

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA DE LA BACTERIA  
FOTOSINTÉTICA PÚRPURA NO SULFUROSA *Rhodobium  
orientis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**Biólogo**

P R E S E N T A

ANDRES GONZALEZ GUEVARA



México, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA DE LA BACTERIA  
FOTOSINTÉTICA PÚRPURA NO SULFUROSA *Rhodobium  
orientis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**Biólogo**

P R E S E N T A

ANDRES GONZALEZ GUEVARA

DIRECTOR: Dr. Heliodoro Celis Sandoval

CODIRECTOR: M en C. Catalina Machuca Rodríguez



El presente trabajo se realizo en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, bajo la dirección del Dr. Heliodoro Celis Sandoval y como codirector a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez de la Unidad de Investigación en Genética y toxicología Ambiental, FES Zaragoza, UNAM.

El jurado asignado:

M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA  
DR. HELIODORO CELIS SANDOVAL  
M. en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ  
DR. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES  
DRA. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

A mi madre y padre por el gran apoyo y ayuda constante que siempre me han brindado.

*Agradecimientos:*

*- Al Dr. Celis por permitirme trabajar en su laboratorio y por su apoyo en todo momento.*

*- A los profesores asignados por sus comentarios, sugerencias y aportaciones.*

*... y muy especial a ti Vero por todo tu apoyo siempre incondicional, por ser mi compañera y también mi motivación.*

	<u>Índice</u>
	<b>Pág.</b>
<i>i.</i> Abreviaturas	1
<i>ii.</i> Resumen	3
<b>1. Introducción</b>	4
<b>2. Marco teórico</b>	6
<b>2.1. Fosfato inorgánico</b>	6
<b>2.2. Pirofosfato inorgánico</b>	6
<b>2.2.1. Características del pirofosfato</b>	6
<b>2.2.2. El papel del pirofosfato en el metabolismo celular</b>	8
<b>2.2.3. Utilización del pirofosfato</b>	8
<b>2.3. Las pirofosfatasas</b>	9
<b>2.3.1. Pirofosfatasas citoplásmicas</b>	9
<b>2.3.1.1. Pirofosfatasa citoplásmica Fam I</b>	10
<b>2.3.1.2. Pirofosfatasa citoplásmica Fam II</b>	10
<b>2.3.1.3. Pirofosfatasas de membrana</b>	11
<b>2.4. Bacterias fotosintéticas</b>	12
<b>2.4.1. Bacterias púrpura no sulfurosas</b>	13
<b>2.4.2. Características generales de las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas</b>	14
<b>2.4.3. Características taxonómicas de las BFPNS</b>	17
<b>2.4.4. Genero <i>Rhodobium</i></b>	17
<b>2.4.4.1. Características principales de <i>Rhodobium orientis</i></b>	17
<b>3. Planteamiento del problema</b>	20

4.	Hipotesis	21
5.	Objetivos generales	22
5.1.	Objetivos particulares	22
6.	Material y Método	23
6.1.	Cultivo de bacterias	23
6.1.1.	Medio de cultivo para <i>Rhodobium orientis</i>	23
6.1.2.	Siembra de <i>Rbi. orientis</i>	24
6.1.3.	Curva de crecimiento	25
6.1.3.	Cosecha	25
6.2.	Pirofosfatasa membranal	25
6.2.	Obtención de cromatóforos	25
6.3.	Pirofosfatasa citoplásmica	26
6.3.1.	Purificación	26
6.3.2.	Purificación parcial de la pirofosfatasa citoplásmica como Fam I	27
6.3.3.	Purificación parcial de la pirofosfatasa citoplásmica como Fam II	27
6.4.	Determinación de proteína	28
6.5.	Determinación de actividad específica en cromatóforos	29
6.6.	Determinación de la actividad específica PPasa citoplásmica Fam I y II	29
6.7.	Columna cromatográfica de exclusión molecular	30
6.7.1.	Calibración de la columna	30
6.7.2.	Carga de la columna	31
6.8.	Geles de poliacrilamida	31
6.8.1.	Determinacion de actividad hidrolítica en gel	32
6.8.2.	SDS-PAGE	33

<b>7. Resultados</b>	34
<b>7.1. Curva de crecimiento</b>	34
<b>7.2. Espectro y tinción de Gram</b>	34
<b>7.3. PPasa membranal</b>	35
<b>7.4. Caracterización de la PPasa citoplásmica</b>	36
<b>7.4.1. Determinación de Familia de la PPasa citoplásmica de <i>Rbi. orientis</i></b>	36
<b>7.4.2. Zimograma</b>	37
<b>7.4.3. Perfil de pH</b>	38
<b>7.4.4. Termoestabilidad y temperatura de activacion</b>	39
<b>7.4.5. Especificidad del sustrato</b>	40
<b>7.4.6. Efecto de la concentración de diferentes cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica de <i>Rbi. orientis</i></b>	41
<b>7.4.7. Efecto del NaF sobre la actividad hidrolitica</b>	42
<b>7.4.8. Constante de Michaelis y Vmax</b>	43
<b>7.4.9. Peso molecular</b>	44
<b>7.4.10. SDS-PAGE</b>	45
<b>7.5. Resumen comparativo de algunas propiedades de la PPasa citoplásmica de <i>Rbi. orientis</i> y de otras bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas</b>	46
<b>8. Discusión</b>	47
<b>9. Conclusiones</b>	51
<b>10. Referencias</b>	52

i. Abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
ASB	Albúmina de suero bovino
Atm	Atmósferas
ATP	Trifosfato de adenosina
Bisacrilamida	N, N' -bis-metilen-acrilamida
BFPNS	Bacterias Fotosintéticas Purpura No Sulfurosa
CNC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
DNAsa	Desoxirribonucleasa II, Tipo IV: de bazo porcino.
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (amino-etil eter) N N tetra acético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ( <i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</i> )
Elon	<i>p</i> -metilaminofenol sulfato 29 mM + bisulfito de sodio 290 mM
H <sup>+</sup>	Protón
FI	Familia I de sPPasa
FII	Familia II de sPPasa
H <sup>+</sup> PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones (membranal)
KDa	KiloDaltones
Km	Constante de Michaelis
l	Litro (s)
Me	Metal

min	Minuto (s)
MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
NEM	N- etilmaleimida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PM	Peso molecular
p/v	Relación peso - volumen
Pi	Fosfato inorgánico
PoliP	Polifosfato(s)
PPasa	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato inorgánico
<i>Rba.</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Rbi.</i>	<i>Rhodobium</i>
Rf	Movilidad electroforética relativa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
spp.	Especies
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
TCA	Ácido tricloro acético
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
v/v	Relación volumen - volumen
x g	Campo relativo de la centrifuga por gravedad

## ii. Resumen

El fósforo (P) es el único entre los bioelementos primordiales y juega un papel clave en la bioenergética al ser componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que genera y consume el metabolismo celular y es transportado al interior de la célula en forma de anión ortofosfato diprotonado. Un gran número de reacciones biosintéticas hidrolizan ATP generando AMP + PPi y su hidrólisis posterior es llevada a cabo por la PPasa localizada en el citoplasma de las células, permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en la dirección correcta además se han identificado reacciones enzimáticas en las que el PPi sustituye al ATP o que son dependientes de PPi.

El proyecto tuvo como objetivo caracterizar la pirofosfatasa citoplásmica (sPPasa) de una bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa halófila, *Rhodobium orientis*. Esta enzima fue aislada y caracterizada a través de la cuantificación de su actividad hidrolítica, su perfil de pH, su termoestabilidad, temperatura de activación, la especificidad del sustrato y la determinación de su peso molecular, además de algunas constantes cinéticas como Km y Vmax., encontrando que puede ser purificada exclusivamente como FI y solo puede utilizar al Zn<sup>2+</sup> como protector. En el zimograma hecho en un PAGE se encontró que el extracto tiene un Rf que se ubica entre la PPasa de *Rhodospirillum rubrum* y de *Rhodobacter sphaeroides* (prototipo de FI y FII, respectivamente). La PPasa de *Rhodobium orientis* es estrictamente dependiente de Mg<sup>2+</sup> y presenta actividad hidrolítica significativa por parte de la H<sup>+</sup>PPasa. Su sustrato verdadero es Mg-PPi<sup>2-</sup>. Es un tetrámero cuyo peso molecular de 137 kDa determinado con una columna de Sephacryl S200 HR y a través de un SDS-PAGE de segunda dimensión se encontró que está formado por 2 subunidades de 23 kDa. Y 2 de 49kDa. La temperatura y el pH óptimo fueron de 55°C y 9, respectivamente. El NaF la inhibe en un 100%. Su Km fue 0.316 mM y su Vmax. es 5.034 μmol Pi (min mg proteína)<sup>-1</sup>.

# 1. INTRODUCCIÓN

Todas las células utilizan los mismos principios fundamentales y los mismos mecanismos en sus actividades transformadoras de energía. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar, mientras que los organismos heterótrofos emplean la energía contenida en la estructura de las moléculas orgánicas nutrientes obtenidas de su medio.

La célula conserva la energía de manera aprovechable en las moléculas del adenin trifosfato (ATP), las cuales se sintetizan a partir de ADP y de Pi en reacciones catalizadas por la H<sup>+</sup>ATP sintetasa. El ATP es entonces el transportador que lleva la energía química hacia aquellos procesos o reacciones de la célula que requieren energía. Así, al hidrolizarse el ATP, la energía liberada se utiliza para llevar a cabo el trabajo químico, mecánico y osmótico de la célula (Franklin, 1986).

En los 1940's el ATP fue establecido como el transportador central de la energía química entre la producción y el consumo de energía de las reacciones biológicas, poco tiempo después se incluyó tanto al PPi como a otros polifosfatos como posibles alternativas al ATP debido a la similitud estructural de su fosfato. En 1962, se demostró la capacidad del PPi para actuar como un donador biológico de energía en la formación de fosfoenolpiruvato (Siu y Wood, 1962). En 1963 se sugirió un rol para el PPi en la fotosíntesis temprana (Melvin Calvin, 1963). En 1965, se asumió que el PPi pudo haber precedido al ATP como un transportador de energía en los orígenes y evolución de la vida (Lipmann, 1965). La primera demostración de un enlace directo entre el PPi y la fotosíntesis fue a mediados de los 60's cuando se demostró la formación de PPi a partir de Pi inducida por luz en los cromatóforos de membrana de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltcheffsky *et al*, 1966). La transferencia de energía en oscuridad ligada a la membrana (Baltcheffsky, 1967; Baltcheffsky, 1969) e hidrólisis (Baltcheffsky, 1964) del PPi corroboraron la existencia de un PPi sintetasa/PPasa ligada a la membrana en *Rhodospirillum rubrum*.

A principios de los 70's se encontró que el PPi dirigía la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971) y la traslocación de protones (Moyle *et al*, 1972) en cromatóforos y una PPasa ligada a la membrana de la vacuola que fue encontrada en la planta superior *Beta vulgaris* (Karlsson, 1975).

La PPI-sintetasa /PPasa de *R. rubrum* fue después purificada y caracterizada (Nyrén *et al*, 1991; Shakhov *et al* 1982).

El pirofosfato (PPI) es el polímero de fosfato más pequeño y es una molécula rica en energía, producto de muchas reacciones biosintéticas. Aunque el PPI es usado como un recurso de energía y fósforo en varias reacciones de fosforilación (Wood, 1977) estas reacciones consumen solamente una pequeña porción del PPI intracelular. Si la pirofosfatasa citoplásmica (PPasa) no estuviera continuamente presente en las células y por ello no hubiera actividad de hidrólisis del PPI, la concentración de éste aumentaría tan rápidamente que podría inhibir el crecimiento celular (Lahti, 1983). Las PPasas están entre las enzimas cuya continua síntesis es esencial para el crecimiento (enzimas constitutivas) (Stadtman, 1970).

Los estudios propuestos en este proyecto permitirán mediante una caracterización bioquímica enzimática sobre la sPPasa de *Rhodobium orientis* estudiar aspectos importantes del metabolismo del PPI y del papel de las PPasas en las bacterias fotosintéticas.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Fosfato inorgánico (Pi)

La energía es una cuestión central en la vida y para sobrevivir, los organismos han encontrado varias maneras para interconvertir continuamente las diversas formas de energía disponibles en el ambiente. Los compuestos de fosfato son la materia biológica común de intercambio de energía y el trifosfato de adenosina es el portador de energía más importante de la célula. (de Meis *et al*, 2004)

La disponibilidad de las formas inorgánicas de fosforo para sostener la productividad (energética) en orden descendente es la siguiente: ortofosfato > pirofosfato > trifosfato > aniones polifosfatos mayores.

### 2.2 Pirofosfato inorgánico (PPi)

El pirofosfato inorgánico es producido en una variedad de reacciones biosintéticas y presumiblemente la principal fuente de ortofosfato requerido en la fase de conversión de la energía en el metabolismo. La hidrólisis de pirofosfato a ortofosfato, catalizada por la pirofosfatasa inorgánica, es en consecuencia un importante proceso que une dos facetas principales de la maquinaria metabólica en todos los tipos de células (Kornberg, 1962).

#### 2.2.1 Características del pirofosfato

El PPi es el compuesto químico más simple que contiene un enlace fosfoanhídrido y, en algunos casos puede ser un sustituto del ATP (Wood, 1977).

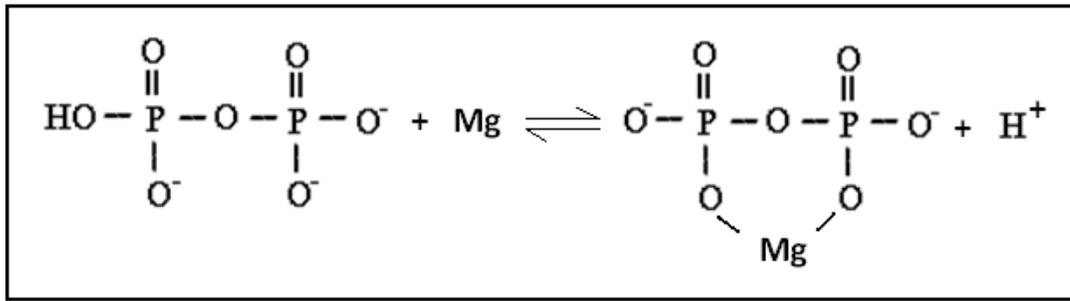


Fig 1.

Estructura del PPI a pH 8.2. Tomada de Cooperman, 1982.

Este enlace fosfoanhídrido es la forma química básica por la cual se transmite la energía en las células.

Para entender el significado biológico del PPI es necesario conocer algunos aspectos termodinámicos de su hidrólisis, particularmente en las condiciones de pH y fuerza iónica presentes en las células. Debido a la alta afinidad del PPI por cationes divalentes y a las concentraciones relativamente altas de  $\text{Mg}^{2+}$  en el citoplasma, el PPI probablemente se encuentra presente en las células formando un complejo 1:1 con el  $\text{Mg}^{2+}$  (Lahti,1983).

El cambio de energía libre asociado a la hidrólisis ( $\Delta G^{0'}$ ) del PPI es cercano a la energía del enlace gama del ATP; sin embargo, en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  el  $\Delta G^{0'}$  para el PPI se vuelve menos negativo debido a que el producto de su hidrólisis (2Pi) no se acompleja fuertemente con el  $\text{Mg}^{2+}$ , a diferencia del ATP, cuyo producto (ADP) si se une fuertemente al  $\text{Mg}^{2+}$  (Smith y Martell, 1981).

Desde hace tiempo, varios autores consideran que el PPI podría ser el compuesto donador de energía más antiguo tanto para los sistemas prebióticos como para las primeras formas de vida. La simplicidad de su estructura comparada con la del ATP, así como su posible presencia en los minerales de la tierra primitiva, permiten suponer que el PPI fue importante en las transformaciones bioenergéticas primigenias (Lipmann, 1965; Miller y Parris, 1964).

### 2.2.2 El papel del PPi en el metabolismo celular.

En general se suponía que el PPi producido en muchas reacciones biosintéticas importantes (síntesis de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, urea, lípidos) era un producto secundario que debía ser hidrolizado inmediatamente por la PPasa localizada en el citoplasma de las células, para hacer a estas reacciones energéticamente favorables (Kornberg, 1957); de ésta forma la energía del enlace anhídrico del PPi nunca sería utilizada.

Se han identificado reacciones enzimáticas en las que el PPi sustituye al ATP o que son dependientes de PPi. Algunas de estas reacciones son responsables de la fosforilación de intermediarios esenciales de la glucólisis y gluconeogénesis (Baltcheffsky y Nyren, 1984). Así mismo se encontró, que la glucosa-6 fosfatasa del hígado es capaz de llevar a cabo la síntesis de glucosa 6-fosfato en una reacción dependiente de PPi (Lawson y Veech, 1979). También se descubrió que estas enzimas dependientes de PPi están ampliamente distribuidas en plantas (Edwards *et al*, 1985). En resumen, estos hallazgos muestran que el PPi puede usarse como donador de energía para muchas reacciones y que en algunas otras puede ser utilizado incluso en lugar del ATP (Lahti *et al* 1988).

### 2.2.3 Utilización del PPi

Tomando en consideración lo anterior, podemos decir que el PPi producido por la célula puede seguir los siguientes caminos:

- a. Ser hidrolizado por la PPasa citoplásmica o soluble, donde la energía liberada de la hidrólisis del enlace anhídrico se pierde como calor (Romero I., Celis H., 1990).
- b. Ser hidrolizado por la PPasa de membrana traslocadora de H<sup>+</sup>. La energía del gradiente electroquímico producido al hidrolizarse el PPi por esta enzima puede ser utilizado para mantener varias reacciones dependientes de energía como son:

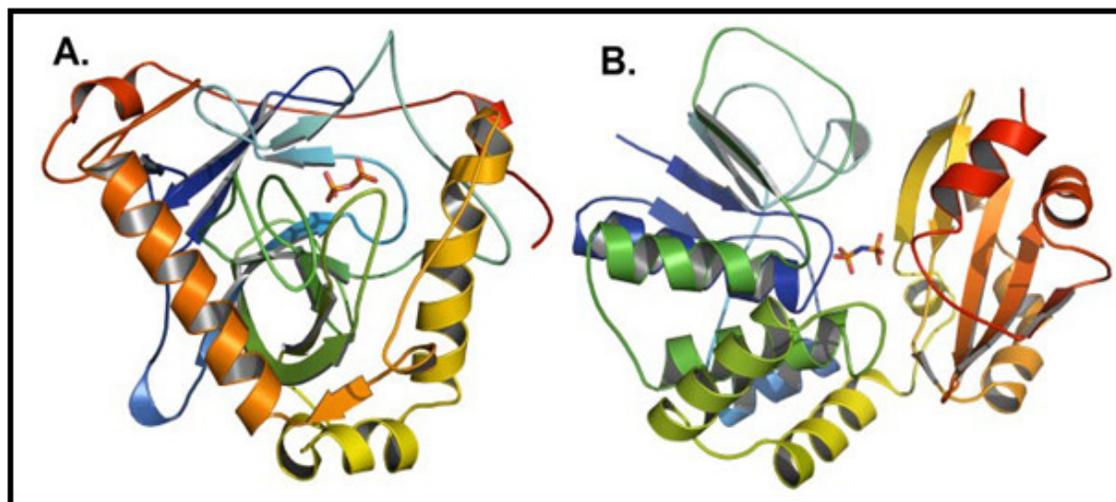
la reversa de transporte de electrones (Baltcheffsky, 1967), la transhidrogenación (Keister y Yike, 1967<sup>a</sup>), la reducción de NAD<sup>+</sup> (Keister y Yike, 1967<sup>b</sup>) y la síntesis de ATP (Keister y Minton, 1971).

- c. Se ha propuesto que puede ser utilizado directa (mediante la formación de gránulos de PPi) o indirectamente (como precursor de la síntesis del polifosfato) como fuente de reserva de energía en *R. rubrum* (Nyrén y Strid, 1991).
- d. Puede ser utilizado directamente como fuente de energía en reacciones metabólicas o sustituir al ATP como donador de energía. (Romero, I., Celis H., 1990).

## 2.3 Las pirofosfatasas

### 2.3.1 Pirofosfatasas citoplásmicas (PPasas)

La pirofosfatasa citoplásmica [E.C.3.6.1.1, difosfatasa inorgánica (CNC-IUBMB, 2008)] es una enzima esencial y ubicua que cataliza la hidrólisis de PPi, produciendo ortofosfato inorgánico (Pi). Su rol en el metabolismo es el de eliminar el PPi, un subproducto de muchas reacciones anabólicas vitales, especialmente aquellas involucradas en la síntesis de polímeros, volviéndolas termodinámicamente irreversibles (Kornberg, 1962). Las pirofosfatasas citoplásmicas pertenecen a dos familias no homologas: familia I, se encuentran distribuidas prácticamente en todos los organismos (Cooperman *et al*, 1992) y familia II, hasta ahora confinadas a un número limitado de bacterias y archeas (; Young *et al*, 1998). Estas familias difieren en muchas propiedades funcionales; por ejemplo, el Mg<sup>2+</sup> es el cofactor “preferido” para las PPasas citoplásmicas de familia I, mientras que el Mn<sup>2+</sup> le confiere máxima actividad a las PPasas citoplásmicas de familia II (Parfenyev *et al*, 2001; Zyryanov *et al*, 2004). Aunque no se observan similitudes en la secuencia ni en la estructura general entre estas dos clases de proteínas, existe una sorprendente conservación de residuos en los sitios activos principales, considerado esto como un notable ejemplo de convergencia evolutiva enzimática (Ahn *et al*, 2001; Parfenyev *et al*, 2001).



**Fig. 2.** Comparación de la estructura de la PPasa de Familia I y la de Familia II. **A** modelo esquemático de la PPasa de Familia I de la levadura (Heikinheimo *et al.*, 2001) y en **B** se muestra el modelo esquemático de la PPasa de Familia II de *Bacillus subtilis* (Fabrichniy *et al.*, 2007). Las estructuras de las enzimas se muestran en una gama de colores donde en azul se encuentra el N terminal y en rojo el C terminal. Los sustratos se muestran como palillos: Ppi para la Familia I y PNP para la Familia II.

### 2.3.1.1 Pirofosfatasa citoplásmica Familia I

La familia I incluye a las pirofosfatasa procariotas y eucariotas (clases A y B según Young *et al* 1998), de las cuales las enzimas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son las especies representativas mejor estudiadas. Los miembros de esta familia comparten la misma estructura y poseen un sitio activo altamente conservado formado por residuos de entre 14–16 aminoácidos, de tres a cuatro iones  $Mg^{2+}$  y propiedades catalíticas muy similares. En general, las PPasas eucariotas son homodímeros compuestos por subunidades de 30-35 kDa, mientras que las PPasas procariotas son homotetrámeros u homohexámeros compuestos por subunidades de 20 kDa.

### 2.3.1.2 Pirofosfatasa citoplásmica Familia II

Las pirofosfatasa citoplásmicas de familia II fueron descubiertas hace pocos años en bacterias y arqueobacterias (Shintani *et al*, 1998; Young *et al*, 1998) y en bacterias

fotosintéticas (Celis et al, 2003). Estas PPasas (clase C según Young et al. 1998) no comparten ninguna similitud en su secuencia con aquellas de familia I; son homodímeros compuestos por subunidades de 34 kDa., y son insensibles a la inhibición por fluoruro en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Co^{2+}$ .

Las PPasas de familia II tienen de 20-50 veces mayor actividad que las PPasas de familia I y exhiben otro patrón de especificidad hacia el sustrato y los iones metálicos activadores: no hidrolizan ATP (Zyryanov et al, 2002), son más activas con  $Mn^{2+}$  o  $Co^{2+}$  así como con  $Mg^{2+}$  (Kuhn et al, 2000; Shintani et al, 1998; Young et al, 1998) y no son inhibidas por  $Ca^{2+}$  (Parfenyev et al, 2001).

### 2.3.1.3 Pirofosfatasas de membrana ( $H^+$ PPasas)

Algunos organismos poseen además, PPasas asociadas de membrana que son capaces de utilizar la energía contenida en el enlace fosfoanhídrido del PPi para establecer gradientes iónicos transmembranales. Ejemplos notables de PPasas de transducción de energía y de conservación de energía son la PPasa reversible traslocadora de  $H^+$  localizada en los cromatóforos de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum* (Baltcheffsky, 1967), la PPasa traslocadora de  $H^+$  vacuolar de las células vegetales. (Rea et al, 1992), y la PPasa asociada a la membrana de animales y levaduras de mitocondrias (Mansurova, 1989).

La existencia de este tipo de pirofosfatasa se reportó por primera vez en *R. rubrum* (Baltcheffsky y von Stedingk, 1966). Sin embargo, ahora se sabe que también está presente en otras bacterias fotosintéticas (Knobloch, 1975; Nore et al, 1990).

Probablemente la pirofosfatasa de membrana mejor estudiada es la de *R. rubrum*. Esta enzima es funcionalmente semejante a la ATP sintetasa, pero con una estructura más sencilla, sustratos más simples e insensibilidad al inhibidor clásico de la  $H^+$ ATP sintetasa, la oligomicina. Esta enzima puede llevar a cabo las siguientes reacciones

parciales: a) síntesis de PPI, b) hidrólisis de PPI, c) intercambio Pi-PPI y d) recambio Pi-H<sub>2</sub>O. En algunas bacterias fotosintéticas como *Rhodospirillum rubrum* existe, además de la PPasa citosólica, la pirofosfatasa de membrana (H<sup>+</sup>PPasa).

La presencia simultánea de estas dos PPasas debe requerir una estricta regulación para que no se presente desperdicio de energía. Mediante el estudio de una mutante sin H<sup>+</sup>PPasa se ha encontrado que su papel en el metabolismo es colaborar en el crecimiento en condiciones de baja energía, como en el crecimiento aeróbico a bajas concentraciones de oxígeno, la transición del metabolismo respiratorio a fotosintético y en el crecimiento fotosintético a intensidades luminosas bajas (García-Contreras *et al*, 2004). Así mismo, se ha reportado que el gen de la H<sup>+</sup>PPasa se induce en respuesta a condiciones de estrés indicando una fuerte regulación transcripcional. En estas situaciones la H<sup>+</sup>PPasa debe estar generando un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> para ser utilizado entre otras cosas, en la síntesis de ATP, esto indicaría que las bacterias fotosintéticas usan al PPI como una fuente de energía de “bajo costo” debido a la simplicidad de su estructura, permitiéndoles una importante ventaja para adaptarse a condiciones hostiles de vida (López-Marques, 2004).

## 2.4 Bacterias fotosintéticas

Las bacterias fototróficas verdes y púrpuras llevan a cabo una fotosíntesis anóxica, usando solamente un fotosistema. Ellas requieren un donador de electrones de más bajo potencial redox que el agua, como compuestos reducidos de sulfuro, hidrogeno molecular o compuestos orgánicos simples. Los productos oxidados resultantes son: sulfato, protones, y compuestos orgánicos oxidados (Pfenning, 1978).

El aparato fotosintético puede ser dividido experimentalmente en tres componentes estrechamente relacionados tanto en aspectos estructurales como funcionales, los cuales son: pigmentos receptores de luz, centros de reacción fotoquímicos y una cadena de transferencia de electrones. La energía luminosa absorbida por los pigmentos antena es

transferida a los centros de reacción, donde se produce una separación de carga por la liberación de un electrón de la clorofila del centro de reacción. Un flujo de electrones es establecido a través de la cadena de transporte de electrones asociada a la fotosíntesis, la cual se encuentra acoplada a la síntesis de ATP, es decir, la energía derivada de la luz es utilizada para sintetizar el ATP (fotofosforilación) por la ATP sintetasa (Mitchell, 1967).

Alternativamente, en algunas bacterias púrpuras, la energía del gradiente electroquímico de protones puede estar acoplada a la síntesis de PPi a través de la pirofosfatasa de membrana ( $H^+PPasa$ ) (Baltcheffsky y von Stedingk 1966).

#### **2.4.1 Bacterias púrpura no sulfurosas (*Rhodospirilleceae*).**

Las bacterias púrpura no sulfurosas (*Rhodospirillaceae*) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente en pantanos y aguas estáticas, donde existe una rápida producción y descomposición de materia. Estas bacterias son únicas por la gran plasticidad metabólica que presentan ya que pueden desarrollarse en condiciones anaeróbicas en la luz, tanto fotoautotróficamente como ftoheterotróficamente, reduciendo compuestos inorgánicos u orgánicos, respectivamente, así como en condiciones aeróbicas por oxidación de sustratos (respiración) y por fermentación. En el crecimiento respiratorio, la membrana es plana, pero al inducir el crecimiento fotosintético, en anaerobiosis, se desarrollan invaginaciones de la membrana, denominadas cromatóforos, donde está el aparato fotofosforilante. La gran versatilidad metabólica de estas bacterias, aunada a otras características como la facilidad de cultivarlas, la obtención de membranas y la disponibilidad de mutantes, han permitido que estas bacterias hayan sido usadas como un excelente modelo para estudios en bioenergética (Pfenning y Trüper 1974).

Estas bacterias son capaces de crecer en diversos ambientes, no solamente en cuerpos de agua, sino que también en sedimentos y humedales donde participan en los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre (Imhoff & Truper, 1989; Madigan et al., 2002; Wang et al.,

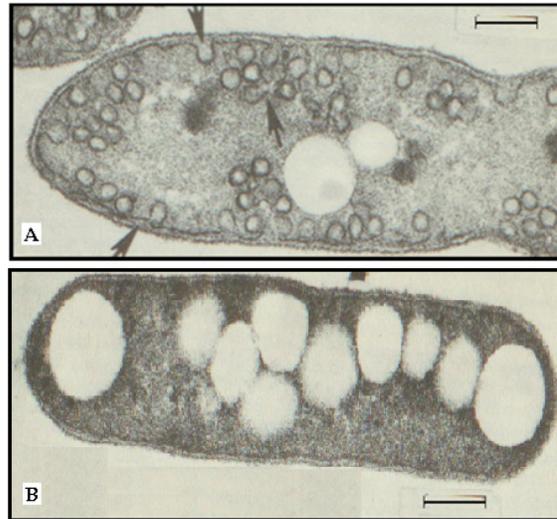
1993). Las bacterias púrpura no sulfurosas pueden llevar a cabo fotosíntesis anoxigénica eficientemente gracias a la bacterioclorofila, además poseen pigmentos carotenoides los cuales imparten el color rojo, castaño o verde distintivo del grupo. También, este grupo se caracteriza por su morfología de bacilos y cocobacilos Gram-negativo. Las bacterias púrpura no sulfurosas han adquirido importancia en estudios recientes en la biotecnología y biorremediación debido a su versatilidad fisiológica en la utilización de diversas fuentes de carbono (Huang et al., 2001; McGrath & Harfoot, 1997; Rajasekhar et al., 1998). Se ha identificado una gran cantidad de especies de organismos que viven en estos ambientes; pero muy poco se conoce de las bacterias que ahí habitan, creando la posibilidad de encontrar nuevos géneros y especies de bacterias con aplicabilidad biotecnológica.

#### **2.4.2 Características generales de las Bacterias Fotosintéticas Púrpuras No Sulfurosas (BFPNS)**

La importancia ecológica y biogeoquímica de las BFPNS ha sido reconocida por muchos científicos. Estos organismos son excelentes fijadores de nitrógeno, contribuyendo a la productividad del ecosistema en que residen (Madigan, 1998; Pfening, 1989). Estas bacterias también juegan un papel importante en los ciclos de carbono y azufre (Pfening, 1989). En ecosistemas acuáticos, la oxidación de sulfuro a azufre o a sulfato es una actividad biogeoquímica de gran importancia; debido a esto, a este grupo comúnmente se le considera responsable de estas actividades en lagos estratificados (Pfening, 1989).

Las BFPNS muestran diferencias en su morfología y fisiología, lo que puede ser utilizado como una herramienta taxonómica para su identificación y caracterización (Oda et al., 2002). La propiedad más importante de estas bacterias es la presencia de pigmentos fotosintéticos, con un espectro de absorción de luz entre un intervalo de 625 y 1040 nm (Glaeser & Overmann, 1999). En adición, las BFPNS poseen un aparato fotosintético que genera energía mediante un sistema dependiente de luz (Glaeser &

Overmann, 1999). Generalmente la biosíntesis de los pigmentos y la activación del aparato fotosintético son suprimidos por oxígeno y regulados por la intensidad de luz (Imhoff & Caumette, 2004).



**Fig 3.** Esquema general de la membrana de bacterias: en **A** *Rba. sphaeroides* creciendo anaeróticamente con luz, y en **B** *Rba. sphaeroides* con crecimiento semi-aeróbico en la oscuridad. La barra corresponde a  $0.2\mu\text{m}$ , se muestran también gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), las flechas señalan a los cromatóforos (Tomada de Remsen, 1978).

Las BFPNS son un grupo fisiológicamente versátil de bacterias que crecen en ambientes anaeróbicos en presencia de luz o aeróbica y anaeróticamente en oscuridad con diferentes fuentes de carbono, donantes de electrones y fuentes de nitrógeno (Hougardy et al., 2000). Todos los géneros de este grupo, al crecer bajo condiciones anaerobias en presencia de luz, son capaces de realizar la fotosíntesis de manera fotoautotrófica o fotoheterotróficamente (Pappas et al., 2004). Otra ventaja de este grupo microbiano es que puede crecer en condiciones microaeróbicas en oscuridad, como quimioheterótrofos o quimioautótrofos mediante respiración o fermentación (Van Niel, 1941).

Las bacterias BFPNS han sido utilizadas para procesos de tratamiento de aguas usadas, para la reducción de olor de lagunas de almacenaje de desperdicios vacunos y para la producción de biomasa (Glaeser & Overmann, 1999), hidrogeno molecular (Imhoff & Truper, 1989) y vitaminas (Imhoff & Caumette, 2004). Este grupo bacteriano ha mostrado resistencia a metales pesados, dando a la célula la habilidad de crecer en presencia de metales raros en la tierra (Mehrabi et al., 2001).

Este grupo bacteriano ha demostrado, además, su capacidad de crecimiento en ambientes contaminados con compuestos halogenados, sugiriendo que posiblemente estas bacterias pueden removerlos de cuerpos de agua o sedimentos, lo que es un gran aporte para el área de la biotecnología ambiental (McGrath & Harfoot, 1997). Miembros de este grupo poseen la capacidad de biorremediar lugares contaminados, ya que científicos han probado su potencial de degradación de compuestos herbicidas (Muller et al., 2001), hidrocarburos de aceite mineral (Popp et al., 2006), latex (Kantachote et al., 2005), nitrofenoles (Blasco & Castillo, 1992) fenol (Watanabe et al., 1998), diesel (Vrodljak et al., 2005), tolueno (Zengler et al., 1999), benceno (Fahy et al., 2006) y metales pesados peligrosos para la salud (tales como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , y  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) (Giotta et al., 2006).

Algunas especies bacterianas de este grupo poseen la capacidad de producir hidrogeno gaseoso (el cual puede ser utilizado como combustible no contaminante) utilizando la energía más abundante en la naturaleza, la luz solar (Zurrer & Achofen, 1979). Esto ha despertado el interés del Departamento de Energía de los Estados Unidos, científicos y otras agencias que intentan buscar nuevas fuentes de energía alterna y renovable. Recientemente, Franchi y colaboradores (2004) reportaron mediante mutaciones realizadas a *Rhodobacter sphaeroides*, un aumento en la producción de biohidrógeno combinado con desperdicios de comida. También pueden servir como reductores de nitrato y ser útiles en la disimilación de compuestos aromáticos (Hougardy et al., 2000).

### 2.4.3 Características taxonómicas de las BFPNS

La distribución taxonómica de las BFPNS ha variado en gran medida en los últimos años, debido a descubrimientos de nuevas especies y a la redistribución de géneros. Las herramientas moleculares han permitido que científicos puedan diferenciar genéticamente a grupos de BFPNS y han surgido nuevos géneros de esta manera. Al momento de esta investigación han sido descritas alrededor de 60 especies de BFPNS. Estas se redistribuyen en cinco ordenes: *Rhodospirillales*, *Rhodobacterales*, *Rhizobiales* en las  $\alpha$ -proteobacterias y *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* en las  $\beta$ -proteobacterias. La mayoría de las bacterias de este grupo se encuentran en los ordenes *Rhodospirillales* (familia *Rhodospirillaceae*) y *Rhodoobacterales* (familia *Rhodobacteraceae*) (Imhoff & Truper, 2005).

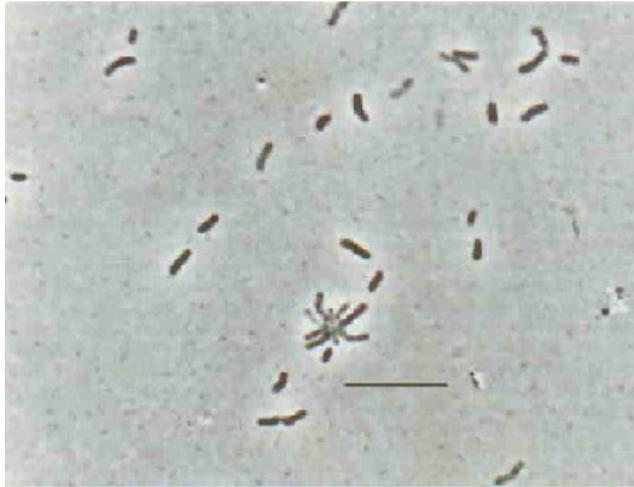
Hasta el año de 1989 solo se conocían seis géneros dentro del grupo de BFPNS: *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodocyclus*, *Rhodoophila*, *Rhodomicrobium* y *Rhodospirillum*. Se reclasificaron varias especies bajo los géneros *Phaeospirillum*, *Rhodovivrio* y *Rhoseospira* (Imhoff *et al.*, 1998). Hiraishi y colaboradores (1995) describieron por primera vez el género *Rhodobium* aislado de ambientes marinos de Japón. Imhoff y colaboradores (1998) describieron por primera vez el género *Roseospirillum* fue aislado de un tapete microbiológico en Woods Hole, Massachussets. Milford y colaboradores (2000) describieron por primera vez el género *Rhodobaca* en el lago Bogoria, localizado en Kenya, Africa. Hasta el momento, 21 géneros han sido descritos como miembros del grupo de las BFPNS y este número sigue en aumento.

### 2.4.4 Género *Rhodobium*

El género *Rhodobium* es el único en la familia *Rhodobiaceae*. Sus dos especies reportadas hasta el 2007 prefieren lugares salinos para vivir, tales como agua de mar, salinas y tapetes microbianos. Son mesófilicas con intervalo de crecimiento de 2 a 8 % de NaCl. (Imhoff & Truper, 2005).

#### 2.4.4.1 Características principales de *Rhodobium orientis*

*Rhodobium orientis* es una bacteria fotosintética purpura no sulfurosa cuyas células son ovoides o bacilos de  $7.0-0.9 \mu\text{m} \times 1.5-3.2 \mu\text{m}$ , móviles por medio de flagelos polares, subpolares o aleatoriamente distribuidos; se multiplican por gemación y división celular asimétrica. Hay presencia de membrana fotosintética interna en forma lamelar subyacente y paralela a la membrana citoplásmica. El color de las células en suspensión con crecimiento fototrófico va del rosa salmón a rojo, mientras que los cultivos con crecimiento aeróbico o cultivos desnitrificados son ligeramente rosados o incoloros. La máxima absorbancia de las células vivas es a 377, 468, 500, 530, 591, 802 y 870 nm (Imhoff, *et al.*, 2005).



**Fig 4.** Microfotografía de contraste de fase mostrando la morfología celular general de *Rhodobium orientis* (cepa MB 312). Barra = 10  $\mu\text{m}$ . (Tomada de Imhoff *et al.*, 2005.)

Son Gram negativas pertenecientes a las  $\alpha$ -*proteobacteria*. Sus pigmentos fotosintéticos son bacterioclorofila  $\alpha$ , y carotenoides de la serie de la espiroxantina. Habitan en cuerpos estancados de agua marina y ambientes marinos similares (Imhoff e Hiraishi, 2005).



**Fig 5.** Microfotografía electrónica de sección fina de *Rhodobium orientis* (cepa BM 312) mostrando membranas fotosintéticas internas del tipo lamelar (indicado por flecha). Barra = 0.5  $\mu\text{m}$ . (Tomada de Hiraishi *et al.*, 1995.)

El crecimiento de estas bacterias se estimula considerablemente mediante la adición de extracto de levadura al 0.05%. Los factores de crecimiento requeridos son ácido  $\rho$ -aminobenzoico y biotina. Bacteria marina mesofílica con crecimiento óptimo a 30-35°C, pH 7.0-7.5 en presencia de 4-5% NaCl. No hay crecimiento en ausencia de NaCl (Imhoff e Hiraishi, 2005).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los trabajos realizados acerca de la relación PPi-PPasa, así como de los cationes que actúan como cofactores en sus reacciones han sido de gran importancia para los avances en los estudios de bioenergética, sin embargo no se tiene muy claro cuáles son los mecanismos reguladores que dirigen la actividad tanto de la PPasa citoplásmica como de la PPasa membranal, por lo tanto se requiere de mucha más información para conocer y tratar de ubicar el papel de las PPasas en las bacterias fotosintéticas, por lo que, en este trabajo se analizarán las principales características bioquímicas de la enzima PPasa particularmente de la bacteria fotosintética púrpura no sulfurosa *Rhodobium orientis*.

## 4. HIPÓTESIS

Debido a que se ha encontrado que en bacterias fotosintéticas las PPasas citoplásmicas de familia I coexisten con las H<sup>+</sup>PPasas y que esta relación no se presenta con las PPasas citoplásmicas de familia II, la hipótesis a probar es que dependiendo del tipo de PPasa citoplásmica que presente *Rhodobium orientis* se de la misma relación con respecto a las H<sup>+</sup>PPasas.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las enzimas PPasas de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodobium orientis* mediante un perfil bioquímico considerando la evaluación de su actividad específica de hidrólisis, requerimiento de cofactores, perfil de pH y peso molecular.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Extraer y purificar la enzima pirofosfatasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas.
- b. Determinar el tipo de PPasa citoplásmica presente en la bacteria fotosintética *Rhodobium orientis*, mediante la evaluación de su actividad específica y su peso molecular.
- c. Dependiendo de la familia de la PPasa citoplásmica extraer la H<sup>+</sup>PPasa a partir de cromatóforos de membrana y medir su actividad específica de hidrólisis.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Cultivo de Bacterias

En todos los experimentos se utilizó la cepa tipo No.11290 de la bacteria fotosintética *Rhodobium orientis*, obtenida de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) en 2008.

#### 6.1.1 Medio de Cultivo para *Rhodobium orientis*

Para el crecimiento de esta bacteria se prepararon dos clases de medio de cultivo:

##### Medio líquido

Para crecer la bacteria se utilizó el medio 745: DSIC modificado de acuerdo a DSMZ 2008, para lo cual se requirió preparar las siguientes soluciones:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7.34 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.56 mM
NaCl	860 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	98 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.34 mM
Solución de elementos traza SL-8	1.00 ml
Extracto de levadura	1.00 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2.01 mM
Agua destilada	1000.00 ml
<i>Solución de elementos traza SL-8:</i>	
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	5.20 g
$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	7,54 mM
$\text{ZnCl}_2$	0.51 mM

MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0.50 mM
CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	1.2 mM
CuCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.09 mM
NiCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.15 mM
Na <sub>2</sub> MoSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.14 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.0 mM
Agua destilada	1000.00 ml

Se ajustó a pH 6.8 con NaOH ó HCl

A éste medio se le burbujeó nitrógeno (UN1066 INFRA) por 10 minutos para desplazar todo el oxígeno posible y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos.

### Medio sólido

El medio sólido se preparó agregando agar al 2% al medio líquido 745, se esterilizó en autoclave por 20 min a 120°C y 15 atm de presión, se colocó en cajas de Petri o en viales con tapa de rosca de 15 a 20 ml de capacidad. Una vez que el medio solidificó se incubó por 24 hrs a 36°C con la finalidad de corroborar ausencia de posibles contaminantes.

#### 6.1.2 Siembra de *Rhodobium orientis*

Las bacterias se sembraron en placa por el medio de dilución para obtener colonias únicas. De ahí se tomó una de ellas y se sembró por punción en los viales con medio sólido. Se incubaron en la oscuridad por 12 hrs para permitir que el crecimiento aeróbico de estos organismos elimine parcialmente el O<sub>2</sub> del medio.

Las bacterias sembradas se expusieron a la luz de focos con filamentos de tungsteno de 40W, colocadas a una distancia de 30 cm.

### 6.1.3 Curva de crecimiento

Para conocer la curva de crecimiento se tomaron 2 tubos conteniendo medio líquido y 1.3 ml de cultivo líquido, proporción 1:10 (v / v), se usó un fotocolorímetro Klett-Summerson y se tomaron las unidades Klett (UK). De acuerdo a éstas unidades con respecto al tiempo se siguió inoculando 1:10 (v/v), primero en matraz Erlenmayer de 125 ml, después en botellas de 1 l y posteriormente en botellas de 9 l; cerrándolos con tapones de hule herméticos dejando la mínima cantidad de aire dentro, también se dejaron en la oscuridad por 12 horas y después expuestos a la luz de focos con filamentos de tungsteno de 40W, colocadas a una distancia de 30 cm.

### 6.1.4 Cosecha

Las bacterias cultivadas, una vez que se encontraron en la fase de crecimiento logarítmica tardía se cosecharon centrifugándolas a 14 340x g durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall RC-5B.

Una vez formada la pastilla, las bacterias se lavaron con MOPS 50mM, KCl 50 mM pH 7.0 para eliminar por completo los residuos del medio y se centrifugaron a 14 340x g por 15 min en una centrifuga Sorvall RC-5B. Las pastillas se pesaron restando el peso de la botella y esto se consideró como peso húmedo. Se almacenaron a -70°C en un ultracongelador REVCO.

## 6.2 PIROFOSFATASA MEMBRANAL (H<sup>+</sup>PPasa)

### 6.2.1 Obtención de cromatóforos (H<sup>+</sup>PPasa)

Para la obtención de cromatóforos se siguió el método descrito por Baccarini-Melandri *et al*, en 1978, bajo algunas modificaciones:

Las bacterias se resuspendieron en buffer de glicil-glicina 200 mM pH 7.4 en una proporción 1:6 (bacterias: buffer), se agregó 1 mg de DNAsa por cada 100g de peso húmedo de bacterias y MgCl<sub>2</sub> 1mM con la finalidad de romper el DNA liberado.

Para romper las células se sonicaron en lotes de 25 ml en un sonicador Branson (sonifier 250) a máxima potencia por 3 ciclos de 2.5 min por 1 min de descanso y enfriando con baño de agua y hielo a 4°C.

La muestra una vez sonicada, se centrifugó a 35 850x g durante 20 min a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5B con la finalidad de eliminar la pared celular, células sin romper y cápsulas, manteniendo en el sobrenadante los cromatóforos y las proteínas citoplásmicas.

El sobrenadante (cromatóforos y proteínas citoplásmicas) se centrifugó a 242 000x g durante 80 min a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL-90 para sedimentar los cromatóforos. La pastilla de cromatóforos se resuspendió en glicil-glicina 200mM, EDTA 5 mM y EGTA 5 mM a pH 7.4 y se centrifugó una vez mas a 242 000x g durante 80 min a 4°C con el objeto de eliminar todos los cationes divalentes de la preparación.

Se resuspendieron los cromatóforos en buffer glicil-glicina 200 mM pH 7.4 y se centrifugó a 242 000x g durante 80 min a 4°C, esto con la finalidad de eliminar el EDTA.

Se decantó y la pastilla resultante se resuspendió en glicil-glicina 50 mM pH 7.4 en una proporción de 2 ml de buffer por 1 g de bacterias los cuales pueden ser almacenados por no más de tres días después de los cuales la enzima pierde su actividad hidrolítica.

## **6.3 PIROFOSFATASA CITOPLASMICA**

### **6.3.1 Purificación**

Para la purificación parcial de PPasa citoplásmica de Familia I y Familia II se sigue el método reportado por Celis y colaboradores en 2003.

### 6.3.2 Purificación Parcial de PPasa citoplásmica como Familia I .

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron una proporción 1:3 (p / v) de buffer B (50 mM Tris-HCL pH 8.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM ZnSO<sub>4</sub>) y DNAsa (1 mg por cada 100 g de bacterias). El homogeneizado se sonicó en lotes de 20 mL por cinco ciclos de 2.5 min por 1min de descanso en un sonicador Branson (sonifier 250) a máxima potencia y enfriando con baño de agua y hielo a 4° C.

El sonicado se centrifugó 242 000x g a 4°C durante 80 min en una ultracentrífuga Beckman XL-90. El pH del sobrenadante se ajustó a 8.6 con HCL, se tomó una alícuota de 2 ml correspondiente al extracto crudo. El resto se dividió en alícuotas de 15 ml y se calentó a 60° C por 5 min. El extracto calentado se centrifugó a 35 850x g durante 20 min en una centrífuga Sorvall RC-5B y se tomó una muestra de 1 ml. El volumen restante se midió para hacer los cortes con sulfato de amonio: 0-40%, 40-50% y 60-65% (las cantidades se toman de la matriz para la precipitación de proteínas con sulfato de amonio reportada por Harris en 1989), agregando lentamente. Entre cada saturación se centrifugó a 35 850x g durante 20 min. La pastilla de la última fracción se resuspendió en 3 ml del siguiente buffer: Tris-HCl 20 mM pH 8.6, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de ZnSO<sub>4</sub> y 2 mM 2-Mercaptoetanol, se dializó en una membrana YM30 toda la noche contra 3000 ml del mismo buffer. El extracto dializado se guardó a -70°C.

### 6.3.3 Purificación Parcial de PPasa citoplásmica como Familia II

Las bacterias (peso húmedo) se resuspendieron en una proporción 1:3 (p / v) de buffer B (50mM Tris-HCL pH8.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM CoSO<sub>4</sub>) y DNAsa (1mg por cada 100 g de bacterias).

El homogeneizado se sonicó en lotes de 20 mL por cinco ciclos de 2.5 min por 1min de descanso en un sonicador Branson (sonifier 250) a máxima potencia y enfriando con baño de agua y hielo a 4 C.

El sonicado se centrifugó a 242 000x g a 4°C durante 80 min en una ultracentrífuga Beckman XL-90. El pH del sobrenadante se ajustó a 8.6, se tomó una alícuota de 2 ml correspondiente al extracto crudo, el volumen restante se midió para hacer los cortes con sulfato de amonio: 0-60% y 60-80%, agregando lentamente. Entre cada saturación se centrifugó a 35 850x g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5B. La pastilla de la última fracción se resuspendió en 3 ml del siguiente buffer: Tris-HCl 20 mM pH 8.6, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.1 mM de CoSO<sub>4</sub> y se dializó toda la noche contra 3000 ml del mismo buffer. El extracto dializado se guardó a -70°C.

#### 6.4 Determinación de proteína.

La cantidad de proteína se cuantificó por los métodos de *Lowry et al.* (1951), utilizando como estándar albúmina de suero bovino (ASB). Para ello, 20 y 40 µl de la enzima se diluyeron con agua desionizada a una proporción 1:10 y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro LUCY 1 de Anthos Laboratory Instruments.

Preparación de disoluciones

- A. CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O al 1%
- B. Tartrato de sodio-potasio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> • 4 H<sub>2</sub>O) al 2%
- C. { 50 ml solución D  
0.5 ml sol A  
0.5 ml sol B
- D. Carbonato de sodio (NaCO<sub>3</sub>) al 2%
- E. Reactivo de Folin : H<sub>2</sub>O desionizada 1 : 1
- F. Albumina de suero bovino (ASB) 1 mg/ml

Método

1. Agregar 20, 40, 60, 80, 100 µl de ASB 1 mg/ml
2. Aforar a 0.4 ml con H<sub>2</sub>O desionizada
3. Agregar a cada tubo 2.5 ml de sol C
4. Agitar y esperar 10 min

5. Agregar a cada tubo 250µl de Folin - H<sub>2</sub>O 1 : 1
6. Agitar y esperar 30 min
7. Leer absorbancia en espectrofotómetro a 560 nm

ml de solución por tubo						
ASB mg/ml	0	20	40	60	80	100
H <sub>2</sub> O desionizada	400	380	360	340	320	300
Sol C	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

### 6.5 Determinación de actividad específica cromatóforos (H<sup>+</sup>PPasa)

La actividad hidrolítica se cuantificó como la liberación de Pi a partir de P<sub>i</sub> a 30°C en la oscuridad (en un cuarto iluminado con luz verde de seguridad, según Schiff, 1972). El medio de reacción contenía Tris-Maleato 50mM pH 6.5, NaP<sub>i</sub> 2mM pH 6.5; en algunos casos también se utilizaron cationes divalentes (MgCl<sub>2</sub> ó MnCl<sub>2</sub> ó CoCl<sub>2</sub> ó ZnCl<sub>2</sub> ó CaCl<sub>2</sub>) en una concentración de 3mM, considerando como controles a los ensayos con proteína sin catión.

La reacción se inició al agregar alrededor de 0.5 mg de proteína en cromatóforos, se incubó por 10 minutos y se detuvo agregando ácido tricloroacético al 6%. El fosfato libre se cuantificó de acuerdo al método reportado por Sumner en 1944, midiendo la absorbancia a 660 nm. La actividad específica es reportada en µmoles Pi min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

### 6.6 Determinación de la actividad específica PPasa citoplásmica Fam I y II

La actividad hidrolítica o actividad de la pirofosfatasa citoplásmica, se cuantificó como la liberación de de Pi a partir de P<sub>i</sub> a 37°C, en presencia de cationes divalentes (MgCl<sub>2</sub> ó MnCl<sub>2</sub> ó CoCl<sub>2</sub> ó ZnCl<sub>2</sub> ó CaCl<sub>2</sub>). El medio de

reacción en general contenía: Tris-Maleico 50 mM pH 8.6 y NaPPi 0.5 mM, considerando como controles los ensayos con proteína sin catión.

La reacción se inició al añadir 20  $\mu$ l (35  $\mu$ g) de la PPasa citoplásmica purificada parcialmente, el medio se incubó a 37 °C durante 10 minutos y la reacción se detuvo al añadir ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 6%. Se cuantificó el Pi presente en el sobrenadante mediante el método de Sumner en 1944, el cual se fundamenta en la formación de un complejo fosfomolibdico de color amarillo que al inducir un reductor ELON (*p*-metilaminofenol sulfato + bisulfito de sodio) se torna azul y se forma el complejo fosfomolibdato de amonio. Se midió con un lector de ELISA la concentración de fosforo presente. La actividad específica se refiere como  $\mu$ moles Pi  $\text{min}^{-1}$  mg de proteína<sup>-1</sup>.

### **6.7 Columna cromatográfica de exclusión molecular**

Se empacó una columna de 100 mm<sup>3</sup> con sephacryl S-200 HR y se agregaron 300 ml de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.5 + 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, esto con el fin de equilibrar el pH de la columna y eliminar posibles contaminantes. Posteriormente la columna se cargó con azul dextran con peso de 2000 kD y se deja eluyendo para determinar el volumen de elución ó V<sub>0</sub> (espacio vacío entre esferas de sephacryl).

#### **6.7.1 Calibración de la columna**

Se realizó la curva de calibración de la columna, se escogieron 3 proteínas de peso molecular conocido [Citocromo *c* (12 kDa), ASB (66 kDa) y  $\beta$ -amilasa (200 kDa)], cuya concentración era de 2 mg/ml. La determinación de proteína se hizo por el método cualitativo leyendo la absorbancia del citocromo *c* y la  $\beta$ -amilasa a 400 nm, del ASB a 280 nm con ello se determinó la fracción que presentaba la máxima densidad óptica y se graficó contra el logaritmo del peso molecular para obtener la ecuación de la recta.

Para este método se colocó un mililitro de la muestra en una celda de cuarzo de 1 cm<sup>3</sup> y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Las longitudes de onda a que absorben las diferentes proteínas y por ende a las que se leen, se especifican en cada una de las secciones donde se utiliza este método (Harris, 1989).

### 6.7.2 Carga de la columna

La muestra ya dializada se cargó en la columna que se equilibró con buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.6, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, para coleccionar 80 fracciones de 3 ml (50 gotas aprox.) cada una mediante un colector de fracciones Gilson. Se determinó la proteína de manera cualitativa midiendo la absorbancia a 280 nm. Con el volumen de elución se determinó su peso molecular. Las fracciones que presentaron proteína se les determinó la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica, se graficó y se decidió juntar las fracciones de mayor actividad, posteriormente, se concentró con una membrana CENTRICON YM30 y se determinó su concentración por el método de Lowry *et al.* (1951).

### 6.8 Geles de poliacrilamida (PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida (PAGE) con un porcentaje de 10 para el gel separador y 4 para el gel concentrador de acuerdo al **cuadro "1"**:

Cuadro 1. Geles de poliacrilamida		
Reactivo	Gel separador 10%	Gel concentrador 4%
Agua	4 816 µl	2 825 µl
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	3 330 µl	666 µl
Buffer resolvidor	1 250 µl	-----
Buffer concentrador	-----	1 250 µl
Persulfato de amonio 1.5%	500 µl	250 µl
TEMED	10 µl	5 µl
SDS*	100 µl	50 µl

\*solo se agrega a geles en condiciones desnaturalizantes

El porcentaje de agua se agregó en función de si el gel es nativo o en condiciones desnaturalizantes

### 6.8.1 Determinación de actividad hidrolítica en gel

Para determinar la actividad hidrolítica en gel (zimograma) se realizó PAGE de la muestra de PPasa. Al gel, en condiciones nativas, no desnaturizantes, se agregó aproximadamente 0.25 µg de proteína mas 15 µl de mezcla de digestión (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul bromofenol). Se corrió a 20 mA el gel concentrador y a 40 mA el gel separador a 4 °C con buffer de electroforesis (0.025 M Tris, 0.192 M de glicina, pH 8.3).

Para medir la actividad hidrolítica en el gel se prepararon las disoluciones indicadas en el **Cuadro 2**.

**Cuadro “2”**. Disoluciones para realizar actividad en gel

Solución I	Solución II	Solución III
Tris-HCl 20 mM pH 8.6	Tris-HCl 50 mM pH 8.6	10% Molibdato-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [5% de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4H <sub>2</sub> O; 40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N]
	MgCl <sub>2</sub> 5 mM	90% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5 M
	NaPPi 3 mM	Ac. Ascórbico 1.5 %

El gel se pasó a la solución I que es la solución de lavado y se mantuvo con agitación durante 15 min. Una vez que transcurrido el tiempo, el gel se pasó a la solución II (medio de reacción) y se mantuvo en baño de agua a 37°C durante 15 min e inmediatamente después del tiempo de reacción se lavó con solución I. Por último se reveló el gel con solución III en baño de agua a 45°C hasta que se observaron las bandas azules de actividad. Fue medido el frente del gel (se tomó la distancia recorrida por el azul de bromofenol) y la distancia recorrida por la enzima, con lo cual se determinó el **R<sub>f</sub>**, que es específico para la enzima. Los cálculos se hicieron bajo la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra el frente del gel}}{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}$$

Después el gel se tiñó con colorante Azul de Coomassie (Sung-Jong e Ishikawa 2005), para verificar de manera cualitativa el grado de purificación y ubicar la proteína en el gel.

### 6.8.2 SDS-PAGE

Para conocer el peso molecular y de cuántas unidades está formada la enzima, se realizó un gel en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de segunda dimensión (al buffer de corrida de geles en condiciones desnaturizantes también se le agregó 1% SDS pH 8.3), utilizando marcadores de peso molecular como estándar y la sPPasa purificada de la columna de exclusión molecular. Posteriormente, se tiñó con colorante Azul de Coomassie.

La movilidad electroforética relativa (**Rf**) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con los estándares de PM conocido (**Cuadro 3**), se obtuvo una ecuación de referencia en la cual se pudo interpolar la muestra de PM desconocido (García, 2000).

**Cuadro 3.** Marcadores de peso molecular (SIGMA)

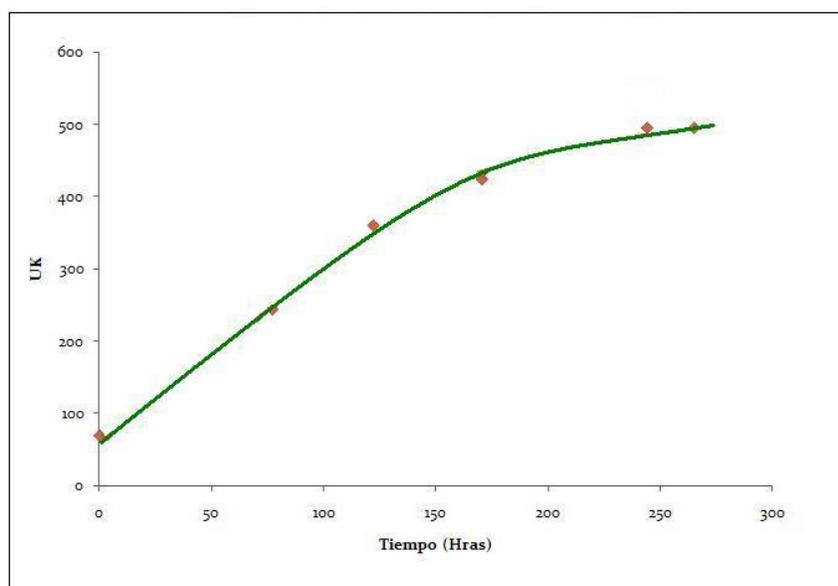
<b>Marcador</b>		<b>Peso molecular kDa</b>
$\alpha$ -lactalbumina		<b>14.2</b>
Anhidrasa carbónica (eritrocito bovino)		<b>29.0</b>
Albumina de huevo		<b>45.0</b>
Albumina suero de bovino	Monómero	<b>66.0</b>
	Dímero	<b>132.0</b>

Todos los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces y los resultados se obtuvieron como la media de los datos (Escobedo, 1998; Richter y Schafer, 1992). Los reactivos fueron de grado químico y se obtuvieron de proveedores comerciales.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Curva de crecimiento

De acuerdo a la curva de crecimiento obtenida para *Rhodobium. orientis* (**Grafica 1.**) se fijo un tiempo de 8 días (193 hrs) para la cosecha de las bacterias, ya que es hasta este tiempo cuando se alcanza la fase logarítmica tardía utilizando el medio de cultivo 745 DSIC con una concentración de 5% de NaCl.



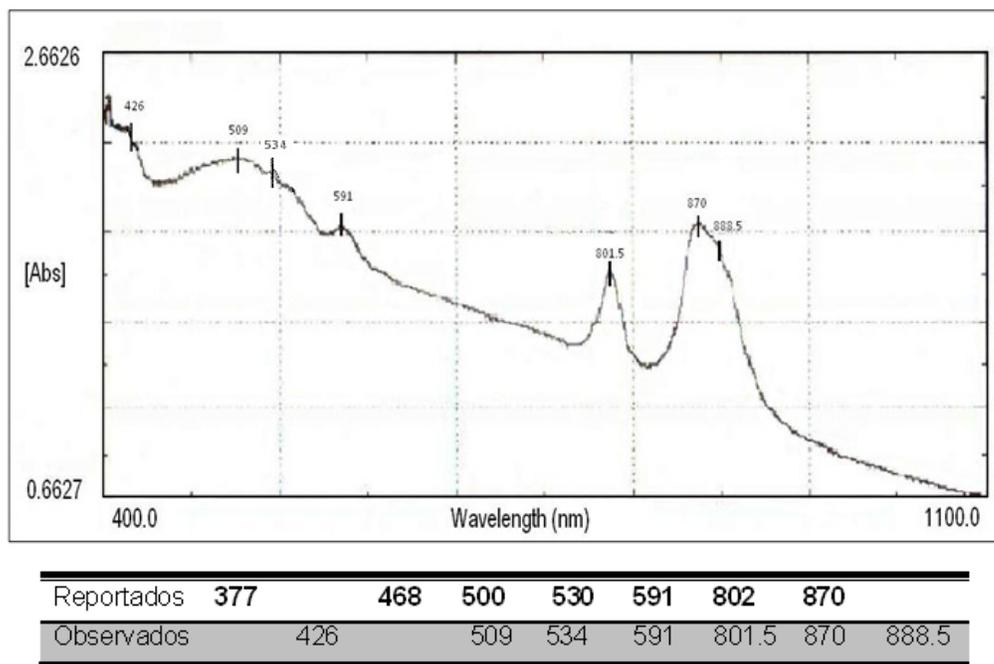
**Grafica 1.** Curva de crecimiento de *Rhodobium orientis*, medio 745 DSIC, con 5% NaCl

### 7.2 Espectro y Tinción de Gram

El espectro obtenido del cultivo de bacterias diluido 1:10 con agua desionizada muestra una correlación con varios de los picos reportados en la bibliografía (Imhoff *et al*, 2005) (**Fig. 6**), el pico que no aparece en el grafico es debido a que el espectro estaba sólo con luz visible, el otro pico de 468 corresponde a la bacterioclorofila a y su ausencia se debe muy posiblemente a la diferencia de medios utilizados entre los métodos (cromatóforos) y el utilizado en nuestro laboratorio (bacterias vivas). La concordancia entre los picos reportados y los leídos por el espectrofotómetro son suficientes para realizar la comparación y

deducir que efectivamente se trataba de la bacteria *Rhodobium orientis* y no estaba contaminada con otras especies de bacterias fotosintéticas.

Con la tinción de Gram se descartó la contaminación por hongos y otras especies bacterianas. En ambos casos se confirmó que el cultivo se encontraba libre de contaminantes.



**Fig 6.** Comparación de los puntos en el espectro de absorción reportados (Imhoff, 2005) y observados experimentalmente en la cepa empleada, en nm.

### 7.3 PPasa membranal

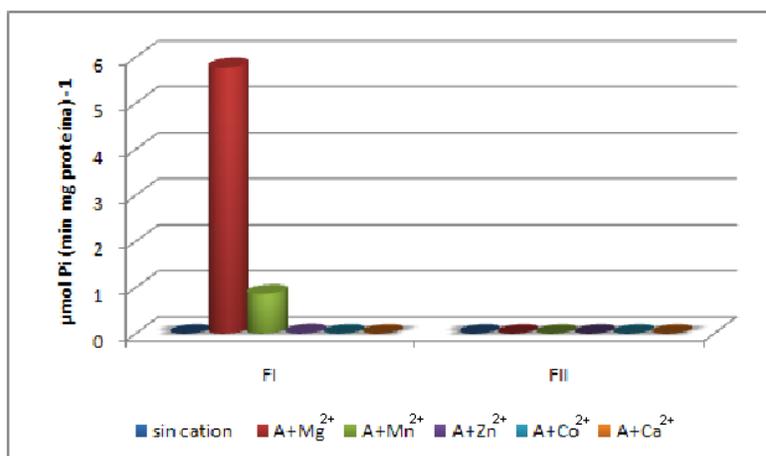
Para los ensayos de la medición de la actividad hidrolítica de la H<sup>+</sup>PPasa se utilizó el extracto de cromatóforos de *Rhodobium orientis* bajo las condiciones descritas en el método en los cuales se encontró una considerable actividad hidrolítica. En el cuadro "4". se presentan los resultados obtenidos de actividad hidrolítica de la H<sup>+</sup>PPasa de cuatro bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas incluyendo *Rhodobium orientis*, bajo las mismas condiciones de purificación y medio de reacción.

**Cuadro 4.** Actividad Especifica de la H<sup>+</sup>PPasa

	<i>Rsp. rubrum</i>	<i>Rba. sphaeroides</i>	<i>Rhv. sodomensis</i>	<i>Rbi. orientis</i>
AE*	0.10	0.00	0.00	0.08

\*  $\mu\text{mol Pi (min mg de proteína)}^{-1}$ **7.4 Caracterización de la PPasa citoplásmica****7.4.1 Determinación de Familia de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis***

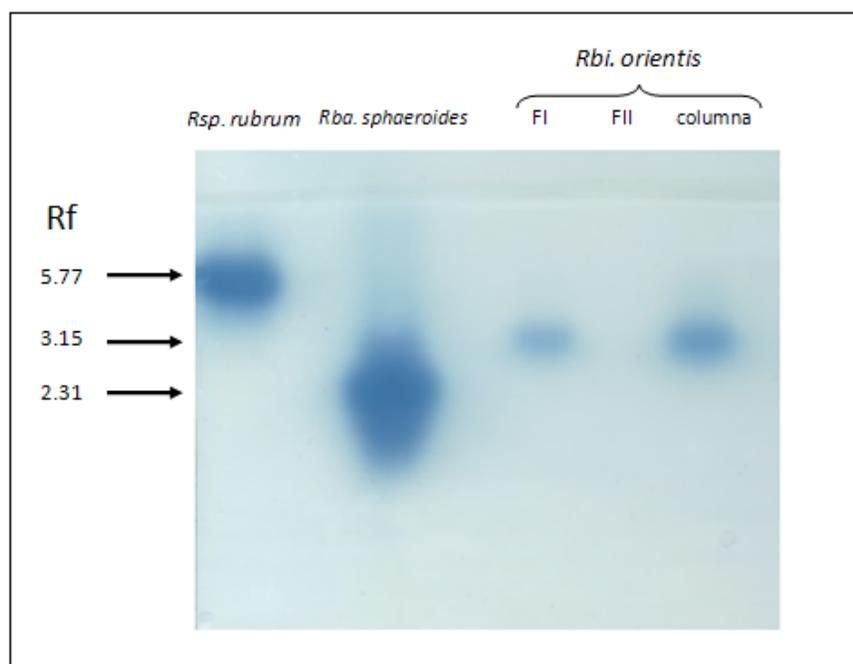
Para la determinación de la familia de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* se realizó la purificación parcial por ambos métodos, el propuesto para familia I y el método propuesto para la familia II, después se midió la actividad hidrolítica de ambas enzimas utilizando diferentes cationes divalentes, lo cual revelo que únicamente la enzima purificada parcialmente por el método propuesto para familia I muestra actividad hidrolítica  $5.741 \mu\text{mol Pi (min mg proteína)}^{-1}$  (**Gráfica 2**), siendo esta actividad similar a las descritas para otras PPasas citoplásmicas de familia I de otras bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas.



**Gráfica 2.** Comparación de la actividad hidrolítica específica de la PPasa citoplásmica de *Rbi. orientis* purificada parcialmente como FI y como FII. El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl pH 8.6; 2mM NaPPi, 3 mM de cationes divalentes (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup>) y 35  $\mu\text{g}$  de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C.

### 7.4.2 Zimograma

Para comprobar los resultados obtenidos por medio de la medición de la actividad hidrolítica por el método de Sumner se realizó un zimograma el cual mostró que solamente se marcaban las bandas de la actividad hidrolítica cuando la enzima era purificada como familia I. En este gel también se incluyeron también extractos dializados de la sPPasa de *Rhodospirillum rubrum* [prototipo FI (Romero *et al.*, 2003)] y de *Rhodobacter sphaeroides* [prototipo FII (Celis *et al.*, 2003)] como referencia de los dos tipos de PPasa citoplásmica descritos en bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas. Los extractos de *Rhodobium orientis* corrieron con un Rf intermedio al de *Rhodospirillum Rubrum* y *Rhodobacter Sphaeroides* (Fig 7).

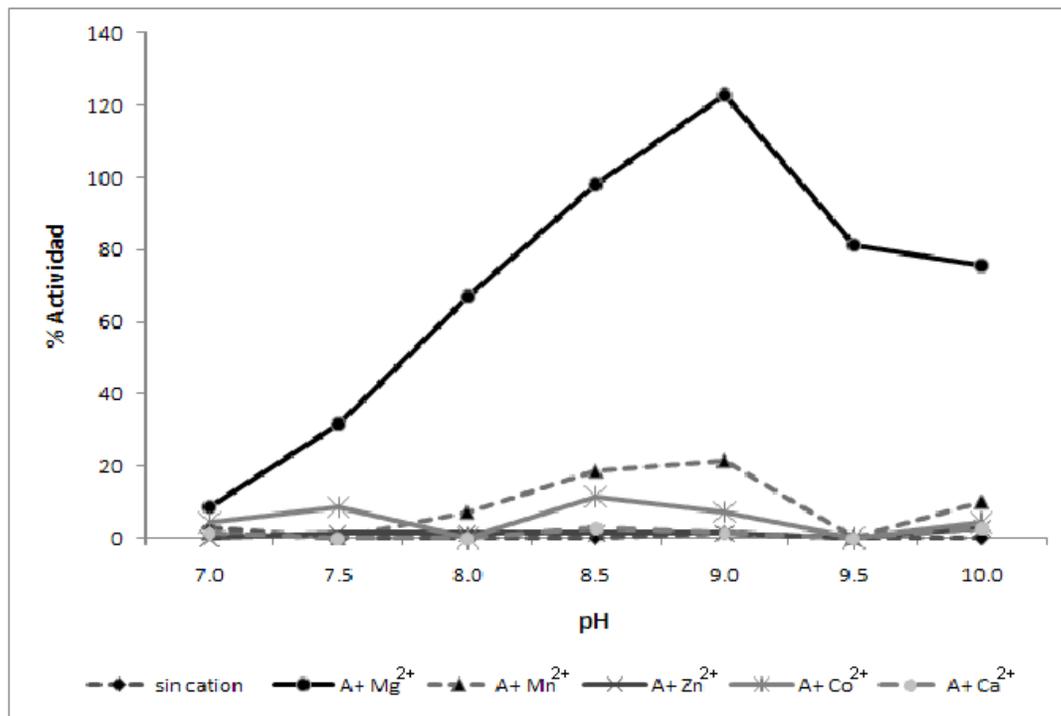


**Fig. 7.** Zimograma de los extractos dializados de la sPPasa de *Rbi. orientis* purificada como FI y como FII.

Se realizaron ensayos preliminares donde la sPPasa de *Rhodospirillum rubrum* se purificó bajo las condiciones para la Familia II y *Rhodobacter sphaeroides* como FI para tomar de referencia la selectividad de estos dos métodos para cada familia.

### 7.4.3 Perfil de pH.

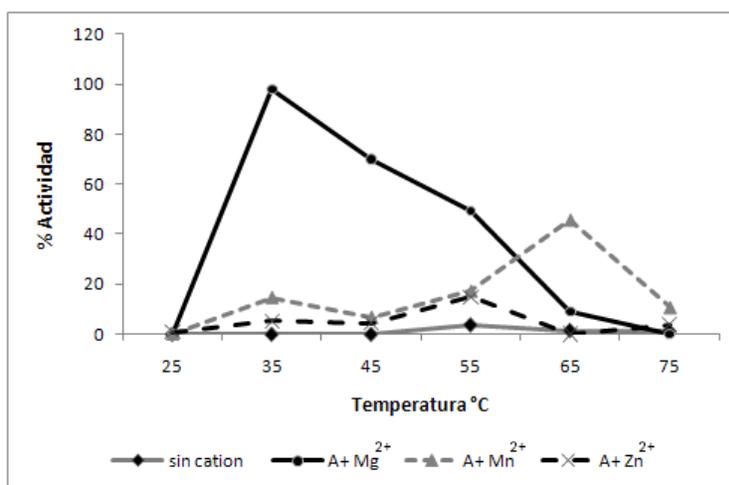
La PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* cataliza la hidrólisis del complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> sobre un amplio intervalo de pH. Por medio de un análisis grafico se encontró que el pH óptimo de la enzima tiene un valor de 9.0. Con otros complejos Me-PPi<sup>2-</sup>, la actividad hidrolítica disminuye por abajo del 20% de la actividad registrada con el complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> (Gráfica 3).



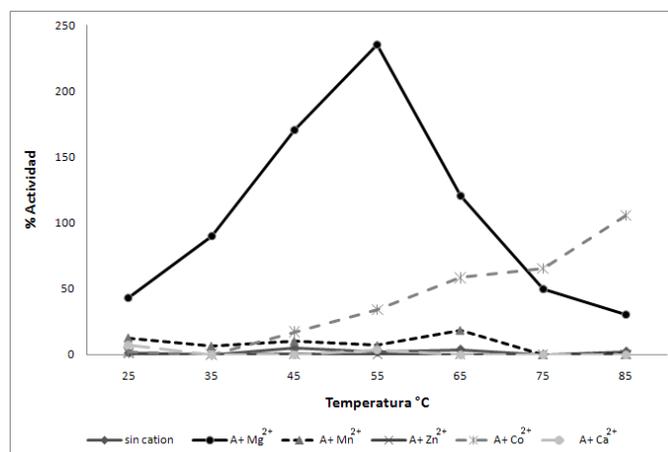
**Gráfica 3.** Perfil de pH de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis*. El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl ( pH 7-9 ) , Gly- Gly ( pH 9.5-10), respectivamente; 2mM NaPPi, 3mM Me<sup>2+</sup> y 35 µg de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C.

#### 7.4.4 Termoestabilidad y temperatura de activación

Al preincubar la muestra durante 10 minutos a las temperaturas correspondientes se muestra una baja termoestabilidad con el complejo Mg-PPi<sup>2-</sup>, que al incrementar la temperatura, pierde su estabilidad disminuyendo así su actividad hidrolítica. Los ensayos se realizaron en un intervalo de temperatura entre 25 y 75 °C.



**Gráfica 4.** Termoestabilidad de la sPPasa de *Rhodobium orientis*, preincubada durante 10 min a las temperaturas correspondientes (25, 35, 45, 55, 65, 75 °C). Después se midió la actividad, el medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl pH 8.6, 2 mM NaPPi pH 8.6, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ó MnCl<sub>2</sub> ó CoCl<sub>2</sub> y 35 µg de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C.



**Gráfica 5.** Temperatura de activación la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis*. El medio de reacción fué 50 mM de Tris-HCl pH 8.6, 2 mM NaPPi pH 8.6, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ó MnCl<sub>2</sub> ó CoCl<sub>2</sub> y 35 µg de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min. a 25, 35, 45, 55, 65 y 75°C, respectivamente. El 100% de la actividad se tomó a 37°C.

### 7.4.5 Especificidad de sustrato

La sPPasa de *Rhodobium orientis* muestra ser específica únicamente para el sustrato verdadero  $MgP_2O_7^{2-}$  y no presenta actividad hidrolítica con los complejos  $Mg^{2+}$  con  $\rho$ -nitrofenilfosfato, ácido fosfoenolpirúvico ó ADP; el Pi no se libera significativamente con ATP (**Cuadro 5**). No hay inhibición de la actividad hidrolítica de la sPPasa frente a la adición de molibdato de sodio (10mM) (ensayos preliminares) con lo cual se elimina la posibilidad de la presencia de una fosfatasa inespecífica en la preparación de la enzima (Weil-Malherbe y Green 1951; Oliva et al., 2000). Los complejos de los diferentes sustratos utilizados en el ensayo y los otros cationes divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) no participan en la función catalítica de la sPPasa, por lo cual no se registra actividad significativa.

**Cuadro 5.** A. Especifica y porcentaje de actividad de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* frente a diferentes complejos  $Mg^{2+}$  - sustrato

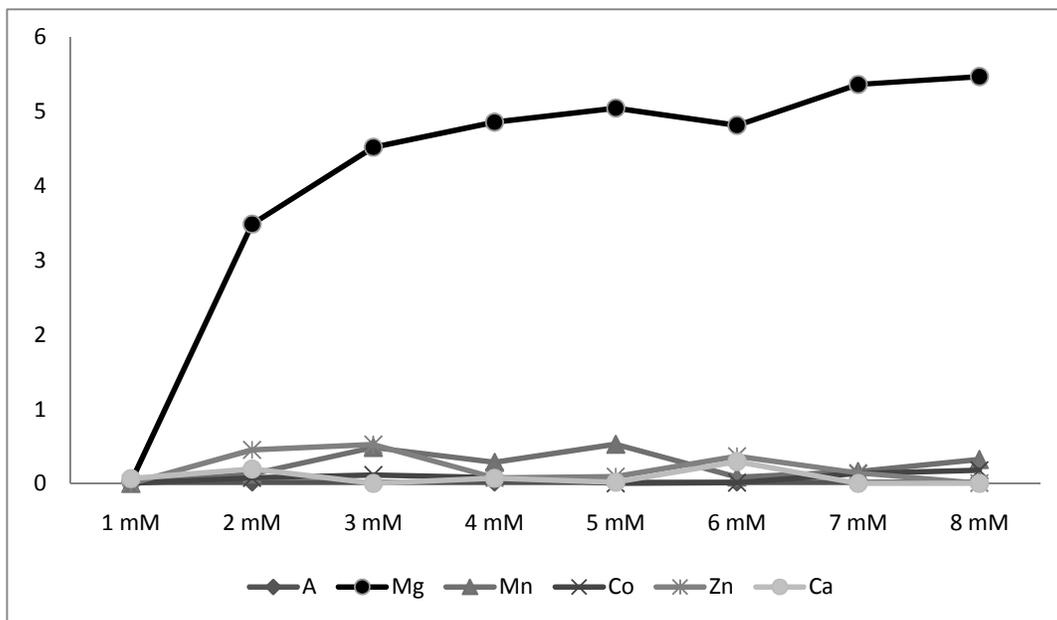
Nombre sustrato	Formula	A.E. Sustrato-Mg	% A.E.
Pirofosfato tetrasódico	$Na_4P_2O_7$	$5,741 \pm 0.059$	100
$\rho$ -nitrofenil fosfato	$C_{14}H_{28}N_3O_{12}P$	0	0
Acido (fosfoenol) piruvico	$C_3H_2Na_3O_6P$	0	0
ATP adenosin 5'-trifosfato	$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$	$0.1 \pm 0.01$	1.6
ADP adenosin 5'-difosfato	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	0	0

El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl pH 8.6, 2 mM de sustrato pH 8.6, 3 mM de catión ( $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CoCl_2$  o  $CaCl_2$ ) y 35  $\mu$ g de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37 °C.

### 7.4.6 Efecto de la concentración de diferentes cationes divalentes sobre la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis*

La sPPasa de *Rhodobium orientis* es dependiente de cationes divalentes como cofactores para realizar su actividad hidrolítica, responde sensiblemente a cambios en la concentración de los cationes en la mezcla de reacción, mostrando su más alta actividad en presencia de  $Mg^{2+}$ ; otros cationes ( $Mn^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Ca^{2+}$ ) pueden reemplazar débilmente al  $Mg^{2+}$ , pero su efectividad se encuentra por debajo del 10% y en un intervalo de 2-6 mM. El  $Ca^{2+}$  no activa a la enzima para su función catalítica.

La dependencia de cationes (cofactores) de la sPPasa de *Rhodobium orientis*, en todos los casos la relación  $[Me^{2+}] / [PPi]$  debe de ser igual o mayor a 1 para que se observe actividad hidrolítica (**Grafica 6**).



**Gráfica 6.** Efecto del  $MgCl_2$  y otros cationes divalentes,  $MnCl_2$  ó  $CoCl_2$  ó  $ZnCl_2$  ó  $CaCl_2$ , sobre de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis*. El medio de reacción fue 50 mM de Tris-HCl pH 8.6; 2mM NaPPi, 1-8 mM de catión y 35  $\mu g$  de proteína. El tiempo de incubación fue de 10 min a 37°C. (A) Actividad sin catión.

### 7.4.7 Efecto del NaF sobre la actividad hidrolítica

El fluoruro es el inhibidor clásico de las pirofosfatasas citoplásmicas de familia I así como de las pirofosfatasas membranales, no inhibe la PPasas citoplásmicas de familia II. La inhibición del NaF (10mM) sobre la sPPasa de *Rhodobium orientis* se expresa en una reducción del 100% de la actividad hidrolítica en “presencia” del sustrato Mg-PPi<sup>2-</sup>.

En este cuadro se muestran datos de los efectos inhibitorios del NaF sobre algunas bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas representativas de ambas familias I y II respectivamente y de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas de carácter halófilo (**cuadro 6**).

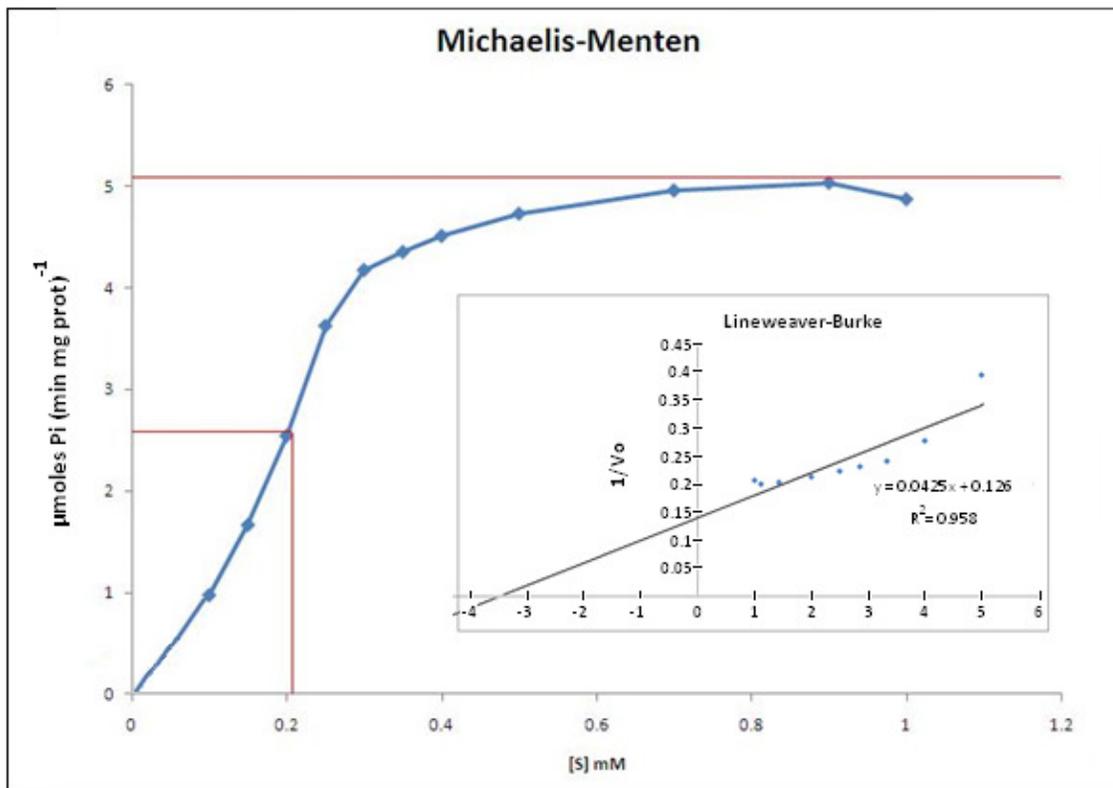
**Cuadro 6.** Efecto NaF sobre la actividad hidrolítica de la sPPasa de diferentes especies de bacterias

Bacteria	% inhibición NaF
<i>Rsp. rubrum</i>	100
<i>Rps. palustris</i>	70
<i>Rdp. globiformis</i>	90
<i>Rba. sphaeroides</i>	0
<i>Rba. capsulatus</i>	0
<i>Rbv. sulfidophilum</i>	0
<i>Rbi.orientis</i> <sup>e</sup>	100
<i>Rhv. salinarum</i>	100
<i>Rhv. sodomensis</i> <sup>e</sup>	98

Tomado de Escobedo *et al.*, 2005. <sup>e</sup> Datos experimentales. En rosa bacterias con sPPasa FI, en naranja bacterias con sPPasa de FII y en azul bacterias halófilas.

### 7.4.8 Constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima

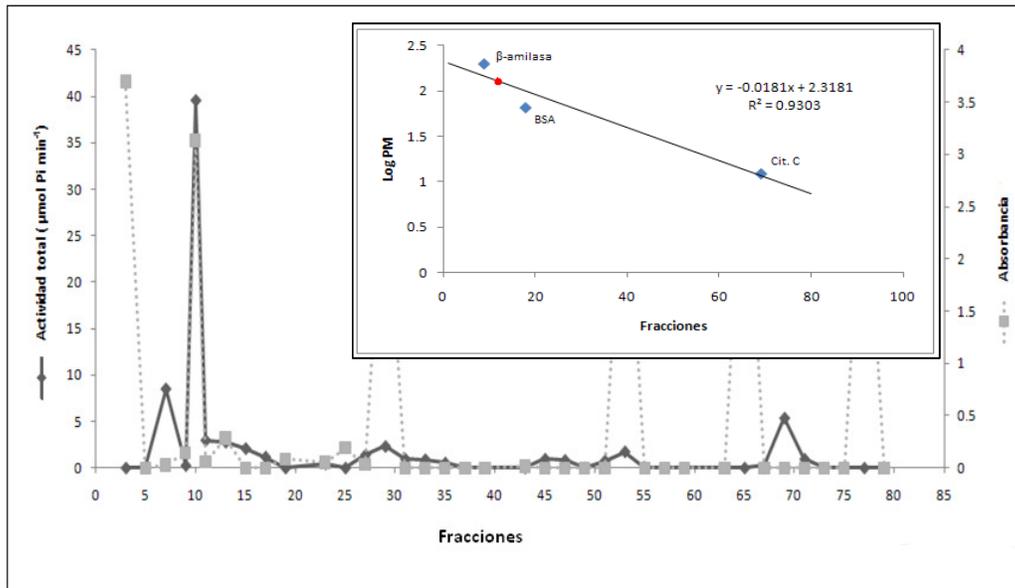
El modelo cinético de la sPPasa purificada parcialmente (extracto dializado FI) de *Rhodobium orientis* parece comportarse de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten (**Grafica 7**), por lo que se utilizó la ecuación del doble recíproco (Lineweaver-Burke)(Klemme y Gest, 1971; Segel, 1975; Lyndal, 1997) para calcular la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_m$ ). Cuando  $MgCl_2 / PPi = 1$ , se obtuvieron los valores de 0.316 mM para  $K_m$  y una  $V_{max}$  de  $5.034 \mu\text{mol Pi min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ .



**Grafica 7.** Estimación de la constante de Michaelis y la velocidad máxima de la enzima sPPasa de *Rhodobium orientis*. El medio de reacción fue: 50mM de Tris-HCl pH 8.6, concentraciones equimoleculares de NaPPi y de  $MgCl_2$ . La reacción se inició al añadir 35  $\mu\text{g}$  de proteína, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 2 min y se paró al agregar TCA al 6%.

### 7.4.9 Peso molecular

De acuerdo a la columna de Sephacryl S-200 HR (**Grafica 8**) se determino un peso molecular para la sPPasa de *Rhodobium orientis* de aproximadamente 137 kDa. (**Cuadro 7**)



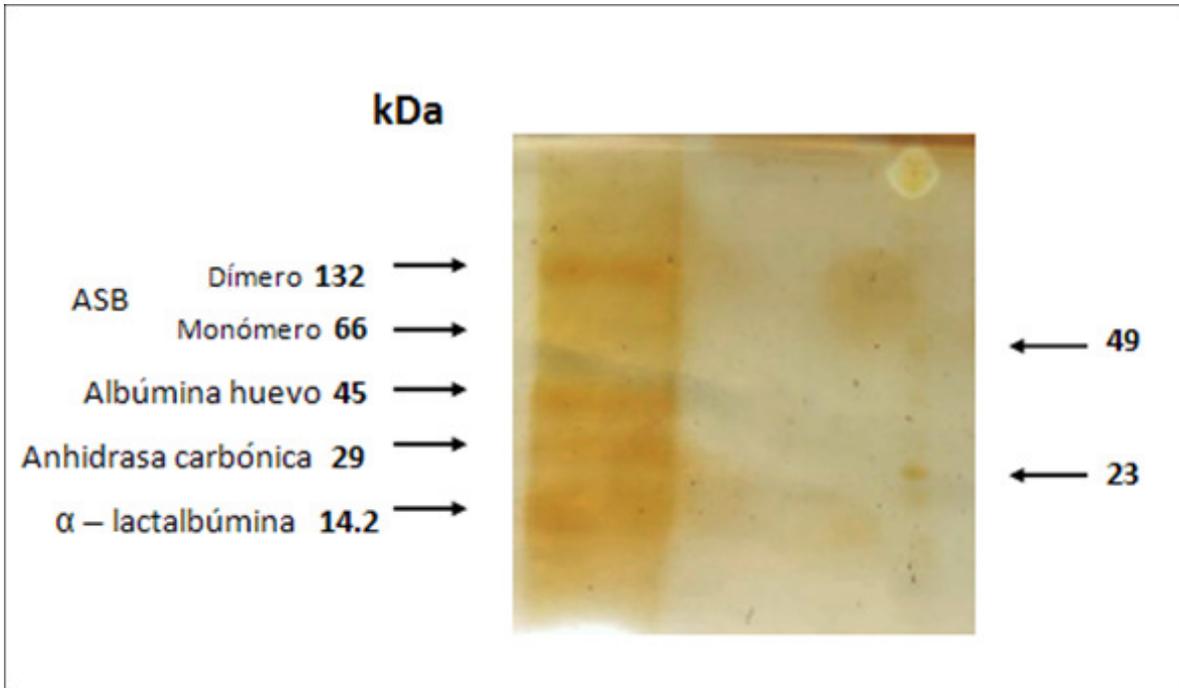
**Grafica 8.** Curva estándar de calibración de la columna de Sephacryl S-200

STD	PM	log PM
Citocromo C	12.5	1.0969
BSA	60	1.778
β-amilasa	200	2.301
<b>PPasa citoplásmica <i>Rhodobium orientis</i></b>	<b>137.11</b>	<b>2.14</b>

**Cuadro 7.** Cuadro de peso molecular de los estándares empleados y el de sPPasa de *Rhodobium orientis*

### 7.4.10 SDS-PAGE

Por medio de los resultados preliminares del gel de electroforesis de segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se dedujo que la sPPasa de *Rhodobium orientis* es un tetrámero formado por dos homodímeros, dos de 49 y dos de 23 kDa cada una (respectivamente) (Fig 8).



**Fig 8** . SDS-PAGE donde se muestran las bandas de los marcadores utilizados (izquierda) y las bandas de la sPPasa de *Rhodobium orientis* (derecha).

## 7.5 Resumen comparativo de algunas propiedades de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* y de otras bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas

El comportamiento de la sPPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* presenta características similares a las reportadas para bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas de familia I, en el **cuadro 8**, se muestra un resumen de algunas de las características comparativas entre las PPasas de diferentes especies de BFPNS de la familia *Rhodospirilleceae*.

**Cuadro 8.** Resumen de características bioquímicas de la sPPasa de algunas bacterias de la familia *Rhodospirilleceae*

Bacteria	H <sup>+</sup> PPasa	PPasa Cit.		PM kDa	Características de las PPasas Citoplásmicas			
		FI	FII		AE* s/cación	AE* Mg	AE* Mn	% I** NaF
<i>Rsp. rubrum</i>	Si	Si	No	120	0	1.32	0	100
<i>Rsp. fulvum</i>	Si	Si	No		0	0.15	0.05	97
<i>Rmi. vannielli</i>	Si	Si	No		0	4.9	0.4	100
<i>Rps. palustris</i>	Si	Si	No	100	0.01	0.92	0.11	70
<i>Rps. gelatinosa</i>	Si	Si	No		0.07	0.13	0.07	55
<i>Rps. viridis</i>	Si	Si	No		0	2.38	0.42	100
<i>Rps. globiformis</i>	Si	Si	No		0	2	0.64	90
<i>Rba. sphaeroides</i>	No	No	Si	64	1.2	1.2	0.84	0
<i>Rba. capsulatus</i>	No	No	Si		2.6	10.35	9.26	0
<i>Rba. sulfidophilus</i>	No	No	Si		2.1	15.9	1.8	0
<b><i>Rbi. orientis</i><sup>e</sup></b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>137</b>	<b>0</b>	<b>5.74</b>	<b>0.211</b>	<b>100</b>
<i>Rhv. salinarum</i>	No	Si	Si		0.03	7.4	1.02	100
<i>Rhv. sodomensis</i> <sup>e</sup>	No	Si		151	0.07	4.64	0.71	100
			Si		0.01	5.34	1.12	

\*AE en  $\mu\text{moles de Pi (min mg proteína)}^{-1}$ . Tomado de Escobedo *et al.*, 2005. \*\*I =inhibicion

<sup>e</sup> Datos experimentales.

En fondo azul se presentan los datos de bacterias halófilas.

## 8. Discusión

Las PPasas inorgánicas citoplásmicas catalizan la hidrólisis de PPi, un producto de numerosas reacciones importantes que incluyen la polimerización de ácido nucleico, síntesis de coenzimas y la activación de aminoácidos y grasas. Por medio de la hidrólisis del PPi, la enzima cambia en su totalidad el equilibrio a favor de la síntesis y así juega un rol vital en la célula.

La PPasa proporciona el modelo de reacción más simple para los estudios de la energía de transducción a nivel de la formación del enlace fosfoanhídrido así como de su ruptura y los datos derivados son útiles para el entendimiento de la síntesis tanto del PPi como del ATP.

En este trabajo se ha encontrado que en la bacteria *Rhodobium orientis*, la mayoría de la actividad de la PPasa se localiza en el citosol y se presenta la primera purificación y caracterización de esta PPasa citoplásmica. Las propiedades de la PPasa citoplásmica purificada parcialmente de *Rhodobium orientis* son similares a las de otras sPPasas.

Las PPasas eucariotas tienen una estructura homodimérica con subunidades de aproximadamente 30 kDa (Cohen et al. 1978; Hachimori et al. 1983). Las PPasas de bacterias (Wong *et al.* 1970) y de arqueas (Verhoeven et al. 1986; Richter y Schäffer 1992) forman complejos hexaméricos o tetraméricos con unidades simples (individuales) de aproximadamente 20 kDa. La PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* presenta características congruentes a las descritas para bacterias con un peso molecular de aproximadamente 137 kDa obtenido a través de la columna de sephacryl S-200 HR. Los resultados preliminares del gel de 2<sup>da</sup> dimensión en condiciones desnaturalizantes muestran que es un tetrámero formado por subunidades de homodímeros con un peso molecular de aproximadamente 49 kDa y 23 kDa cada uno, vale la pena estudiar esto más a fondo debido a que por lo general las sPPasas suelen ser homodímeros, homotetrámeros u homohexámeros. El pH óptimo para la

sPPasa de *Rhodobium orientis* fue de 9 lo que concuerda con la mayoría de las sPPasas (pH 8.3 – 9.8) (Josse 1996; Tominaga y Mori 1977; Hachimori et al 1975; Verhoeven et al. 1986). Solamente las PPasas de una arquea metanogénica y dos termofílicas tienen un pH óptimo más bajo (6.5 – 8) (Van Alebeek et al. 1994; Jetten et al. 1992; Richter y Säffer 1992; Meyer et al. 1995).

Se encontró que el NaF que es un inhibidor típico de las sPPasas de Familia I en una concentración de 10 mM inhibe en un 100% la actividad hidrolítica de la PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis*. El papel de la inhibición del fluoruro sobre estas PPasas se explica por la formación de un complejo que es sumamente estable donde el PPI se une covalentemente a la enzima. Por lo que el fluoruro se considera un potente inhibidor a nivel del sitio activo de estas enzimas, ya que impide la unión de los cationes que son indispensables para la actividad (Baykov et al., 1977). Sin embargo no todas las PPasas interactúan con el fluoruro del mismo modo. Las sPPasas eucariotas parecen ser más sensibles al fluoruro, las PPasas de bacterias y arqueas se inhiben más débilmente (el efecto del fluoruro sobre las PPasas de bacterias y arqueas es más débil): las PPasas de *Rhodospseudomonas palustris* (Schwarm et al. 1986) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Van Alebeek et al. 1994) se inhiben en un 50% a 5 mM y 0.9 mM de fluoruro respectivamente. La PPasa de *E. coli* se inhibe en un 91% a una concentración de 1mM (Josse, 1996) y la enzima de *Thiobacillus* en un 81% a 1.25 mM (Tominaga y Mori 1997), mientras otras PPasas bacterianas no son afectadas por el fluoruro en absoluto [*Streptococcus* (Lahti y Niemi 1981), *Ureaplasma* (Davis et al. 1987), *Methanotrix soehngenii* (Jetten et al. 1992)]. En comparación la sensibilidad al fluoruro por parte de la PPasa de *Rhodobium orientis* es similar a la de la mayoría de las bacterias fotosintéticas.

El complejo Mg-PPi<sup>2-</sup> parece ser el sustrato único para la sPPasa de *Rhodobium orientis*. La sPPasa de *Rhodobium orientis* demuestra las características para el sustrato y catión específico Mg-PPi<sup>2-</sup> de las PPasas. La PPasa citoplásmica de *Rhodobium orientis* es completamente dependiente de la presencia de un catión divalente para su acción catalítica, siendo el Mg<sup>2+</sup> el que le confiere su mayor

actividad. El  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  pueden sustituir muy debilmente al  $Mg^{2+}$  pero la efectividad de éstos se limita a un estrecho intervalo de concentraciones y la actividad no es significativa. La preferencia por el  $Mg^{2+}$  ha sido observada en la mayoría de las PPasas que se han investigado hasta ahora, con algunas excepciones como la PPasa de *Basillus subtilis*, la cual muestra su mayor actividad con el  $Mn^{2+}$  (Tono y Kornberg, 1967), y la sPPasa de *Rhodopseudomonas palustris*, en la cual es el  $Ca^{2+}$  la que la de la máxima actividad hidrolítica (Schwarm et al. 1986).

El papel de la sPPasa de *Rhodobium orientis* es probablemente muy sencillo. Como la enzima se encuentra en el citoplasma, no desempeña ningún papel en la conservación de energía. Su función, así como la de otras sPPasas es la de mantener la concentración de PPi baja, aunque la posibilidad de que pueda proveer algo de energía para otras vías biosintéticas a través de la hidrólisis de PPi no puede ser descartada.

La sPPasa de *Rhodobium orientis* muestra un comportamiento complicado del tipo observado en aquellas enzimas en donde la actividad está sujeta a la regulación metabólica. Como ocurre con muchas de estas enzimas (Frieden 1970), dos clases principales de los efectos de control son evidentes a partir de estudios realizados *in vitro*: en primer lugar, respuestas rápidas a cambios en la concentración de varios ligandos, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  y ácido 2-fosfoglicérico, y en segundo lugar las respuestas lentas, presumiblemente relacionadas con alteraciones conformacionales, como las inducidas por cambios en el pH.

Estudios enzimológicos comparativos en cinco especies de bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas han revelado la existencia de 2 categorías de pirofosfatasas citoplásmicas con respecto a propiedades regulatorias. En ciertos organismos, la enzima tiene un peso molecular relativamente bajo ( $\approx 60kDa$ ) y manifiesta una reacción cinética "Michaeliana" sencilla. Por otro lado, las pirofosfatasas de otras bacterias son de un peso molecular más alto ( $\approx 100kDa$ ) y muestran cinéticas complejas (Klemme y Gest., 1971).

La magnitud y el significado real de  $V_{max}$  y  $K_m$  pueden cambiar de una enzima a otra y estos valores describen un estado estacionario de la reacción sin aportar información sobre la naturaleza, velocidad y número de los pasos discretos de la reacción, aún así estos valores sirven para caracterizar y comparar las eficiencias catalíticas de las enzimas. Bajo las condiciones ensayadas de equimolaridad de  $Mg^{2+}$  y de  $PPi^{2-}$ , se obtuvo el 88 % de la actividad registrada con respecto a la relación  $Mg^{2+}/PPi^{2-} = 1.5$  descrita en el método. El valor de  $K_m$  obtenido muestra gran eficiencia de la PPasa hacia el sustrato.

La sPPasa de *Rhodobium orientis* muestra propiedades consistentes con la noción de que su actividad debe estar íntimamente regulada *in vivo* por efectores específicos de bajo peso molecular. El  $Mg^{2+}$ , está involucrado en la actividad catalítica por lo menos de dos formas; como un componente del sustrato,  $MgPPi$ , y como activador; el exceso de  $Mg^{2+}$  también puede estimular la actividad mediante complejos de  $P_2O_7^{4-}$  libre, el cual es un potente inhibidor (Klemme y Gest., 1971).

Los resultados presentes subrayan la necesidad de realizar estudios comparativos sobre pirofosfatasas de otros tipos celulares como un enfoque para delinear los papeles que juegan las pirofosfatasas en el ciclo biológico del fosfato y como éstos han sido modificados en el curso de la evolución bioquímica y así tratar de ubicar el papel de las PPasas citoplásmica y membranal tanto en las bacterias fotosintéticas como en otros organismos procariotas y eucariotas.

## 9. CONCLUSIONES

- Con respecto al crecimiento de la cepa DSM No.11290 de la bacteria fotosintética *Rhodobium orientis*, el tiempo de generación se estableció en 8 días (193 hrs) a una concentración de 5% de NaCl en el medio.
- Se encontró actividad hidrolítica significativa por parte de la H+PPasa.
- La sPPasa de la bacteria fotosintética purpura no sulfurosa *Rhodobium orientis* obedece exclusivamente al método de purificación descrito para la Fam I.
- Tiene un comportamiento electroforético diferente ( $R_f$  intermedio) a la sPPasa de *Rhodospirillum rubrum* (FI) y a la sPPasa de *Rhodobacter sphaeroides* (FII), lo que nos da indicios de que puede ser una enzima diferente a las familia I y familia II.
- La caracterización de la PPasa se presenta en el siguiente cuadro:

**Cuadro 9.** Características bioquímicas de la sPPasa de la bacteria *Rhodobium orientis*

<b>pH óptimo</b>	9.0
<b>Termoestabilidad (°C)</b>	35-37
<b>Temperatura activación (°C)</b>	55
<b>Sustrato</b>	MgP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>
<b>Catión activador</b>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Inhibidor</b>	NaF
<b>Actividad con diferentes cationes divalentes</b>	Mg <sup>2+</sup> > Mn <sup>2+</sup> > Zn <sup>2+</sup> > Co <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>
<b>Km (mM)</b>	0.316
<b>Vmax*</b>	5.034
<b>PM (kDa)</b>	137
<b>Subunidades moleculares</b>	Homodímeros; Dos de 49 kDa y dos de 23 kDa

\*  $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  con concentraciones equimoleculares de sustrato

## 10. REFERENCIAS

**Ahn S, Milner AJ, Fütterer K, Konopka M, Ilias M, Young TW & White SA.** (2001). The open and closed structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J Mol Biol.* 313, 797-811.

**Baccarini-Melandri, A. Y Melandri, B. A.** (1978). Coupling factors in the photosynthetic Bacteria. Eds. Clayton, R. K. Y Siström, W. R., Plenum Press, New York and London. pp. 615-628.

**Baltcheffsky, H., von Stedingk, L.-V., Heldt, H. W., and Klingenberg, M.** (1966). Inorganic pyrophosphatase: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153, 1120-1122.

**Baltcheffsky, M.** (1964). Some characteristics of the pyrophosphatase reaction in energy systems. In Abstracts Book 1<sup>st</sup> FEBS Meeting, pp. 67 - 68. London.

**Baltcheffsky, M.** (1967). Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature* 216, 241 - 243.

**Baltcheffsky, M.** (1969). Reserved energy conversion reactions of bacterial photophosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 46 - 53.

**Baltcheffsky, M., Nandanaciva, S., and Shultz, A.** (1998). A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphatase synthase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Acta* 1364, 301-306.

**Baltscheffsky, H. y von Stedingk, L. V.** (1966). Bacterial photophosphorylation in the absence of added nucleotide. A second intermediate stage of energy transfer in light-induced formation of ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22: 722-728.

**Baltscheffsky, M. y Nyrén, P.** (1984). The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. *Bioenergetics*. Edit. L. Ernster. Ed. Elsevier, Amsterdam. pp 187-206.

**Baykov, A., Artjukov, A. and Avaeva.** (1977). Fluoride inhibition of inorganic pyrophosphatase. III. Dependence on the nature of substrate and metal ion cofactor. *Biochimica et Biophysica Acta.* 481: 195 – 201.

**Blasco R. y Castillo, F.** (1992). Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2): 690-5.

**Calvin, M.** (1963). Evolution of photosynthetic mechanisms. *The Gradual journal* 5, 319-328.

**Celis, H. y Romero, I.** (1987). The phosphate-pyrophosphate exchange and hydrolytic reactions of the membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*: Effects of pH and divalent cations. [Journal of Bioenergetics and Biomembranes](#). 19: 255-272.

**Celis H., Franco B., Escobedo, S. y Romero, I.** (2003). *Rhodobacter sphaeroides* has a family II pyrophosphatase: comparison with other species of photosynthetic bacteria. *Arch Microbiol.* 179: 368-376.

**CNC-IUBMB,** (2008). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/6/1/>

**Cohen SA., Sterner R., Keim PS., Heinrikson RL.** (1978). Covalent structural analysis of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 253: 889-897.

**Cooperman BS.** (1982). *Methods in enzymology*. Vol. 87. Academic Press Inc. New York, NY. Pp. 526-548

**Cooperman B S., Baykov AA y Lahti R.** (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem. Sci* 17, 262-266.

**Davis JW., Moses IS., Ndubuka C. y Ortiz R.** (1987). Inorganic pyrophosphatase activity in cell-free extracts of *Ureaplasma urealyticum*. *J. Gen Microbiol.* 133: 1453-1459.

**Drozdowicz Y. M., Lu, Y. P., Patel, V., Fitz-Gibbon, S., Miller, J. H., y Rea, P. A.** (1990). A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. *FEBS Lett.* 406, 505-512.

**DSMZ,** medium 000745 [en línea] 2004 [27 noviembre 2008] URL disponible en: <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/media/medium000745.html>

**Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N y Hatch, M. D.** (1985). Pyruvate, Pi dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C4 Photosynthesis: Properties and mechanism of light dark regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 255-286.

**Escobedo, S.** (1998). Inhibición de la pirofosfatasa membranal de *Rhodospirillum rubrum* por trifenilestaño. Tesis para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias, UNAM. Director Dra. Irma Romero Álvarez. Pg. 46.

**Escobedo, S., Jimenez-Xolalpa, D., Reyes, B., Romero, I. y Celis, H.** (2005). Correlación entre el tipo de pirofosfatasa citoplásmica y la presencia de

pirofosfatasa membranal en bacterias fotosintéticas purpura no sulfurosas. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas.

**Fabrichniy, I., Lehtio, L., Tammenkoski, M., Zyryanov, A., Oksanen, E., Baykov, A., Lahti, R. and Goldman, A.** (2007). A Trimetal Site and Substrate Distortion in a Family II Inorganic Pyrophosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 1422-1431.

**Fahy A., McGenity T.J., Timmis K.N. y Ball A.S.** (2006). Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol.*, 58(2): 260-70.

**Franchi E., Tosi, C., Scolla, G., Penna, G.D., Rodriguez, F. y Pedroni, P.M.** (2004). Metabolically engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes. *Marine Biotechnology*, 6(6): 552-65.

**Franklin, MH.** (1986). *The Vial Force, A Study of Bioenergetics*, WH Freeman and Company, Nueva York, 557p.

**Frieden.** (1970). Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 245, No. 21, pp. 5788-5789. U.S.A.

**García, H.** (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 1(2):31-41.

**García-Contreras, R., Celis, H. y Romero, I.** (2004). Importance of *Rhodospirillum rubrum* H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase under Low-Energy Conditions. *Journal of Bacteriology*. 186: 6651-6655.

**Giotta L., Agostiano, A., Italiano, F., Milano, F. y Trotta, M.** (2006). Heavy metal ion influence on the photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *Chemosphere*, 62(9): 1490-9.

**Glaeser, J. y Overmann, J.** (1999). Selective enrichment and characterization of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. Nov., a new purpule nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch Microbiol*, 171: 405-416.

**Hachimori A., Takeda A., Kaibuchi M., Ohkawara N. y Samejima T.** (1975). Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Bacillum stearothermophilus*. *J. Biochem.* 77: 1177-1183.

**Hachimori A., Fujii T., Ohki K. y Izuka E.** (1983). Purification and properties of inorganic pyrophosphatase from porcine brain. *J. Biochem.* 93: 257-264.

**Harris, E. L. V.** (1989). Chapter 3 "Concentration of the extract" in Protein Purification methods. Edit. Harris E. L. V. and Angal S. Ed. IRL PRESS. Oxford. pp. 155.

**Heikinheimo, P., Tuominen, V., Ahonen, A. K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., and Goldman, A.** (2001). Towards a Quantum-mechanical description of Metal Assisted Phosphoryl Transfer in Pyrophosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3121-3126.

**Hiraishi A., Urata K., y Satoh T.** (1995). A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 226-234.

**Hougardy, A., Tindall, B.J. y Klemme, J.H.** (2000). *Rhodopseudomonas henobacensis* sp. Nov., a new nitrate-reducing purpule non-sulfur bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 985-992.

**Huang, J.S., Wu, C.S., Jih, C.G. y Chen, C.T.** (2001). Effect of addition of *Rhodobacter sp.* To activated-sludge reactors treating piggery wastewater. *Water Research*, 35: 3867-3875.

**Imhoff, J. P. y Trüper, H. G.** (1989), Purple nonsulfur bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1635-1709.

**Imhoff J., Petri R. y Sulling J.** (1998). Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the  $\alpha$ -Proteobacteria: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov. *Rhodothalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov., as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum milischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomensis* comb. nov. and *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 793-798.

**Imhoff, J.F. y Caumette, P.** (2004). Recommended standards for the description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1415-1421.

**Imhoff, J., Hiraishi, A.** (2005). Genus I. *Rhodobium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2ed. Vol. II parte C. Edit. Brenner, D., Krieg, N. y Staley, J. Ed. Springer. EUA. pp. 571-574.

**Imhoff, J. F., Trüper, H. G.** (2005). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

**Jetten MSM., Fluit TJ., Strams AJM. Y Zehnder AJB.** (1992). A fluoride-insensitive inorganic pyrophosphatase isolated from *Methanotherix soehngenii*. *Arch. Microbiol.* 157: 284-289.

**Josse, J.** (1966). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 241: 1938-1947.

**Kantachote D., Torpee S. y Umsakul K.** (2005). The potential use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(3): 1-10.

**Karlsson, J.** (1975). Membrane-bound potassium and magnesium ion-simulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochem. Biophys. Acta* 399, 356 – 363.

**Keister, D. L. y Yike, N. J.** (1967<sup>a</sup>). Energy-Linked reactions in photosynthetic bacteria. I. Succinate-linked ATP-driven NAD<sup>+</sup> reduction by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Arch. Biochem. Biophys.* 121:415-422.

**Keister, D. L. y Yike, N. J.** (1967<sup>b</sup>). Energy-linked reactions in photosynthetic bacteria. II. The energy-dependent reduction of oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* 6: 3847-3857.

**Keister, D.L., y Minton, N. J.** (1971). ATP synthesis driven by inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42, 932 – 939.

**Klemme, J. and Gest, H.** (1971). Regulatory Properties of inorganic pyrophosphatase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad.* 68: 721-725.

**Knobloch, K.** (1975). *Z. Naturforsch.* 30c, 771 – 776.

**Kornberg, A.** (1962). On the metabolic significance of phosphorylytic reactions. In *Horizons in Biochemistry*. (Kasha M & Pullman D, Eds), pp. 251-254. Academic Press, New York, NY.

**Kornberg, A.** (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions, en *Avances in Enzimology*. Interscience 18:191-240.

**Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S. y Young, T. W.** (2000). *Methanococcus jannaschii* OR Fmj0608 codes for a class C inorganic pyrophosphatase protected by  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$  ions against fluoride inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 292-298.

**Lahti, R.** (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 47: 169-179.

**Lahti R. y Niemi T.** (1981). Purification and some properties of inorganic pyrophosphatase from *Streptococcus faecalis*. *J. Biochem.* 90: 79-85.

**Lahti, R., Pitkäranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-kalske, E., y Heinonen, J.** (1988). Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 5901- 5907.

**Lawson, J. W. R. y Veech, R. L.** (1979). Effects of pH and free  $\text{Mg}^{2+}$  on the  $\text{K}_{\text{eq}}$  on the creatinine kinase reaction and other phosphate hydrolysis and phosphate transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 254: 6528- 6537.

**Lipmann, F.** (1965). Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis. In *The Origins of Prebiological Systems and of their Molecular Matrices* (Fox, S. W., ed.), pp.212-216, Academic Press, New York.

**López-Marqués, R.L., Pérez-Castiñeira, J.R., Losada, M., Serrano, A.** (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. *J. Bacteriol.* 186: 5418-5426.

**Lowry, O., Rosebrough, N.J; Farr, A.L. y Randal, R. J.** (1951). Protein measurement with the Follin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 254: 6528-6537.

**Lyndal, J.** (1997). Enzymes: classification, kinetics, and control. In *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. Edit. Devlin, T. Ed. Wiley-Liss, pp 127-178.

**Madigan, M.T.** (1998). Microbiology, physiology and ecology of phototrophic bacteria. In A.J.B. Zehner (ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y. pp. 39-111.

**Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** (2002). *Brock Biology of Microorganism*. 10<sup>a</sup> ed. Pearson Education, Inc. NJ, 355-356: 547-612.

**Mansurova SE.** (1989). Inorganic pyrophosphatase in mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta* 977 : 237 - 247.

**McGrath, J.E. y Harfoot, C.G.** (1997). Reductive Dehalogenation of Halocarboxylic Acids by the Phototrophic Genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Apply Environmental Microbiology*, 63: 3333-3335.

**Mehrabi S., Ekanemesang, U.M., Aikhionbare, F.O., Kimbro, K.S. y Bander, J.** (2001). Identification and characterization of *Rhodopseudomonas* spp., a purple non-sulfur bacterium from microbial mats. *Biomolecular Engineering*, 18: 49-56.

**Meis de, L.** (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 287-296.

**Meyer W., Moll R., Kath Th. y Schäfer G.** (1995). Purification cloning and sequencing of archeobacterial pyrophosphatase from the extreme thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 149-156.

**Mildford AD., Jung DO., Achenbach LA. Y Madigan MT.** (2000) *Rhodobaca bogoriensis* gen. Nov. And sp. Nov., an alkaliphilic purple nonsulfur bacterium from African Rift Valley soda lakes. *Arch Microbiol.* 174: 18-27.

**Miller, S L. y Parris, M.** (1964). Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions. *Nature* 204: 1248-1250.

**Mitchell P.** (1967). Proton-translocation phosphorylation in mitochondria, chloroplasts and bacteria: natural fuel cells and solar cells. *Fed Proc.Sep;* 26(5):1370-1379.

**Moyle, J., Mitchell, R., y Mitchell, P.** (1972). Proton-translocating pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 23, 233 - 236.

**Muller R.H., Kleinsteuber S. y Babel W.** (2001). Physiological and genetic characteristics of two bacterial strains utilizing phenoxypropionate and phenoxyacetate herbicides. *Microbiol Res.*, 156(2): 121-131.

**Nore, B. F., P. Nyren, G. F. Salih, and A. Strid.** (1990). Photosynthetic formation of inorganic pyrophosphate in phototrophic bacteria. *Photosynth. Res.* 24:75-80.

**Nyren, P y Strid, A.** (1991). Hypothesis: the physiological role of the membrane bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototropic bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 77:265-270.

**Nyren, P., Nore, B. F., y Strid, A.** (1991). Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. *Biochemistry* 30, 2883-2887.

**Oda, Y., Wanders, W., Huisman, L.A., Meijer, W.G., Gottschal, J.C. y Forney, L.J.** (2002). Genotypic and Phenotypic Diversity within Species of Purple

Nonsulfur Bacteria Isolated from Aquatic Sediments. *Apply Environmental Microbiology*, 68: 3467-3477.

**Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. and Celis, H.** (2000). Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 174: 104-110.

**Pappas C.T., Sram j., Moskvina O.V., Ivanov P.S., Mackenzie C., Choudhary M., Land M.L., Larimer F.W., Kaplan S. y Gomelsky M.** (2004). Construction and Validation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 DNA Microarray: Transcriptome Flexibility at Diverse Growth Modes. *Journal of Bacteriology*, 186(14): 4748-4758.

**Parfenyev AN, Salminen A, Halonen P, Hachimori A, Baykov AA & Lahti R.** (2001). Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, y *Streptococcus mutans*. *J Biol Chem* 276, 24511-24518.

**Pfenning, N.** (1978). Chapter 1: "General Physiology and Ecology of Photosynthetic Bacteria". The Photosynthetic Bacteria. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. Plenum Press. New York and London. pp. 3-18.

**Pfenning, N. y Trüper, H.** (1974). The phototrophic bacteria, in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., edit. R. E. Buchanan and N.E, Gibbons. The Williams & Wilking Co., Baltimore. pp 24-64.

**Pfenning, N.** (1989). Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria. In H.G. Schlegel and B. Bowien (ed.), Autotrophic bacteria. Springer-Verlag, New York, N.Y. pp. 81-96.

**Popp N., Shlomann M. y Mau M.** (2006). Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology*, 152: 3291-3304.

**Rajasekhar, N., Sasikala, C. y Ramana, C.V.** (1998). Photobiotransformation of indole to its value-added derivatives by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20: 177-179.

**Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davis JM, Sanders D.** (1992). Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* 17 : 348 - 352.

**Remsen, C.** (1978). "Chapter 3 Comparative Subcellular Architecture of Photosynthetic Bacteria". *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. Clayton, R., and Sistrom, W. New York and London. Plenum Press, pp 31-40.

**Richter, H. and Schafer, G.** (1992). Purification and enzymic characterization of the cytoplasmic pyrophosphatase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur. J. Biochem.* 209:343-349.

**Romero, I., Celis H.** (1990). El pirofosfato y la pirofosfatasa. Una opción en la bioenergetica. *Ciencia* 41, 297-305.

**Romero, I., García-Contreras, R. and Celis, H.,** (2003). *Rhodospirillum rubrum* has a family I pyrophosphatase: purification, cloning, and sequencing. *Arch. Microbiol.* 173: 377-380.

**Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. J., y Rea, P. A.** (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1775-1779.

**Schwarm H-M., Vogenschow H. y Knobloch K.** (1986). Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 367: 119-126.

**Shiff, J. A.** (1972). A green safelight for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena, in: *Methods in Enzimology*. Ed. San Pietro, A. vol. 24, parte B, Academic Press. New York, London, pp. 321-322.

**Shakhov, Y. A., Nyrén, P., y Baltcheffsky, M.** (1982). Reconstitution of highly purified proton-translocating pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 146, 177-180.

**Shintani T, Uchiumi T, Yonezawa T, Salminen A, Baykov AA, Lahti R & Hachimori A.** (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Lett* 439, 263-266.

**Siu, P. M. L., y Wood, H. G.** (1962) Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase, a CO<sub>2</sub> fixation enzyme from propionic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* 237, 3044-3051.

**Smith, RM, y Martell, AE.** (1981). Critical stability constants. Vol 4 Plenum Press, Nueva York, pp 56-62.

**Stadtman, E. R.** (1970). Mechanism of enzyme regulation in metabolism, in P. D. Boyer (ed.), *The enzymes*, 3<sup>rd</sup> ed., vol. 1. Academic Press, Inc., New York. pp. 397-459

**Sumner, J. B.** (1944). A method of the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.

- Sung-Jong, J. e Ishikawa, K.** (2005). Characterization of the Family I inorganic pyrophosphatase from *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Archaea*. 1; 385-389.
- Tominaga N. y Mori T.** (1977). Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biochem.* 81: 477-483.
- Tono H. y Kornberg A.** (1967). Biochemical studies of bacterial sporulation. III. Inorganic pyrophosphatase of vegetative cells and spores of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 242: 2375-2382.
- Van Alebeek G-JWM., Keltjens JT. y van der Drift C.** (1994). Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain  $\Delta$ H). *Biochem. Biophys. Acta.* 1206: 231-239
- Van Niel, C.B.** (1941). The culture, general physiology, morphology and classification of non-sulfur purple and "Brown" bacteria. *Bacteriology Reviews*, 8: 1-118.
- Verhoeven JA., Schenk KM., Meyer RR. Y Trela JM.** (1986). Purification and characterization of an inorganic pyrophosphatase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 168: 318-321.
- Vrdoljak G., Feil, H., Detter, JC. y Fields, P.** (2005). Characterization of a diesel sludge microbial consortia for bioremediation. *Scanning*. 27(1): 8-14.
- Wang X., Falcone, D.L. y Tabita, F.R.** (1993). Reductive pentose phosphate-independent CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance of the cell. *Journal of Bacteriology*, 175: 3372-3379.
- Watanabe K., Teramoto, M., Futamata, H. y Harayama, S.** (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Apply Environmental Microbiology*, 64(11): 4396-402.

**Weil-Malherbe, H. and Green, H.** (1951). The Catalytic Effect of Molybdate on the Hydrolysis of Organic Phosphate Bonds. *Biochem.* 49: 286-292.

**Wong SCK., Hall DC., Josse J.** (1970). Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. III. Molecular weight and physical properties of the enzyme and its subunits. *J Bacteriol.* 245:4335-4345.

**Wood, HG.** (1977). Some reactions in which inorganic pyrophosphate replaces ATP and serves as a source of energy. *Fed Proc* 36:2197-2205.

**Young, T.W., Kuhn, N. J., Wadeson, A., Ward, S. Burges. D. y Cooke, G.D.** (1998). *Bacillus subtilis* ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase?. *Microbiology.* 144: 2563- 2571.

**Zengler, K.J., Heider, R., Rosello-Mora, y Widdel F.** (1999). Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. *Arch. Microbiol.* 172: 204-212.

**Zurrer H. y Bachofen R.** (1979). Hydrogen Production by the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5): 789-793.

**Zyryanov, A. B., Shestakov, A. S., Lahti, R., and Baykov, A. A.** (2002) *Biochem.J.*, 367, 901-906.

**Zyryanov A. B, Vener AV, Salminen A, Goldman A, Lahti R & Baykov AA.** (2004) Rates of elementary catalytic steps for different metal forms of the family II pyrophosphatase from *Streptococcus gordonii*. *Biochemistry* 43, 1065-1074.