

## CARACTERITZACIÓ ECOFISIOLÒGICA D'UN MUTANT DE *RHODOBACTER SPHAEROIDES* DEFICIENT EN LA SÍNTESI DE CAROTENOIDES

J. MAS-CASTELLÀ<sup>1</sup>, E. BALADA<sup>2</sup>, E. FONTANET<sup>2</sup>, A. PICÓN<sup>2</sup>, C. QUINTANA<sup>2</sup> i J. URMENETA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departament de Microbiologia. Universitat de Barcelona.

<sup>2</sup>Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

### SUMMARY

A mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*, altered in carotenoid biosynthesis, was compared to the wild type in relation to the physiological response of both strains to different light intensities (230-925 lux). Absorption spectra analysis showed that spheroidene, the main carotenoid present in this species, was substituted by chloroxanthin (hydroxyneurosporene) in the mutant strain. The mutation does not affect significantly the growth of the mutant under neither photoorganoheterotrophic nor chemoorganoheterotrophic metabolisms.

Mutant cells growing anaerobically at light intensities below 800 lux, surprisingly showed higher growth rates than wild type cells. At light intensities above 800 lux, growth rates of both strains were very similar. Growth rates in chemoorganotrophic metabolism were much higher than in photoorganotrophic growth for both strains. Although pigments do not intervene in non-photosynthetic metabolism, the wild type strain showed a higher growth rate than the mutant strain.

In addition to growth rate measurement, pigment content was studied in order to characterize the physiological behaviour of the mutant. In the wild type strain, specific pigment content decreased as light intensity increased. Bacteriochlorophyll and carotenoids showed the same response. On the contrary, for the mutant cells, bacteriochlorophyll specific content was much higher at high light intensities than at the lower ones. Carotenoids had very low specific content, which was independent of light intensity. Both the physiological implications and the possible ecological meaning of that behaviour are discussed.

**Paraules clau:** *Rhodobacter sphaeroides*, mutants de pigmentació, velocitat i taxa de creixement en bacteris, cloroxantina, bacterioclorigil·la *a*, intensitat de llum.

**Key words:** *Rhodobacter sphaeroides*, pigmentation mutant strains, bacterial growth rate, chloroxanthin, bacteriochlorophyll *a*, light intensity.

## INTRODUCCIÓ

*Rhodobacter sphaeroides* és un bacteri fototròfic anoxigènic que es troba inclòs en el grup de bacteris vermells no del sofre al "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (PFENNIG i TRÜPER, 1989). Anteriorment, a aquest grup se li havia donat la categoria de família, a la qual s'anomenava Rhodospirillaceae. Com a membre d'aquest grup, pot créixer aeròbicament i anaeròbicament. En cas de créixer en absència d'oxigen, i en presència de llum i compostos orgànics, porta a terme un metabolisme fotoorganoheterotròfic. En presència d'oxigen (tingui o no tingui llum), passa a realitzar un metabolisme quimioorganoheterotròfic.

La clau del seu creixement a la llum en anaerobiosi és la presència de pigments fotosintètics, molècules que permeten al bacteri captar determinades longituds d'ona de la llum que li aporten energia. Els dos principals grups de pigments fotosintètics són les bacterioclorofil·les i els carotenoides. Tots els bacteris vermells contenen bacterioclorofil·la *a* o *b*, però el color típicament verd d'aquesta molècula queda, en molts casos, totalment emmascarat pels carotenoides, que són de color variable, normalment de tonalitats vermelles o marrons. Al llarg de l'evolució, els bacteris fotosintètics han anat adoptant aquells pigments que, segons el nínxol ecològic que ocupaven, realitzaven de la manera més eficaç llur funció de captació de l'energia lluminosa. Així doncs, hom pot pensar que els bacteris mutants que tenen alterada la via de síntesi dels pigments presenten un inconvenient selectiu envers les cèl·lules salvatges.

Els bacteris fotosintètics regulen el seu contingut de bacterioclorofil·la i carotenoides, així com la seva velocitat de creixement, en funció de la quantitat de llum que reben. En el present treball hem estudiat la variació d'aquests paràmetres en la

soca tipus de *R. sphaeroides* i en una soca mutant de color verd, quan ambdues creixen amb diferents intensitats de llum. Quan hi ha oxigen en el medi, s'inhibeix la síntesi de pigments fotosintètics i s'indueix el metabolisme quimiotròfic; al mateix temps, hi ha una progressiva disminució del contingut cel·lular de pigments. En aquestes condicions, l'energia necessària pel creixement s'obté de l'oxidació de compostos orgànics. La soca mutant ha estat també estudiada respecte de la soca salvatge en relació al creixement quimioheterotròfic en presència d'oxigen.

Es reconeixen als carotenoides dues funcions essencials. Una és la de protecció de les molècules de bacterioclorofil·la de la fotooxidació produïda per la irradiació excessiva, i l'altra és l'absorció selectiva de la radiació entre 450 i 550 nm de longitud d'ona (PFENNIG, 1967). L'energia absorbida pels carotenoides passa a la bacterioclorofil·la mitjançant un fenomen anomenat "conversió interna".

En cultius de *R. sphaeroides* és relativament freqüent observar l'aparició espontània de mutants que presenten una coloració verda o verd blavosa. Aquests mutants tenen alterada la síntesi dels carotenoides. L'objectiu d'aquest treball és investigar les característiques fisiològiques d'un mutant, anomenat CrtD, que és deficient en la síntesi de carotenoides de color vermell. Hom discuteix quina explicació fisiològica o ecològica rau sota l'elevada freqüència d'aquest tipus de mutació.

Els bacteris amb fotosíntesi anoxigènica foren els primers organismes fototròfics que aparegueren sobre la Terra. Més tard, amb l'aparició dels cianobacteris, la concentració d'oxigen en l'atmosfera va augmentar notablement. Els microorganismes havien viscut fins aquella època amb un metabolisme totalment anaeròbic (fotosintètic o fermentatiu), però aleshores varen començar a utilitzar oxigen per oxidar compostos orgànics, descobrint una nova i

més rendible manera d'obtenir energia. A través de l'evolució, alguns microorganismes han conservat els dos tipus de metabolisme, com ara els bacteris vermells no del sofre, els quals poden adaptar-se a diferents ambients naturals amb elevades possibilitats de supervivència. El fet que bacteris com ara *Rhodobacter* presentin, avui en dia, aquesta dualitat fisiològica, permet considerar-los com a "fòssils" metabòlics.

## MATERIAL I MÈTODES

### Soques bacterianes i medi de cultiu

En aquest treball s'han utilitzat dues soques de *Rhodobacter sphaeroides*: una de salvatge, que és la soca tipus 2.4.1 (ATCC 17023), i una soca mutant verda (CrtD), que té alterada la síntesi de carotenoides. Les soques procedien del grup del Dr. Jordi Barbé, del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. El medi de cultiu utilitzat ha estat el "Luria Broth" (LB).

### Condicions de cultiu fototròfic

Els cultius fototròfics es van realitzar en absència d'oxigen en tubs de tap de rosca de 30 mL de capacitat, plens completament. En els tubs es deixava, però, una petita bombolla d'aire de la mida aproximada d'un pèsol per tal d'evitar un important increment de la pressió del líquid per canvis de temperatura. En cada tub es col·locava 3 mL d'un cultiu prèviament adaptat al creixement fototròfic i posteriorment s'omplien amb medi LB estèril. Els cultius s'incubaven a temperatura ambient (29 °C aproximadament -mes de juliol) i a diferents intensitats de llum, 230, 370 i 925 lux. La font de llum era una bombeta incandescent blanca de 60 W. Els valors de la intensitat de llum van ser mesurats amb un luxòmetre Lutron Lx-101.

Es van prendre mostres de 10 mL als 3 dies, recollint les cèl·lules per centrifugació durant 15 min a 4000 rpm i a 4 °C. Els sediments de cèl·lules obtinguts es van congelar a -20 °C fins al seu processament posterior.

### Condicions de cultiu quimiotròfic

Es van posar 10 mL de medi LB estèril, dins de tubs de 50 mL de capacitat. Es van inocular amb 0,2 mL (2 % v/v) d'un cultiu de nit del microorganisme. Els cultius es van incubar a 30 °C a la foscor amb una agitació contínua de 200 rpm. Tot el contingut de diferents tubs a diferents intervals de temps es va centrifugar a 4000 rpm durant 15 min a 4 °C. Els sediments de cèl·lules obtinguts es van congelar a -20 °C fins al seu processament posterior.

### Absorbància i nombre de cèl·lules

La biomassa cel·lular dels cultius es va estimar mesurant-ne l'absorbància a 650 nm en un colorímetre Coleman 6/20. Paral·lelament, es van realitzar enumeracions totals de cèl·lules a partir de mostres de cultiu fixades amb formaldehid a una concentració final del 10 % (v/v). Un volum de 0,1 mL de la suspensió cel·lular fixada era estès, dins una superfície d'1 cm<sup>2</sup>, en un portaobjectes i fixat a la flama. Les cèl·lules es van tenyir amb blau de metilè. Amb l'enumeració dels bacteris presents dins un nombre significatiu de camps del microscopi, s'aconsegueix una bona estima de la concentració de cèl·lules en el cultiu.

### Determinació de la concentració de pigments i de l'espectre d'absorció

Els pigments dels sediments cel·lulars dels cultius fototròfics i quimiotròfics es

van extreure amb una dissolució d'acetona i metanol (7:2 v/v). Un cop descongelats, els sediments es van resuspendre en 1 mL d'aigua destil·lada i a la suspensió s'afegiren 9 mL de la mescla de dissolvents. Després d'estar 90 min a 4 °C i protegida de la llum, la suspensió es va centrifugar a 6000 rpm durant 15 min. Es va mesurar l'absorbància del sobrenedant a longituds d'ona de 488, 775 i 830 nm. La concentració de bacteriolorofil·la *a* al sobrenedant es va calcular (CLAYTON, 1963) utilitzant el coeficient d'extinció

$$\epsilon_{775} = 75 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

La concentració de carotenoides es va calcular segons la fórmula:

carotenoides ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) =  $3,3 (A_{488} - A_{830}) v V^{-1}$ , on  $A_x$  és l'absorbància corresponent a la longitud d'ona  $x$ ,  $v$  és el volum d'extracte i  $V$  és el volum del cultiu utilitzat. Es va determinar l'espectre d'absorció dels sobrenedants des de 300 fins a 900 nm de longitud d'ona amb un espectrofotòmetre Shimadzu UV-265 FW.

### Determinació de la concentració de proteïnes

Els sediments cel·lulars es digeriren amb 1 mL d'una dissolució de NaOH 1N durant 1 h a 100 °C. Es va determinar la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode de Bradford (BRADFORD, 1976). Com a estàndar es va utilitzar albúmina de sèrum boví (Sigma).

## RESULTATS

En la figura 1A i 1B es presenten, respectivament, els espectres d'absorció de les soques salvatge i mutant (CrtD) de *Rhodospira rubra*. Per a cada soca s'observen diferents pics d'absorció màxima, la qual cosa indica la diferent composició en pigments de cadascuna. La soca salvatge

presenta pics d'absorció màxima a 586,2 i 767,6 nm (que corresponen a la bacteriolorofil·la *a*) i a 431,6, 456,0 i 487,0 nm (que corresponen al carotenoide esferoidè). L'esferoidè és el carotenoide que presenta normalment *R. sphaeroides*. La soca mutant CrtD, que és de color verd, mostra pics d'absorció màxima a 583,8 i 770,8 nm (bacteriolorofil·la *a*) i a 416,4, 441,0 i 470,4 nm (els quals corresponen al carotenoide cloroxantina). L'esferoidè no es detecta a les cèl·lules del mutant verd; el principal carotenoide d'aquest mutant és, en canvi, la cloroxantina. Els espectres d'absorció de cadascuna de les soques eren pràcticament iguals tant si les cèl·lules havien crescut en condicions fototròfiques com si ho havien fet en condicions quimiotròfiques (espectres no mostrats).

La soca mutant CrtD és capaç de créixer fotosintèticament en condicions que són favorables per al desenvolupament fotosintètic dels bacteris vermells no del sofre. Així doncs, l'alteració de la síntesi de carotenoides no afecta d'una manera considerable l'eficiència del seu sistema fotosintètic. D'igual manera, la soca mutant és capaç de créixer en condicions de metabolisme quimioheterotròfic en presència d'oxigen. Les possibles diferències fisiològiques entre ambdues soques no alteren, doncs, d'una manera radical, les possibilitats de desenvolupament en el mateix tipus d'ambients naturals.

En el present treball hem trobat diferències fisiològiques en la resposta a la llum de les dues soques. En la figura 2 es mostra l'efecte de diferents intensitats de llum sobre la taxa específica de creixement ( $\mu$ ). Per a ambdues soques, una major intensitat de llum determina una major velocitat de creixement. Els treballs pioners sobre el tema (SISTROM et al., 1956 b) mostraven que la soca tipus tenia velocitats de creixement més altes que una soca mutant similar, ja que la funció fotosintètica del mutant era deficient respecte de la del tipus

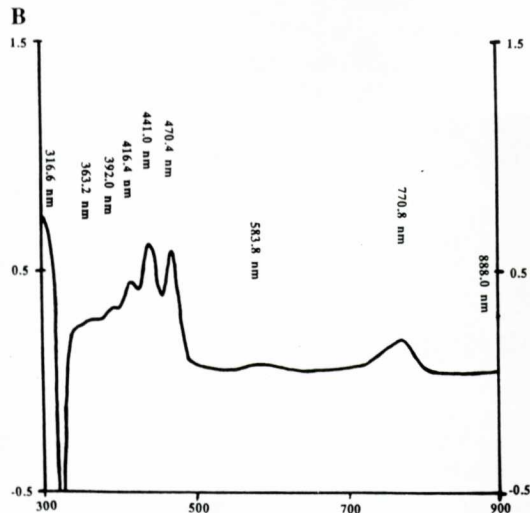
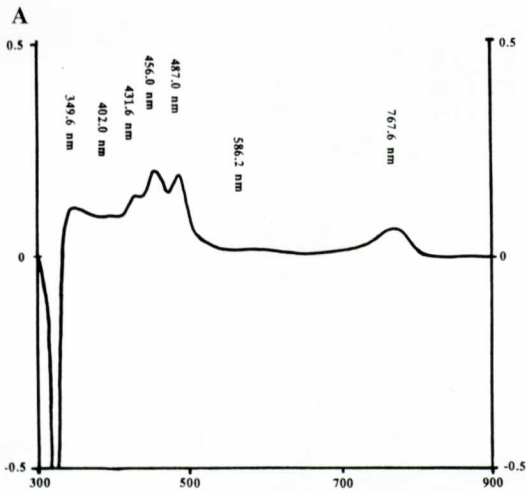


Fig. 1. Espectres d'absorció d'extractes d'acetona-metanol de la soca salvatge (A) i del mutant CrtD (B) de *Rhodobacter sphaeroides*. L'espectre comprèn les longituds d'ona des de 300 fins a 900 nm.

salvatge. En aquest estudi, però, cal matitzar les diferències de velocitat de creixement entre les soques segons el marge d'intensitats de llum que considerem. A baixes intensitats de llum, la  $\mu$  és més alta en el mutant ( $0,015 \text{ h}^{-1}$ ) que en la soca salvatge ( $0,009 \text{ h}^{-1}$ ). Aquests valors, però, tendeixen a igualar-se quan la intensitat de la llum s'incrementa, arribant a ésser pràcticament equivalents ( $0,030 \text{ h}^{-1}$  per a la soca

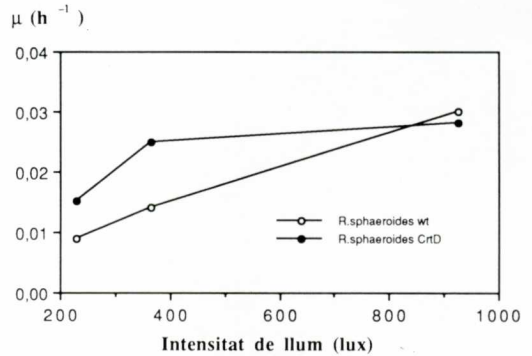


Fig. 2. Representació gràfica de la relació existent entre la taxa específica de creixement ( $\mu$ ) i la intensitat de llum amb què s'il·lumina el cultiu fototròfic de la soca salvatge i de la mutant CrtD de *Rhodobacter sphaeroides*.

salvatge i  $0,028 \text{ h}^{-1}$  per a la soca mutant) a la intensitat màxima (925 lux) emprada.

Malgrat les diferències entre les taxes de creixement de les dues soques, podem afirmar que les seves respostes fisiològiques, a diferents intensitats de llum, són qualitativament similars: sembla que les dues soques s'acostin a la velocitat màxima de creixement quan el marge d'intensitats utilitzat esdevé màxim. Això és conseqüència directa del fet que la llum, en aquestes condicions de creixement, sigui l'única font d'energia.

En condicions de creixement quimioheterotròfic, hem obtingut taxes de creixement de  $0,052 \text{ h}^{-1}$  en el mutant CrtD i de  $0,067 \text{ h}^{-1}$  en la soca salvatge. La diferència amb respecte a les velocitats de creixement fotoheterotròfic és notable: en creixement quimioheterotròfic la velocitat és doble que en el fotoheterotròfic. Encara que les cèl·lules utilitzin els mateixos compostos orgànics (el medi de cultiu és el mateix), no ho fan a través de les mateixes vies metabòliques. La utilització de compostos orgànics en condicions quimioheterotròfiques produeix més energia que el metabolisme fotoheterotròfic. Tanmateix, considerant que l'oxigen inhibeix la síntesi de pigments i que aquestes molècules no in-

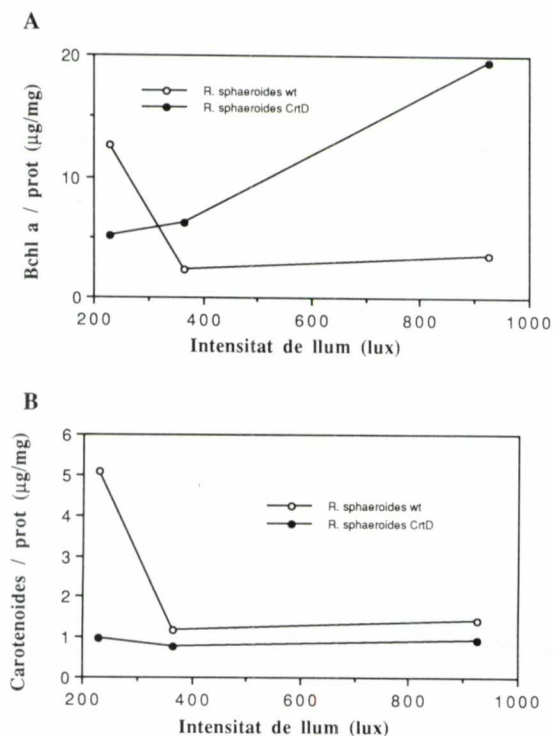


Fig. 3. Representació gràfica de la relació existent entre el contingut específic de bacterioclorofil·la *a* (A) i de carotenoides (B) de les soques salvatge i mutant CrtD il·luminades amb diferents intensitats de llum.

tervenen en el metabolisme quimioheterotròfic, esperaríem velocitats de creixement similars en les dues soques (STANIER i COHEN-BAZIRE, 1957). Els nostres resultats mostren que la soca salvatge creix més ràpidament que la mutant en presència d'oxigen.

En la figura 3A i 3B es mostren, respectivament, el contingut específic de bacterioclorofil·la *a* i de carotenoides de les dues soques en créixer a diferents intensitats de llum. Per a la soca salvatge, el contingut específic de bacterioclorofil·la *a* i de carotenoides és inversament proporcional a la intensitat de llum. Aquesta és la resposta habitual dels organismes fotosintètics a diferents intensitats de llum. Una intensitat de llum màxima determina un contingut específic mínim de pigments fotosintètics.

Tanmateix, el mutant CrtD veu incrementat d'una manera accentuada el seu contingut específic de bacterioclorofil·la *a* en les cèl·lules a intensitats de llum elevades, mentre que la concentració de carotenoides és baixa a qualsevol intensitat de llum analitzada.

El concepte de taxa de creixement, suara utilitzat, representa el valor invers del temps que triga la biomassa de la població en fer-se el doble. En la figura 4 es mostra la relació existent entre l'absorbància a 50 nm i el nombre de cèl·lules d'un cultiu fototròfic de *R. sphaeroides* per a la soca salvatge (Fig. 4A) i la mutant (Fig. 4B). En aquest estudi hem determinat l'absorbància d'un cultiu a 650 nm de longitud d'ona com a estima del valor de la biomassa bacteriana. Per comprovar l'exactitud d'aquesta estima, s'han comparat els valors obtinguts mitjançant l'absorbància, que és una mesura indirecta, amb el nombre total de cèl·lules presents al cultiu, que és una mesura directa.

## DISCUSSIÓ

Encara que *Rhodobacter sphaeroides* presenta normalment unes colònies de color vermell, és relativament freqüent observar en les plaques de Petri colònies amb coloracions diferents de l'habitual, que són mutants espontanis que tenen alterada la via de síntesi de carotenoides. Per exemple, la soca Ga és de color verd i acumula anormalment neurosporè i cloroxantina (SISTROM, 1978). El fet que la soca mutant CrtD emprada en aquest treball s'obtingui —i a la vegada reverteixi al fenotip salvatge—, amb una elevada freqüència (Eloi Garí, com. pers.), obliga a pensar en el possible significat ecofisiològic d'aquesta mutació. Els gens que regulen la síntesi de carotenoides estan situats molt a prop dels de la síntesi de bacterioclorofil·la en algunes Rhodospirillaceae (MARRS, 1981). En

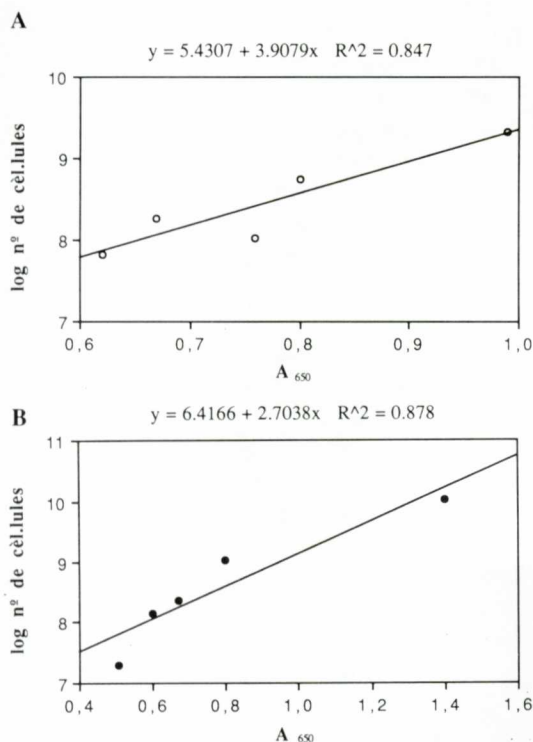


Fig. 4. Representació gràfica de la relació existent entre l'absorbància a 650 nm ( $A_{650}$ ) i la concentració de cèl·lules en un cultiu fototròfic de la soca salvatge (A) i la soca mutant CrtD (B) de *Rhodobacter sphaeroides*.

*R. sphaeroides*, quasi tots els gens dedicats a l'aparell fotosintètic es troben en un fragment de 45 kb i es regulen fonamentalment per l'efecte de la llum i l'oxigen (CHAUDHRI et al., 1988). Es tracta, per tant, d'un cas de regulació gènica per factors ambientals, com ara la llum.

El carotenoide que es troba habitualment en *R. sphaeroides* és l'esferoidè (TRÜPPER i PFENNIG, 1981). La cloroxantina o hidroxineurosporè, que és l'únic carotenoide que hem detectat a la soca mutant CrtD, és un component de la via de síntesi de l'esferoidè (SCHMIDT, 1978). La figura 5 mostra un esquema d'aquesta via metabòlica. En les cèl·lules mutants, està blocada la dessaturació entre els carbonis en posició 3-4, essent la cloroxantina l'últim producte de la síntesi. De fet, en el cas de

*Rhodopseudomonas capsulata*, s'ha proposat que el gen que governa el pas de cloroxantina a l'esferoidè desmetilat és el gen *crtD* (SCOLNIK et al., 1980).

En *R. sphaeroides*, la presència d'oxigen inhibeix la síntesi de pigments fotosintètics (SISTROM et al., 1956 a). Així doncs, en aquestes condicions, no es pot donar un creixement de tipus fototròfic. L'aparició d'oxigen en els cultius determina el canvi d'un metabolisme fototròfic a un de quimiotròfic. Aquest comportament es pot explicar amb el fet que les condicions quimiotròfiques són més avantatjoses energèticament per a *R. sphaeroides* que les fototròfiques, com ho demostren les seves respectives taxes de creixement (Fig. 2). Si la soca mutada només tingués afectats els components de l'aparell fotosintètic, en condicions quimiotròfiques hauria de presentar les mateixes característiques de creixement que la soca salvatge, ja que l'aparell fotosintètic no intervé en aquest tipus de metabolisme. S'observa que la velocitat de creixement de la soca mutant CrtD és inferior a la de la soca salvatge. Això fa pensar que la mutació també pot afectar algun altre aspecte, encara que potser no massa important, del metabolisme general de la cèl·lula.

La figura 3 mostra que la soca salvatge de *R. sphaeroides*, quan creix fototròficament, té un contingut específic de pigments inversament proporcional a la intensitat de llum que rep. Aquest fenomen, que és prou conegut en molts organismes fotosintètics, també s'ha demostrat en aquesta espècie (SISTROM et al., 1956 a; STANIER et al., 1957). Aquest mecanisme de regulació té un valor adaptatiu evident. En disminuir la intensitat de la llum, l'organisme s'adapta tot augmentant considerablement la síntesi de pigments. Des del punt de vista energètic, produir més pigments és un clar avantatge per als organismes fototròfics, que poden aprofitar millor la baixa disponibilitat de llum. També els

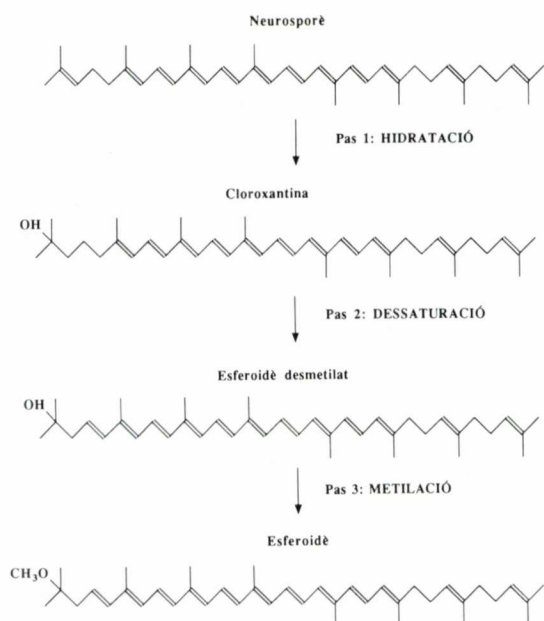


Fig. 5. Esquema de la via biosintètica del carotenoides esferoidè en cèl·lules de *Rhodobacter sphaeroides*. (Adaptat de SCHMIDT, 1978.)

resulta beneficiós reduir la síntesi quan la llum és força abundant, ja que això suposa un estalvi energètic important per a la cèl·lula.

La soca mutant verda CrtD presenta un comportament diferent respecte a la relació existent entre la síntesi de pigments i la intensitat de llum. En la figura 3B s'observa que el contingut específic de carotenoides de CrtD és inferior al de la soca salvatge. A més, la síntesi de carotenoides en CrtD no està influenciada per les variacions en la intensitat de llum, ja que la seva concentració d'aquests pigments es manté constant. En la figura 3A hom pot observar que el contingut específic de bacterioclorofil·la *a* en funció de la intensitat de llum presenta una resposta completament diferent. A mesura que augmenta la intensitat de llum, augmenta també el contingut específic de bacterioclorofil·la *a*, fins a un valor de 19  $\mu\text{g}$  per mg de proteïna, mentre que en la soca salvatge dismi-

neix fins a 3  $\mu\text{g}$   $\text{mg}^{-1}$  proteïna. El fet que els carotenoides també tinguin una funció essencial en la fotosíntesi (ja que actuen com a captadors de llum de diferents longituds d'ona, alhora que protegeixen la bacterioclorofil·la de la fotooxidació), fa pensar que la menor eficiència dels carotenoides de la soca mutant és corregida per un augment important en la síntesi de bacterioclorofil·la *a*.

En la figura 2 hom pot observar que, a baixes intensitats de llum, el mutant CrtD presenta taxes de creixement més elevades que la soca salvatge; i que ambdues tendeixen a igualar-se a altes intensitats. Tanmateix, les dues soques tenen respostes qualitativament similars: s'aproximen a velocitats màximes a mesura que augmenta la intensitat de la llum. Aquest comportament és vàlid per al marge d'intensitats considerat (230 a 925 lux).

Les implicacions ecològiques de la influència de la intensitat de la llum sobre la velocitat de creixement han estat discutides en el cas dels bacteris vermells i verds del sofre integrants dels tapets microbians, que són comunitats bentòniques (MACK i PFENNIG, 1988). En les comunitats planctòniques, la llum i el sulfhídric són els factors essencials que regulen la distribució de les poblacions, com és el cas de *Chromatium* i de *Chlorobium* en la llacuna de Cisó (GUERRERO et al., 1985).

Del nostre treball es pot deduir que, a baixes intensitats de llum, el desenvolupament més ràpid de poblacions del mutant CrtD respecte a la soca salvatge podria permetre, per exemple, una estratificació en fondària en les masses d'aigua [on també es poden trobar les Rhodospirillaceae, d'acord amb BIEBL i PFENNIG (1981)]. En un cas hipotètic, a partir d'un cert valor d'intensitat de llum, les cèl·lules de la soca salvatge es situarien per damunt (en la columna d'aigua) de les cèl·lules de la soca mutant, ja que les primeres es desenvoluparien més ràpidament. S'ha de tenir en



compte que la intensitat de la llum disminueix en augmentar la fondària. Tanmateix, per sota d'una intensitat de llum donada, les cèl·lules de la soca mutant superarien en nombre les cèl·lules salvatges en un temps determinat. Fent una simplificació, es pot pensar en una situació en què les cèl·lules de la soca salvatge predominarien durant el dia, quan la radiació solar és important, i que durant la nit, quan la intensitat de llum disminueix, la soca mutant seria la dominant. L'observació que mutants de *Rhodopseudomonas capsulata*, incapaços de sintetitzar pigments, tenen un avantatge selectiu quan creixen en anaerobiosi i a la foscor (MADIGAN et al., 1982) dóna suport a aquesta hipòtesi.

Les observacions del nostre treball ens fan reflexionar sobre quina és la causa que les poblacions microbianes naturals estiguin integrades per diferents soques d'una mateixa espècie. En el medi natural, aquestes soques provenen normalment de mutacions espontànies. Com a conseqüència del dissemblant genotip, poden presentar també un fenotip distint, el qual determina un comportament diferent envers les variacions dels factors ambientals. El treball que presentem pot ajudar a comprendre el que hi hagi, dins una mateixa població de bacteris fotosintètics aquàtics, diferents soques, caracteritzades per una diferent composició de pigments, que poden haver-se adaptat a les diferents intensitats de llum que travessen la columna d'aigua. Aquest cas il·lustra excel·lentment la necessitat d'estudiar l'ecologia i la genètica dels microorganismes com un conjunt indisoluble, si volem esbrinar el vertader paper de les poblacions microbianes naturals en els ecosistemes.

### Agraïments

Aquest article és resultat del treball d'uns alumnes de 4rt curs (1989-90) de la Facultat de Biologia en continuar uns experiments que for-

maven part de les pràctiques d'Ampliació de Microbiologia. Els autors agraeixen l'ajut de tots els altres alumnes que participaren en les mateixes pràctiques; citar-los aquí, però, resultaria massa llarg, encara que sense llur col·laboració aquest treball no hauria estat possible. També agraeixen la cessió de les soques bacterianes i les orientacions rebudes del Dr. Jordi Barbé i d'Eloi Garí, del Departament de Genètica i de Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Finalment, els autors remercien la col·laboració en la preparació de l'article de Pere López Reverté, la revisió del català pacientment portada a terme per Mercè Piqueras, i el continu encoratjament i assessorament científic del Prof. Ricard Guerrero, Catedràtic de Microbiologia de la Universitat de Barcelona.

### BIBLIOGRAFIA

- BIEBL, H. i N. PFENNIG. 1981. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. *En: The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria.* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows i H.G. Schlegel (eds.). Vol. I. Springer-Verlag. pp. 267-273.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- CHAUDHRI, M.P., S.A. COOMBER i C.N. HUNTER. 1988. Light and oxygen regulated promoters of the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides*. Llibre d'abstracts del VI International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes. Noordwijkerhout, Holanda. p. 226.
- CLAYTON, R.K. 1963. Toward the isolation of a photochemical reaction center in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochem. Biophys. Acta* 75:312-323.
- GUERRERO, R., E. MONTESINOS, C. PEDRÓS-ALIÓ, I. ESTEVE, J. MAS, H. van GEMERDEN, P.A.G. HOFMAN i J.F. BAKKER. 1985. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: Vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.* 30:919-931.
- MACK, E.E. i N. PFENNIG. 1988. Dependence of growth rates on light intensities in purple and green sulfur bacteria from salt marsh microbial mats. Llibre d'abstracts del VI International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes. Noordwijkerhout, Holanda. p. 177.

- MADIGAN, M., J.C. COX i H. GEST. 1982. Photopigments in *Rhodopseudomonas capsulata* cells grown anaerobically in darkness. *J. Bacteriol.* *150*:1422-1429.
- MARRS, B. 1981. Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodopseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol.* *146*:1003-1012.
- PFENNIG, N. 1967. Photosynthetic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *21*:285-324.
- PFENNIG, N. i H.G. TRÜPER. 1989. Anoxygenic photosynthetic bacteria. *En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig i J.G. Holt (eds.). Williams & Wilkins. pp. 1635-1709.
- SCHMIDT, K. 1978. Biosynthesis of carotenoids. *En: The Photosynthetic Bacteria*. R.K. Clayton i W.R. Sistrom (eds.). Plenum Press. pp. 729-750.
- SCOLNIK, P.A., M.A. WALKER i B.L. MARRS. 1980. Biosynthesis of carotenoid derived from neurosporene in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* *255*:2427-2432.
- SISTROM, W.R., M. GRIFFITHS i R.Y. STANIER. 1956 a. A note on the porphyrins excreted by the blue-green mutant of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J. Cell. Comp. Physiol.* *48*:459-472.
- SISTROM, W.R., M. GRIFFITHS i R.Y. STANIER. 1956 b. The biology of a photosynthetic bacterium which lacks colored carotenoids. *J. Cell. Comp. Physiol.* *48*:473-515.
- SISTROM, W.R. 1978. Appendix: List of mutant strains. *En: The Photosynthetic Bacteria*. R.K. Clayton i W.R. Sistrom (eds.). Plenum Press. pp. 927-934.
- STANIER, R.Y. i G. COHEN-BAZIRE. 1957. The role of light in the microbial world: Some facts and speculations. *En: Microbial Ecology. 7th Symp. Soc. Gen. Microbiol.* Cambridge University Press. pp. 56-89.
- TRÜPER, H.G. i N. PFENNIG. 1981. Characterization and identification of the anoxygenic phototrophic bacteria. *En: The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows i H.G. Schlegel (eds.). Vol. I. Springer-Verlag. pp. 299-312.