K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro: a polymerase catalysed chain reaction. *Methods enzimol.*, **155**: 335–350.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 695–700.
- Nelis, H.J.C.F. and A.P. De Leenheer. 1983. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Anal. Chem.*, **55**: 270–275.
- Nelis, H.J.C.F. and A.P. De Leenheer. 1989. Profiling and quantification of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 3065–3071.
- Nitschke, W. and A.W. Rutherford. 1991. Photosynthetic reaction centres: variations on a common structural theme? *Trends Biochem. Sci.*, **16**(7): 241–245.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, M. Suzuki, Y. Morishita and M. Madigan. 1993. Structures and organization of bacteriochlorophyll *c*'s in chlorosomes from a new thermophilic bacterium *Chlorobium tepidum*. *Bull Chem. Soc. Jpn.*, **66**: 231–237.
- Nozawa, T., K. Ohtomo, M. Suzuki, H. Nakagawa, Y. Shikama, H. Konami and Z.Y. Wang. 1994. Structures of chlorosomes and aggregated BChl *c* in *Chlorobium tepidum* from solid state high resolution CP/MAS ¹³C NMR. *Photosynth. Res.*, **41**: 211–223.
- Nunberg, J.H., D.K. Wright, G.E. Cole, E.A. Petrovskis, L.E. Post, T. Compton and J.H. Gilbert. 1989. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerated oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. *J. Virol.*, **63**: 3240–3249.
- Oelze, J. And J.R. Golecki. 1995. Membranes and chlorosomes of green bacteria: structure, composition and development. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Oliver, R.W.A. 1989. *HPLC of macromolecules (A practical approach)*. IRL Press.
- Olson, J.M. 1971. Bacteriochlorophyll-protein of green photosynthetic bacteria. In: San Pietro, A. (ed.). *Methods in Enzimology*, Vol.23, Part A, pp: 636–639. Academic Press.

- Olson, J.M. 1978. bacteriochlorophyll *a* proteins from green bacteria. In: Clayton, R.K. and R.S. Sistrom (eds.). *The photosynthetic bacteria*, pp: 161–168. Plenum Press.
- Olson, J.M. 1998. Chlorophyll organization and function in Green Photosynthetic Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, **67**: 61–75.
- Olson, J.M. and J.P. Pedersen. 1988. Bacteriochlorophyll *c* aggregates in carbon tetrachloride as models for chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria. In: Scheer, H. and S. Schneider (eds.), *Photosynthetic Light Harvesting Systems*, pp: 365–373. De Gruyter.
- Olson, J.M. and J.P. Pedersen. 1990. Bacteriochlorophyll *c* monomers, dimmers and higher aggregates in dichloromethane, chloroform and carbon tetrachloride. *Photosynth. Res.*, **25**: 25–37.
- Overmann, J., M.J.L. Coolen and C. Tuschak. 1999. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. *Arch. Microbiol.*, **172**: 83–94.
- Pachmayr, F. 1960. *Vorkommen und bestimmung von schwefelverbindungen in mineral wasser*. PhD. Thesis. Universitat de Munich.
- Peck, R.F., E.A. Johnson and M.P. Krebs. 2002. Identification of a lycopene β -cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *J. Bacteriol.*, **184**: 2889–2897.
- Permentier, H.P., K.A. Schmidt, M. Kobayashi, M. Akiyama, C. Hager-Braun, S. Neerken, M. Miller and J. Amesz. 2000. Composition and optical properties of reaction center core complexes from the green sulfur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chl. tepidum*. *Photosynth. Res.*, **64**: 27–39.
- Petersen, B.L., M.G. Møller, B.M. Stummann and K.W. Henningsen. 1996. Clustering of genes with function in the biosynthesis of bacteriochlorophyll and heme in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Hereditas*, **125**: 93–96.
- Pfander, H., R. Riesen and U. Niggli. 1994. HPLC and SFC of carotenoids scope and limitations. *Pure and Appl. Chem*, **66**: 947–954.
- Pfennig, N. 1989. Green Bacteria. In: Stanley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. III, pp: 1682–1707. Williams & Willkins, Baltimore.
- Pierson, B.K. and J.P. Thornber. 1983. Isolation and spectral characterization of photochemical reaction centers from the thermophilic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* strain J-10-fl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 80–84.
- Pierson, B.K. and J.M. Olson. 1989. Evolution of photosynthesis in anoxygenic phototrophic prokaryotes. In: Cohen, Y. and E. Rosenberg (eds.). *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*, pp: 402–427. American Society of Microbiology.
- Pierson, B.K. and R.W. Castenholz. 1992a. Taxonomy and physiology of filamentous anoxygenic phototrophs. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol.II, pp: 31–47. Kluwer Academic Publishers.

- Pierson, B.K. and R.W. Castenholz. 1992b. The family Chloroflexaceae. In: Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*, pp: 3754–3774, 2^a edició, Springer-Verlag.
- Pierson, B.K. and R.W. Castenholz. 1995. Taxonomy and physiology of filamentous anoxygenic phototrophs. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol.II, pp: 31–47. Kluwer, Dordrecht Boston London.
- Pringault, O., M. Kühl, R. de Witt and P. Caumette. 1998. Growth of green sulfur bacteria in experimental benthic oxygen, sulphide, pH and light gradients. *Microbiology*, **144**: 1051–1061.
- Prokhorenko, V.I., D.B. Steensgaard and A.R. Holzwarth. 2000. Exciton dynamics in the chlorosomal antennae of the green bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Chlorobium tepidum*. *Biophys. J.*, **79**: 2105–2120.
- Ramakrishnan, L., H.T. Tran, N. Federspiel and S. Falkow. 1997. A *crtB* homolog essential for photochromogenicity in *Micobacterium marinum*: isolation, characterization, and gene disruption via homologous recombination. *J. Bacteriol.*, **179**: 5862–5868.
- Rémigy, H.W., H. Stahlberg, D. Fotiadis, B. Wolpensinger, A. Engel, G. Hauska and G. Tsiotis. 1999. The reaction center complex from the green sulfur bacterium *C.tepidum* by scanning transmission electron microscopy. *J.Mol. Biol.*, **290**: 851–858.
- Rémigy, H.W., G. Hauska, S.A. Müller and G Tsiotis. 2002. The reaction centre from green sulphur bacteria: progress towards structural elucidation. *Photosynthesis Research*, **71**: 91–98.
- Repeta, D.J. 1993. A high resolution historical record of Holocene anoxygenic primary production in the Black Sea. *Geochimica and Cosmoquimica Acta*, **57**: 4337–4342.
- Rose, T.M., E.R. Schultz, J.G. Henikoff, S. Pietrokovski, C.M. McCallum and S. Henikoff. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acid Research*, **26**(7): 1628–1635.
- Roy, S. 1987. High performance liquid chromatography analyses of chloropigments. *J. Chromatogr.*, **391**: 19–34.
- Sabarís, S.L. 1957. Empordá et region volcanique d'Olot. INQUA. *V Congr. International*, Barcelone-Madrid.
- Sabarís, S.L. 1958. La ramaderia a Catalunya. *Geografia de Catalunya. Editorial Aedos*, Barcelona.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487–491.
- Sakuragi, Y., N-U. Frigaard, K. Shimada and K. Matsuura. 1999. Association of bacteriochlorophyll *a* with the CsmA protein in chlorosomes of the photosynthetic green filamentous bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1413**: 172–180.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sánchez, O., H.V. Gemerden and J. Mas. 1998. Acclimation of the photosynthetic response of *Chromatium vinosum* to light-limiting conditions. *Arch. Microbiol.*, **170**: 405-410.
- Scheer, H. 1991. Structure and occurrence of chlorophylls. In: Scheer, H. (ed.), *Chlorophylls*, pp: 4–30. CRC Press.
- Schmidt, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids. In: Clayton, R.K. and W.R. Sistrom (eds.). *The photosynthetic bacteria*, pp: 729–750. Plenum Publishing Corp., New York.
- Schmidt, K. 1980. A comparative study on the composition of chlorosomes (*Chlorobium* vesicles) and cytoplasmic membranes from *Chloroflexus aurantiacus* strain Ok-70-fl and *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* strain 6230. *Arch. Microbiol.*, **124**: 21–31.
- Schmidt-Dannert, C. 2000. Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Current opinion in Biotechnology*, **11**: 255–261.
- Senge, M.O. and K.M. Smith. 1995. Biosynthesis and structures of the bacteriochlorophylls. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp: 137–151. Kluwer Academic Publishers.
- Shapiro, D.J. 1981. Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal Biochem.*, **110**: 229–232.
- Shimada, K. 1995. Aerobic anoxygenic phototrophs. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *Anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, Vol. II, pp. 105–122. Kluwer Academic Publishers.
- Siefermann-Harms, D. 1988. High performance liquid chromatography of chloroplast pigments. One-step separation of carotene and xanthophyll isomers, chlorophylls and pheophytins. *Journal of Chromatography*, **448**: 411–416.
- Sinninghe Damsté, J.S., S.G. Wakeham, M.E.L. Kohnen, J.M. Hayes and J.W. de Leeuw. 1993. A 6,000-year sedimentary molecular record of chemocline excursions in the Black Sea. *Nature*, **362**: 827–829.
- Sirevag, R.E., B.B. Buchanan, J.A. Berry and J.H. Troughton. 1977. Mechanisms of CO₂ fixation in bacterial photosynthesis studied by the carbon isotope technique. *Arch. Microbiol.*, **112**: 35–38.
- Smith, J.H. and A. Benitez. 1955. Chlorophylls: Analysis in plant materials. In: Paech, K. and Tracey M.V. (eds.). *Modern methods of plant analysis*, Vol. IV, pp. 142–146 Springer-Verlag. Berlin.
- Smith, K.M., G.W. Craig, L.A. Kehres and N. Pfennig. 1983. Reversed-phase HPLC and structural assignments of the bacteriochlorophylls *c*. *J. Chromatogr.*, **281**: 209–223.
- Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N. Ward-Rainey. 1996. Anoxygenic phototrophy across the phylogenetic spectrum: current understanding and future perspectives. *Arch. Microbiol.* **166**: 211–223.
- Staehelein, L.A., J.R. Golecki and G. Drews. 1980. Supramolecular organization of chlorosomes (*Chlorobium vesicles*) and of their membrane attachment sites in *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta*, **589**: 30–45.

- Stanier, R.Y., N. Pfennig and H.G. Trüper. 1981. Introduction to the photosynthetic prokaryotes. In: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Ballows and H.G. Schlegel (eds.). *The Prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. pp. 197–211. Springer-Verlag. Berlin-Heilderberg-New York.
- Steengaard, D.B., K. Matsuura, R.P. Cox and M. Miller. 1997. Changes in bacteriochlorophyll *c* organization during acid treatment of chlorosomes from *Chlorobium tepidum*. *Photochemistry and photobiology*, **65** (1): 129–134.
- Steengaard, D.B., C.A. van Walree, L. Bañeras, C.M. Borrego, J. Garcia-Gil and A.R. Holzwarth. 1999. Evidence for spatially separate bacteriochlorophyll *c* and bacteriochlorophyll *d* pools within the chlorosomal aggregate of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Photosynth. Res.*, **59**: 231–241.
- Steengaard, D.B., H. Wackerbarth, P. Hildebrandt and A.R. Holzwarth. 2000. Diastereoselective control of bacteriochlorophyll *e* aggregation. 3^1 -S-BChl *e* is essential for the formation of chlorosome-like aggregates. *J. Phys. Chem. B.*, **104**: 10379–10386.
- Stewart, I. and T.A. Wheaton. 1971. Continuous flow separation of carotenoids by liquid chromatography. *J. Chromatog.*, **55**: 325–336.
- Stickforth, P., S. Steiger, W.R. Hess and G. Sandmann. 2003. A novel type of lycopene ϵ -carotene in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *Arch. Microbiol.*, **179**: 409–415.
- Straub, O. 1987. *Key to Carotenoids*. Birkhäuser, Basel.
- Summons, R.E. and T.G. Powell. 1986. Chlorobiaceae in Paleozoic seas revealed by biological markers, isotopes and geology. *Nature*, **319**: 763–765.
- Takaichi, S. 1999. Carotenoids and carotenogenesis in anoxygenic photosynthetic bacteria. In: Frank, H.A., A.J. Young, G. Britton and R.E. Cogdell (eds.). *The photochemistry of carotenoids*, pp: 40–65. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Takaichi, S. 2000. Characterization of carotenes in a combination of a C₁₈ HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynth. Res.*, **65**: 93–99.
- Tamiaki, H., Miyatake, T., Tanikaga, R., Holzwarth, A.R. and Schaffner, K. 1996. Self-assembly of an artificial antenna system: energy transfer from zinc chlorine to pheophytin in a supramolecular aggregate. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **7**: 772–774.
- Taylor, R.F. 1980. Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv. Chromatograf.*, **22**: 157–213.
- Teske, A., C. Wawer, G. Muyzer and N.B. Ramsing. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1405–1415.
- Thronber, J.P. and J.M. Olson. 1968. The chemical composition of a crystalline bacteriochlorophyll-protein complex isolated from the green bacterium *Chloropsudomonas ethylica*. *Biochemistry*, **7**: 2242–2249.
- Trüper, H.G. and N. Pfennig. 1992. The family Chlorobiaceae. In: Ballows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harden and K.H. Schleifer (eds.). *The prokaryotes. A handbook*

- on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, pp: 3583–3592, 2^a Edició, Springer-Verlag.
- Uehara K. and J.M. Olson. 1992. Aggregation of bacteriochlorophyll *c* homologs to dimmers, tetramers, and polymers in water-saturated carbon tetrachloride. *Photosynth. Res.*, **33**: 251–257.
- Uehara, K., M. Mimuro, Y. Ozaki and J.M. Olson. 1994. The formation and characterization of the *in vitro* polymeric aggregates of bacteriochlorophyll *c* homologs from *Chlorobium limicola* in aqueous suspensions in the presence of monogalactosyl diglyceride. *Photosynth. Res.*, **41**: 235–243.
- van de Meent, E.J., M. Kobayashi, C. Erkelens, P.A. van Veelen, S.C.M. Otte, K. Inoue *et al.* 1992. The nature of the primary electron acceptor in green sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1102**: 371–378.
- van Dorssen, R.J., P.D. Gerola, J.M. Olson and J. Amesz. 1986. Optical structural properties of chlorosomes of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **848**: 77–82.
- van Gemerden, H. and H.H. Beeftink. 1983. Ecology of phototrophic bacteria. In: Ormerod, J.G. (ed.). *The phototrophic bacteria: anaerobic life in the light*, pp: 146–185. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- van Gemerden, H. and J. Mas. 1995. Ecology of phototrophic sulfur bacteria. In: Blankenship, R.E., M.T. Madigan and C.E. Bauer (eds.). *anoxygenic photosynthetic bacteria, Advances in Photosynthesis*, vol. II, pp: 49–85. Kluwer Academic Publishers.
- van Niel, C.B. 1971. Techniques for the enrichment, isolation and maintenance of the photosynthetic bacteria. In: San Pietro (ed.). *Methods in Enzimology*, **23**: 3–28. Academic Press.
- van Noort, P.I., C. Francke, N. Schoumans, S.C.M. Otte, T.J. Aartsma and J. Amesz. 1994. Chlorosomes of green sulphur bacteria: Pigment composition and energy transfer. *Photosynthesis Research*, **41**: 193–203.
- Verdoes, J.C., P. Krubasik, G. Sandmann and A.J.J.van Ooyen. 1999. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.*, **262**: 453–461.
- Viveiros, M., P. Krubasik, M. Houssaini-Iraqui, G. Sandman and H.L. David. 2000. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A⁺. *FEMS Microbiol. Lett.*, **187**: 95–101.
- Wang, J., D.C. Brune and R.E. Blankenship. 1990. Effect of oxidants and reductants on the efficiency of excitation transfer in green photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1015** (3): 457–463.
- Wang, Y., W.Y. Chang, G.S. Prins and R.B. van Breemen. 2001. Simultaneous determination of all-trans, 9-cis, 13-cis retinoic acid and retinol in rat prostate using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom.*, **36** (8): 882–888.
- Woese, C.R., E. Stackebrandt, T.J. Macke and G.E. Fox. 1985. The phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *System. Appl. Microbiol.*, **6**: 143–151.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Rev.*, **51**: 221–271.

- Wullink, W., J. Knudsen, J.M. Olson, T.E. Redlinger and E.F.J. Van Bruggen. 1991. Localization of polipeptides in isolated chlorosomes from green phototrophic bacteria by immuno-gold labeling electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1060**: 97–105.
- Yacobi, Y.Z., U. Pollinger, Y. Gonen, V. Gerhardt and A. Sukenik. 1996. HPLC analysis of phytoplankton pigments from Lake Kinneret with special reference to the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium gatunense* (Dinophyceae) and chlorophyll degradation products. *Journal of Plankton Research*, **18**: 1781–1796.
- Young, A.J. and G. Britton. 1989. The distribution of α -carotene in the photosynthetic pigment-protein complexes of higher plants. *Plant Science*, **64**: 179–183.
- Züllig, H. 1989. Role of carotenoids in lake sediments for reconstructing trophic history during the late Quaternary. *Journal of Paleolimnology*, **2**: 23–40.