

## Tesis de Posgrado

# Influencia de la irradiancia sobre el crecimiento y el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis*

Alonso Fernández, Raúl

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Alonso Fernández, Raúl. (1988). Influencia de la irradiancia sobre el crecimiento y el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2288\\_AlonsoFernandez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2288_AlonsoFernandez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Alonso Fernández, Raúl. "Influencia de la irradiancia sobre el crecimiento y el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2288\\_AlonsoFernandez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2288_AlonsoFernandez.pdf)

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Influencia de la irradiancia sobre  
el crecimiento y el aparato fotosintético de  
*Rhodospseudomonas viridis***

Autor: Lic. Raúl Alonso FERNANDEZ

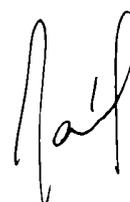
Director: Dr. Augusto Fernando GARCIA

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biológicas,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Mar del Plata.

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas**



- 1 9 8 8 -



## **INDICE GENERAL**

INDICE GENERAL	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iii
I- INTRODUCCION	
Indice	1
IA- Fotosíntesis bacteriana	2
IB- Estructura del aparato fotosintético	7
IC- Crecimiento fotótrofo bacteriano	14
Figuras de I-	19
II- OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS	21
III- MATERIALES Y METODOS	
Indice	22
Materiales y Métodos	23
Figuras de III-	34
IV- RESULTADOS Y DISCUSION	
Indice	39
IV A- Crecimiento en cultivos estáticos	40
Tabla IV-1 y Figuras de IV A-	49
IV B- Contenido y organización de membranas internas	58
Tabla IV-2 y Figuras de IV B-	63
IV C- Membranas internas aisladas	70
Tablas IV-3 y IV-4 y Figuras de IV C-	76
V- RESUMEN Y CONCLUSIONES	84
VI- BIBLIOGRAFIA	87

## **AGRADECIMIENTOS:**

por el aporte económico, al CONICET y a la UNMdP.

por haber realizado allí la parte experimental de esta tesis, al Instituto de Investigaciones Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNMdP.

por la dirección de esta tesis, al Dr. Augusto ("Chicho") García.

por la asistencia técnica para microscopía electrónica, a Necker Begliante.

por permitirme usar el espectrorradiómetro y el asesoramiento en cuanto a mediciones/unidades lumínicas, al Dr. Sánchez y col.

porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible, a la Dra. M. E. Ranalli.

por la continua buena disposición (a veces exagerada y sin plazos) a leer/discutir/profundizar varias partes de esta tesis, al Dr. Gustavo ("Gus") Daleo.

por un montón de cosas, seguramente distintas para cada uno, a todos mis compañeros del IIB.

por su ejemplo, a las Madres.

por el transporte de negativos, entre otras cosas, a Juan.

por el sacrificio en pos del conocimiento, a todas las bacterias inmoladas.

por fin, por todo, porque sí, por supuesto (y por las dudas...) a la Pata.

**ABREVIATURAS:**

ADP:	adenosina-5' difosfato
ATP:	adenosina-5' trifosfato
ATPasa:	adenosintrifosfatasa
Bchl:	bacterioclorofila
BSA:	albúmina de suero bovina
CCCP:	cianuro de clorocarbonilfenilhidrazona
cpm:	cuentas por minuto
CR:	centro de reacción
D:	velocidad de dilución específica
DO:	densidad óptica (= absorbancia)
FCCP:	cianuro de fluorocarbonilfenilhidrazona
g:	unidad de aceleración centrífuga, equivalente a la gravitatoria (9.8 m/seg <sup>2</sup> )
J.m <sup>-2</sup> .seg <sup>-1</sup> :	unidad de flujo de energía radiante (irradiancia) Joules/metro cuadrado x segundo
LHC:	complejo cosechador de luz ('light harvesting complex' o 'antena')
Lip:	fotofosforilación ('light induced phosphorylation')
ME:	microscopía electrónica
μ:	velocidad específica de duplicación; en caso de tratarse de la biomasa, velocidad específica de crecimiento
Pi:	fosfato inorgánico
PMS:	metosulfato de fenacina
psi:	unidad de presión, libras/pulgada cuadrada
p/v:	peso/volumen
SMI:	sistema de membranas internas
STE:	sistema transductor de energía
TCA:	ácido tricloroacético
t <sub>d</sub> :	tiempo de duplicación
TMPD:	N, N, N', N', -Tetrametil-1,4-fenilendiamina
Tris:	tris (hidroximetil) aminometano
Tricina:	N- tris (hidroximetil) metilglicina
UDO:	unidades de densidad óptica
UF:	unidad fotosintética
v/v:	volumen/volumen
W:	unidad de potencia, 1 Watt = 1 Joule/seg

# **I- INTRODUCCION**

## **INDICE**

### **I.A- Fotosíntesis bacteriana**

<b>A 1-</b>	<b>Fotosíntesis y metabolismo</b>	<b>2</b>
<b>A 2-</b>	<b>Sistemas transductores de energía (STE) lumínica</b>	<b>3</b>
<b>A 3-</b>	<b>Captación de la energía lumínica</b>	<b>4</b>
<b>A 4-</b>	<b>Transporte de electrones fotosintético en bacterias</b>	<b>5</b>
<b>A 5-</b>	<b>Mecanismo de acoplamiento</b>	<b>5</b>

### **I.B- Aparato fotosintético en bacterias**

<b>B 1-</b>	<b>Aparato fotosintético en cloroplastos</b>	<b>7</b>
<b>B 2-</b>	<b>Aparato fotosintético en bacterias</b>	<b>8</b>
<b>B 3-</b>	<b>Obtención y composición química de cromatóforos</b>	<b>9</b>
<b>B 4-</b>	<b>Morfogénesis del sistema de membranas internas (SMI)</b>	<b>11</b>
<b>B 5-</b>	<b>Regulación del contenido de bacterioclorofila (Bchl)</b>	<b>12</b>

### **I.C- Crecimiento fotótrofo bacteriano**

<b>C 1-</b>	<b>Eficiencia del crecimiento</b>	<b>14</b>
<b>C 2-</b>	<b>Irradiancia como sustrato</b>	<b>15</b>
<b>C 3-</b>	<b>Cultivos continuos fotótrofos</b>	<b>16</b>
<b>C 4-</b>	<b>Cultivos continuos regulados por la autosombra</b>	<b>17</b>

<b>Figuras (I-1 y I-2)</b>	<b>19</b>
----------------------------	-----------

## I A-FOTOSINTESIS BACTERIANA

### A1- Fotosíntesis y metabolismo:

La energía solar es la fuente de prácticamente toda la energía contenida en los seres vivos.

Ecológicamente, los organismos encargados de captar esta energía, transformarla y utilizarla para el aumento y mantenimiento de su biomasa se denominan productores.

El proceso mediante el cual se realiza tanto la transducción de la energía lumínica en utilizable bioquímicamente como la posterior síntesis de componentes celulares recibe el nombre de fotosíntesis.

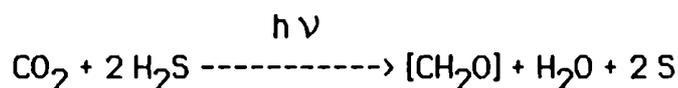
En cuanto a su metabolismo, los organismos capaces de realizar esta transducción se denominan fotótrofos. Los compuestos primarios de este proceso son ATP y piridín nucleótidos reducidos. Por lo tanto, la fotofosforilación y la reducción fotosintética constituyen procesos elementales de la fotosíntesis.

El proceso fotosintético bacteriano se diferencia básicamente del de las plantas superiores en:

a- no se produce liberación de O<sub>2</sub>.

b- son utilizados el ácido sulfhídrico o compuestos orgánicos reducidos como dadores de electrones, ya que es incapaz de utilizar el agua.

Los estudios cuantitativos realizados con sulfobacterias por Van Niel en 1931 permitieron establecer la siguiente ecuación de asimilación:



Es decir, el ácido sulfhídrico realiza en la fotosíntesis asimilatoria de las sulfobacterias el papel del agua en las plantas verdes.

Sin embargo, es importante diferenciar el proceso de fijación de CO<sub>2</sub> del de obtención de energía. Según la definición de metabolismo fotótrofo precedente, la capacidad de transducir energía lumínica por parte de un organismo no implica la fijación de CO<sub>2</sub> ambiental.

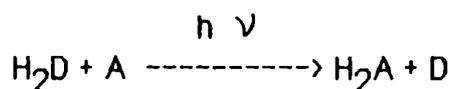
Por otro lado, en cuanto al origen de los átomos de carbono constituyentes de su biomasa los organismos pueden caracterizarse como autótrofos o heterótrofos. Los autótrofos utilizan como fuente de carbono para sus componentes el CO<sub>2</sub> ambiental. Sin embargo, la energía necesaria para esta fijación puede provenir tanto de la luz como de la oxidación de compuestos químicos; según el caso, los organismos serán fotoautótrofos o quimoautótrofos respectivamente.

Si bien en los fotoautótrofos el  $\text{CO}_2$  es el principal aceptor electrónico final de la fotosíntesis, no es el único compuesto posible.

Las plantas verdes, por ejemplo, pueden utilizar también el nitrato como aceptor de los electrones provenientes de la captación de energía lumínica. En los organismos fotótrofos fijadores de nitrógeno, éste es utilizado como aceptor de electrones, reduciéndose a amonio. Por otro lado, muchos organismos fotótrofos pueden utilizar iones hidrógeno como aceptores electrónicos, a partir de los cuales forman hidrógeno molecular (1).

Por lo tanto, la fotosíntesis puede implicar diferentes dadores y/o aceptores electrónicos, según las especies y condiciones de crecimiento.

Se puede escribir la siguiente ecuación general para este proceso:



en la que  $\text{H}_2\text{D}$  es el dador de electrones (o de hidrógeno) y A, el aceptor.

Esta transferencia de electrones inducida por la luz ocurre en contra del gradiente normal de potenciales de reducción estándar del sistema dador/aceptor, independientemente de cual sea éste. Es decir que, en presencia de luz, el flujo neto de electrones se dirige al componente del sistema con potencial estándar más electronegativo, a la inversa que en el flujo de electrones respiratorio.

## A2- Sistemas transductores de energía (STE) lumínica:

La transducción de energía lumínica en química implica los procesos de captación de luz, transporte de electrones y fosforilación acoplada. Estos dos últimos procesos se encuentran también en la transducción de energía respiratoria, presentando importantes semejanzas.

Ambos procesos transductores de energía (fotosíntesis y respiración) tienen lugar sobre estructuras membranosas de características semejantes en cuanto a su estructura y organización molecular.

La transducción de energía lumínica se inicia con la captación de ésta por parte de las clorofilas y los pigmentos accesorios. Tanto unas como otros se encuentran asociados con proteínas de membrana.

Muchos estudios muestran que la luz absorbida por las moléculas de clorofila produce una redistribución de sus electrones, en lo que se conoce como estado electrónico excitado. Ante un aceptor adecuado, se genera una separación neta de cargas que constituye el punto de partida de la secuencia de reacciones de óxido/reducción a nivel de la cadena de transporte de electrones fotosintético.

Por otro lado, sobre la misma membrana que los complejos captadores de luz y los transportadores de electrones, se encuentra la ATPasa.

Este complejo proteico es el encargado de catalizar la unión ester  $\gamma$  del ATP a partir de ADP y Pi. Esta reacción, dependiente de energía obviamente, se lleva a cabo a expensas de la previamente transducida por los procesos anteriores (2).

### A3- Captación de la energía lumínica:

Si se irradia una solución de pigmentos, las moléculas que la componen absorben la luz; produciéndose la correspondiente energización de las mismas. A partir de este estado excitado existen varias posibilidades a través de las cuales se producirá el retorno al estado inicial:

a-puede producirse la emisión de un cuanto de luz de mayor longitud de onda (fluorescencia).

b-puede producirse desexcitación no acompañada por emisión.

c-puede transformarse el estado singulete excitado en el correspondiente estado triplete.

Solamente este último proceso permite la estabilización de un estado excitado el tiempo suficiente como para que tenga importancia en relación con el proceso de transferencia de energía.

En las bacterias fotótrofas, la unidad fotosintética (UF), que agrupa a las moléculas de Bchl 'antena' y aquellas correspondientes al centro de reacción (CR), forman una malla bidimensional cuyo arreglo espacial no es bien conocido (93,94).

La luz emitida por las moléculas de Bchl 'antena' excitadas está regulada por el estado redox del CR, cuyas variaciones pueden ser estudiadas a través de la cinética de la fluorescencia emitida por la Bchl 'antena' o a través de cambios en las bandas de absorción de la Bchl. De esta manera es posible estudiar la transferencia de energía desde las moléculas de Bchl 'antena' hasta el CR (95-99).

La transferencia de energía entre las moléculas de Bchl pertenecientes a una misma UF sería del tipo coherente, mientras que la transferencia entre unidades distintas sería de otro tipo (100). Este modelo se apoya, entre otras cosas, en que los anillos porfirínicos de las Bchl en estos complejos están apareados paralelamente (94).

Es posible, también, la transferencia de energía entre moléculas no idénticas; pero en este caso deben superponerse los espectros de emisión y absorción de las moléculas dadoras y receptoras respectivamente (101).

La medición del rendimiento de fluorescencia puede proveer información sobre la organización del aparato fotosintético. Si las antenas se encuentran aisladas y/o separadas físicamente entre sí, la función que describirá la emisión de fluorescencia en el tiempo, será de tipo exponencial. Por el contrario, será sigmoideal si las antenas tienen libre comunicación energética entre ellas (102,103).

Monger y Parson (101) han demostrado que en sistemas fotosintéticos totalmente desarrollados los complejos 'antena' están todos relacionados energéticamente. Sin embargo, en células crecidas aeróbicamente en oscuridad en las que se induce la formación del AF (en anaerobiosis y luz), las UF no se encuentran energéticamente acopladas (104).

El tamaño de la UF está definido como la relación entre los moles de Bchl total y los de Bchl del CR (50).

En *Rhodospirillum rubrum*, este valor es de 20 a 30 y es independiente de las condiciones de cultivo. De la misma forma, en *Rhodopseudomonas viridis* el tamaño de la UF no se afecta por las condiciones de cultivo, en especial por la intensidad de luz utilizada durante el crecimiento (85,87).

En *Rps. sphaeroides* y *Rps. capsulata*, el tamaño de la UF varía entre 50 y 90 debido a la existencia del complejo 'antena' B800-850 que varía con respecto al contenido de otro complejo 'antena' (B870) y del CR, a pesar de que ambos permanecen constantes entre sí (50,104-107).

#### **A4- Transporte de electrones fotosintético en bacterias:**

Una vez que la energía captada es transferida al CR, un dímero de Bchl pierde un electrón (96,108), el que es donado finalmente a las QI y QII, ubiquinonas fuertemente unidas al CR (109-113). QII es relativamente estable como semiquinona y forma ubiquinol por reducción total. De esta forma, simultáneamente, 2 H<sup>+</sup> son tomados de la fase acuosa vecina.

Luego de varios eventos de separación de cargas, 3-4 de las ± 25 ubiquinonas del 'pool' se transforman en su forma quinol, y reducen al complejo bcl oxidoreductasa (114).

El transporte de electrones dentro del complejo bcl se realiza a través de dos citocromos b, una Fe-S proteína y un citocromo c1. Este complejo se encuentra firmemente unido a la membrana y es el responsable de la transferencia de dos H<sup>+</sup> durante el transporte de electrones cíclico (115-117).

Por último, los electrones regresan al CR a través del citocromo c2. Este citocromo, presente en el espacio periplásmico, es móvil y es el encargado de transportar electrones entre el citocromo c1 y el CR (109,110)

#### **A5- Mecanismo de acoplamiento:**

Los sistemas de transporte de electrones asociados a la membrana interna de las mitocondrias, las membranas tilacoides de los cloroplastos y las membranas celulares de los procariotes están funcionalmente ligadas al sistema de síntesis de ATP por medio de un mecanismo que es fundamentalmente similar en todos los seres vivos. En este mecanismo interviene un intermediario energético que puede ser usado también por otros procesos que consumen energía, como por ejemplo el transporte de iones a través de las membranas (3,4).

El vínculo entre los procesos de transporte de electrones y fosforilación sería, según se acepta en general, un gradiente electroquímico de protones a ambos lados de la membrana en que ambos se asientan (5-8).

Este gradiente sería producido, precisamente, por el transporte de electrones por medio de la traslocación de  $H^+$  en los puntos de acoplamiento, en los cuales se intercambian protones además de electrones.

Peter Mitchell propuso un mecanismo de acoplamiento para la transferencia de energía entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP (9). Postuló que el flujo de electrones a través de las moléculas transportadoras conduce protones de un lado al otro de las membranas transductoras. A consecuencia de ello se crea un gradiente electroquímico a ambos lados de ésta. Este gradiente consta de dos componentes:

- i- de masa, en cuanto a la concentración de protones ( $\Delta pH$ )
- ii- de potencial, en cuanto a la carga eléctrica ( $\Delta\psi$ )

La síntesis de ATP se llevaría a cabo por un flujo de protones a favor del gradiente. La hipótesis de Mitchell se denominó teoría quimiosmótica.

En esta teoría, la membrana desempeñaría un papel fundamental, ya que separa y define el medio interno y externo, además de proporcionar ubicación física definida para los distintos compuestos involucrados. La disposición asimétrica de éstos permitiría tanto el establecimiento del gradiente como su aprovechamiento.

La membrana, además, debe formar una estructura topológicamente cerrada para mantener el gradiente de  $H^+$ . Así, según esta teoría, la distinción más importante se presenta entre el interior y el exterior de la membrana.

Se han postulado otras teorías para el mecanismo de acoplamiento. Williams plantea que los protones traslocados por el transporte de electrones no son osmóticamente activos sino que son retenidos en porciones localizadas de la membrana (10-12)

Boyer, por su parte, sugiere que el vínculo energético entre la síntesis de ATP y el transporte de electrones consistiría en un estado conformacional energizado que sería transmitido directamente desde las proteínas del transporte de electrones (a nivel de los sitios de acoplamiento) hasta el propio factor de acoplamiento. En última instancia se produciría una secuencia de cambios conformacionales durante el ciclo catalítico del factor de acoplamiento que proporcionarían la energía necesaria para la reacción de síntesis (7,13,14).

## **I B- ESTRUCTURA DEL APARATO FOTOSINTETICO**

### **B1- Aparato fotosintético en cloroplastos:**

En eucariotes, el STE lumínica se encuentra en el interior de los cloroplastos, formando parte de las membranas tilacoides. Dependiendo de las condiciones ambientales, los tilacoides pueden estar apilados formando estructuras conocidas como grana.

Por micrografía electrónica es posible observar que en los grana las membranas se encuentran muy próximas entre sí. Se puede diferenciar, entonces, dos fracciones de la membrana tilacoide: las que se encuentran en íntimo contacto por el fenómeno de apilamiento ('membrana no expuesta') y las que se encuentran en contacto directo con la matriz del cloroplasto ('membrana expuesta') (15).

Se ha demostrado que los pigmentos se encuentran asociados a proteínas de membrana. Estas asociaciones macromoleculares pueden ser aisladas mediante la disolución cuidadosa de la membrana, llevada a cabo por ciertos detergentes (20).

Existen dos tipos de complejos macromoleculares formados por clorofila y proteína: los complejos 'antena' ('light harvesting complexes' o LHC) y los centros de reacción (CR). En estos últimos tiene lugar la separación neta de cargas, es decir son los responsables de la fotorreducción de los aceptores primarios. Dependiendo de la longitud de onda a la que absorben las moléculas de clorofila asociadas en los CR's se han caracterizado dos tipos de fotosistemas: I y II.

Se ha demostrado que ambos fotosistemas poseen complejos 'antena' asociados y que se encuentran en porciones definidas de la membrana tilacoide. La función de estos complejos es aumentar el espectro de captación de luz, pero son incapaces de producir una separación neta de cargas, por lo tanto, deben transferir la excitación producida por la luz a la clorofila componente de los CR's (15).

La técnica de criofractura ha permitido visualizar las superficies de estas membranas, en ellas se visualizan una gran variedad de partículas de diferentes tamaños y formas. Una observación de importancia es que la distribución de estas partículas en las grana es distinta en la 'membrana expuesta' que en la 'no expuesta' (16).

Se ha demostrado la correspondencia de estas partículas con los componentes del STE; por lo tanto la disposición de éstos en la membrana tilacoidea no es uniforme (17). En efecto, al estudiar la influencia del apilamiento sobre la densidad de las partículas correspondientes al factor de acoplamiento (ATPasa) se observó que éstas parecen no encontrarse en las 'membranas no expuestas' y sólo se hallarían en las 'expuestas'.

Esta observación concuerda con los supuestos de la teoría quimiosmótica de Mitchell, pues demuestra que el sistema de síntesis de ATP no tiene que estar, necesariamente, en contacto físico con la cadena de transporte de electrones (16).

En cloroplastos, la 'membrana expuesta' es rica en enzimas tales como la NADP<sup>+</sup> reductasa y la ATPasa, mientras que las porciones apiladas son ricas en pigmentos y deficientes en enzimas (17). La figura 1-1 muestra las distribuciones de estos pigmentos y enzimas en la estructura lamelar.

La cantidad y grado de apilamiento de los grana varía en diferentes plantas según las condiciones de crecimiento (18). Anderson y col., entre otros, han observado una alta formación de grana en cloroplastos de plantas crecidas a la sombra. En estas plantas el factor limitante de la fotosíntesis es la luz. Por lo tanto, deben utilizar la menor cantidad de luz disponible con mayor eficiencia. Esto es posible mediante un incremento en la concentración de pigmentos (especialmente el complejo 'antena'); en estas condiciones no es necesario un aumento en la cantidad de enzimas (NADP<sup>+</sup> reductasa y ATPasa), ya que la velocidad de transporte de electrones es baja (19).

Esta regulación en la proporción relativa de los complejos puede lograrse variando el nivel de apilamiento de las membranas tilacoides. De esta manera, una planta creciendo a baja intensidad de luz poseería un alto grado de apilamiento en sus grana y un mayor contenido de clorofila relativo a NADP<sup>+</sup> reductasa y ATPasa. Es por ello que se ha postulado al grado de apilamiento de los grana como factor de adaptación del aparato fotosintético a distintas condiciones de iluminación.

## **B2- Aparato fotosintético en bacterias:**

Cuando las bacterias fotosintéticas crecen anaeróbicamente a la luz, la membrana celular se invagina, originando un sistema de membranas internas (SMI) (21,22). En algunas bacterias las invaginaciones se estrangulan y forman vesículas independientes, mientras que en otras permanecen conectadas a la membrana celular (23).

Estas membranas internas reciben el nombre de 'cromatóforos' y presentan, *in vivo*, formas muy variadas, pero definidas según las especies. Pueden encontrarse en forma de vesículas, lamelas paralelas, con o sin ramificaciones, o en forma de grana.

La figura 1-2 muestra en forma esquemática los diferentes tipos estructurales de membranas internas encontradas en bacterias fotosintéticas.

Según el sistema de membranas internas, esta familia puede dividirse en cinco grupos:

- i- con invaginaciones simples, pequeñas e irregulares.
- ii- con sistema vesicular.
- iii- con sistema tubular.
- iv- con sistema de cortas bandas con bajo grado de apilamiento.
- v- con sistema de lamelas apareadas, ordenadas periféricamente en capas paralelas a la membrana celular.

A este último grupo corresponden las bacterias que se reproducen por gemación. Ellas son: el género *Rhodomicrobium* y tres especies de *Rhodospseudomonas*: *Rps. acidophila*, *Rps. palustris* y *Rps. viridis*. El SMI de estas bacterias se corresponde con el representado esquemáticamente en el recuadro 8 de la figura 1-2.

Las micrografías electrónicas de secciones ultrafinas de las Rhodospirillaceae, han demostrado que tanto la membrana celular como las invaginaciones presentan la típica estructura de unidad de membrana con un grosor de entre 70 y 80 Å (22).

En *Rps. viridis* se observó, mediante diferentes técnicas de microscopía electrónica, que sobre estas lamelas se asientan estructuras hexagonales dispuestas en forma altamente regular. Cada una de estas estructuras posee un diámetro de 110 Å y un espesor de 50 Å (24,25). Esta disposición regular tan particular en los componentes de la membrana fotosintética no ha sido observada en otras especies.

### B3- Obtención y composición química de cromatóforos:

Con respecto a la composición química de los cromatóforos, existe una gran variación cuantitativa dependiendo esencialmente de:

- i- las condiciones de cultivo.
- ii- la especie bacteriana.
- ii- el procedimiento de obtención.

En todas las preparaciones se ha verificado la existencia de pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones y factor de acoplamiento (ATPasa) (22).

De igual manera que en los tilacoides, los pigmentos se encuentran asociados a proteínas específicas, formando los complejos 'antena' y CR.

Las variaciones observadas en el contenido de los pigmentos son atribuidas a las distintas condiciones de iluminación y/o oxigenación, al efecto de auto-ensombrecimiento de las bacterias y al estadio del cultivo en el que se cosecharon las células (26).

Ha sido demostrada, también, la presencia de transportadores de electrones. La variación en la cantidad y naturaleza de éstos se debe principalmente, a los métodos de obtención, ya que originan la remoción de cofactores y otros componentes periféricos de las membranas (22).

Por lo tanto el contenido de transportadores de electrones en los cromatóforos no refleja necesariamente el contenido de éstos *in vivo*. Han sido encontrados niveles importantes de citocromos hemo-asociados, hierro no hemínico y ubiquinona (27).

La presencia significativa de estos componentes, junto con la de ATPasa (28) indica que los cromatóforos representan la fracción del SMI donde tiene lugar la captación lumínica, las reacciones asociadas de transporte de electrones y la fotofosforilación.

Es importante destacar que han sido encontrados niveles muy bajos de ácidos nucleicos en estas preparaciones, lo que indica que se encuentran particularmente libres de contaminación por DNA y ribosomas (27).

La forma más usual de obtención es la centrifugación en gradientes de densidad, luego de la ruptura celular (22). Estos gradientes pueden ser realizados con sacarosa, cloruro de cesio o ficol. Estos últimos son más ventajosos debido a su alta estabilidad y a que es evitada cualquier modificación osmótica en los cromatóforos (29). Sin embargo son mucho más utilizados los de sacarosa, debido a su asequibilidad. La centrifugación en gradientes de densidad permite salvar muchos de los problemas inherentes a la separación de partículas subcelulares por centrifugación diferencial (límite móvil). Las ventajas son:

i- la existencia en el tubo, previa a la corrida, de zonas sin muestra; por lo tanto, al colectar la fracción de interés, la probabilidad de contaminación es menor.

ii- el rozamiento va aumentado gradualmente a medida que las partículas sedimentan.

iii- son evitadas las corrientes convectivas dentro del tubo.

iv- se protege la separación de las fracciones al minimizar las turbulencias durante la creación y disipación del campo gravitatorio.

En la práctica, éste es el método más aplicado y permite la formación de bandas pigmentadas estrechas, separadas satisfactoriamente de ribosomas y pared celular (30).

Por medio de centrifugación en equilibrio de densidad es posible obtener distintas fracciones de cromatóforos (31). La separación se realiza exclusivamente por diferencias en la densidad; las partículas migran hasta su isodensidad dentro del gradiente, en la cual su masa efectiva se anula. El aumento del tiempo de corrida no mejora la separación de las fracciones.

Mediante esta técnica se han obtenido densidades de los cromatóforos en el rango de 1.14 a 1.17 g.cm<sup>-3</sup>, concordante con lo que se podría predecir por su composición química. En ciertos casos se han obtenido fracciones conteniendo pared celular, con un rango de densidad de 1.22/1.25 g.cm<sup>-3</sup>, lo que confirma su composición, ya que la pared celular presenta una densidad sensiblemente mayor: 1.39 g.cm<sup>-3</sup> (32). Por otro lado, preparaciones conteniendo membrana celular presentan densidades levemente menores: 1.12/1.15 g.cm<sup>-3</sup> (27).

Una característica de estas fracciones membranosas es su tendencia a la agregación: Takacs y Holt informaron del marcado aumento del coeficiente de sedimentación estandarizado ( $S_{20,w}$ ) con la concentración (33); por otro lado, Pucheu y col. demostraron la existencia de una fracción de membrana fotosintética sensible a la agregación por magnesio (20,35).

#### B4- Morfogénesis del sistema de membranas internas (SMI):

El grado de desarrollo del SMI y su composición varían de acuerdo a las condiciones de crecimiento. Es por ello que son sistemas adecuados para el estudio de la morfogénesis y la diferenciación celular en procariotes.

Normalmente, la formación de membranas fotosintéticamente activas ocurre bajo condiciones anaeróbicas y de luz. En aerobiosis las bacterias presentan una gran disminución en el desarrollo del SMI y en el contenido de Bchl (36).

Cohen-Bazire y col. por examinación al ME de secciones de *Rps. spheroides* y *Rhodospirillum rubrum* crecidas a distintas condiciones de oxigenación e iluminación, observaron que, en aerobiosis no se presentaba SIM; mientras que en anaerobiosis, el desarrollo del mismo dependía de la intensidad de luz, llegando a ser prácticamente inexistente a alta intensidad (37-39).

El mecanismo por el cual se regula la formación de membranas no está claro; se ha definido, en principio, las condiciones en las cuales se torna efectiva esta formación:

- i- transferencia de condiciones de aerobiosis-oscuridad a anaerobiosis-luz.
- ii- disminución de la presión parcial de oxígeno a partir de un punto crítico, en oscuridad.
- iii- disminución de la intensidad de luz efectiva en cultivos anaeróbicos.

En estas condiciones se lleva a cabo, también, la inducción de la síntesis de Bchl. La reversión de estas condiciones lleva normalmente a la disminución del SMI y la inhibición inmediata de la síntesis de Bchl.

Se han definido, también, los probables factores de regulación del desarrollo del SMI (22):

- i- balance redox de los componentes del sistema de transporte de electrones, incluyendo la presencia y estado de los piridín nucleótidos.
- ii- presencia de ATP, tanto *per se* como relacionado con otros componentes de alta energía o ATP-dependientes, expresándose, por ejemplo, como la carga energética celular.
- iii- acción directa del oxígeno.

En cuanto al origen de las membranas internas, gran parte de los estudios de microscopía electrónica indican que éstas parecen estar relacionadas con la membrana celular. Aunque existen también evidencias para indicar lo contrario.

Tampoco hay concordancia acerca del lugar de ensamblaje del aparato fotosintético a la membrana, ya que, aunque las membranas se originen como invaginaciones, los componentes del STE podrían ensamblarse a ésta en lugares específicos separados físicamente de la membrana celular (40,41).

Se ha demostrado que los complejos funcionales del sistema respiratorio y los del AF son ensamblados en sitios específicos y con distintas cinéticas para cada uno de sus componentes (42,43).

Muchos de los fosfolípidos, subunidades proteicas y actividades enzimáticas de la membrana celular se encuentran también presentes en las membranas internas. Sin embargo, existe una marcada diferencia en las relaciones que estos componentes presentan en uno y otro tipo de membrana (22).

Con respecto al orden en que los componentes del STE se incorporan a la membrana, en *Rps. capsulata* fue observado un significativo incremento en la fotofosforilación relativo al contenido de Bchl durante los primeros minutos de la inducción. Sin embargo, esta actividad, por mol de Bchl, decae prontamente. Esta observación sugiere que la Bchl perteneciente al CR es la primera en ensamblarse en la membrana, mientras que los restantes complejos Bchl-proteína se incluyen con posterioridad (22).

En el cambio a condiciones aeróbicas, el AF deja de ser sintetizado abruptamente, mientras que las restantes unidades funcionales de la membrana (por ej. el sistema respiratorio) continúan siendo formadas. De esta manera se diluye gradualmente el AF en la membrana.

En este tipo de cambio de condiciones, la velocidad de síntesis de los componentes de la pared celular es mayor que la de los componentes de membrana, contrariamente a lo que ocurre cuando es inducida la formación de las membranas internas. Esto resulta en la desaparición del SMI.

#### **B5- Regulación del contenido de bacterioclorofila (Bchl):**

Han sido encontradas fuertes correlaciones entre la formación del SMI y la síntesis de Bchl (22):

i- inhibidores de la síntesis de proteínas bloquean también la de Bchl, aún cuando las enzimas de su síntesis estén presentes en forma activa. Se ha propuesto que esto refleja una asociación específica entre la síntesis de Bchl y la formación de proteínas encargadas de ensamblar este pigmento dentro de la membrana (45). Takemoto y Lascelles demostraron que en *Rps. spheroides* la síntesis de Bchl está fuertemente acoplada a la de por lo menos cuatro proteínas específicas de cromatóforos, entre ellas una asociada al complejo 'antena' y otra asociada al CR (46,47).

ii- precursores radiactivos de la síntesis de proteínas son incorporados a las membranas internas en cantidades relacionadas directamente con la velocidad de síntesis de Bchl. Lo mismo ocurre con precursores radioactivos de lípidos de membrana.

iii- no sólo la inhibición de la síntesis de Bchl y el bloqueo de la formación del SMI por parte del oxígeno ocurren conjuntamente, sino que también están acopladas la desaparición de membranas internas y la disminución del contenido de Bchl.

iv- en mutantes donde la síntesis de Bchl está total o parcialmente bloqueada, la formación del SMI también lo está.

La respuesta inmediata en la síntesis de Bchl al cambio de condiciones sugiere que esta regulación no se realizaría exclusivamente a nivel transcripcional.

Una explicación posible involucra a uno de los sustratos de la síntesis de tetrapirroles, el succinato. En presencia de oxígeno, todo el succinato podría ser oxidado vía ciclo de Krebs, privando a la síntesis de Bchl de sustrato. Otra explicación se basa en el hecho de que la aminolevulato sintetasa tiene un tiempo de vida media muy corto; por lo tanto la inhibición de su síntesis podría resultar en una muy rápida disminución de la actividad, cuando tiene lugar la represión de la formación del SMI.

En condiciones fototróficas se ha observado que la velocidad específica de crecimiento está relacionada directamente a la intensidad de luz efectiva e inversamente al contenido celular de Bchl.

Sin embargo, Ketchum y Holt (48) observaron que el contenido específico de Bchl en cromatóforos de *R. rubrum* se mantiene esencialmente constante en cultivos que crecen con tiempos de duplicación desde 5<sup>30</sup> hasta 26 horas.

Estas distintas velocidades de crecimiento fueron obtenidas con distintos niveles de intensidad de luz. Por lo tanto, en esta bacteria, la iluminación modifica la cantidad total de cromatóforos por célula pero no la relación Bchl/proteína en ellos. Esto concuerda con las observaciones realizadas al ME en esta bacteria (37-39).

Por otro lado, en *Rps. sphaeroides* si bien también se observó una relación inversa entre el contenido celular de Bchl y la cantidad de membranas internas por un lado, y la intensidad de luz por el otro; el contenido específico de Bchl de los cromatóforos disminuye con la iluminación. Por lo tanto en esta bacteria, una mayor cantidad de membranas con mayor contenido específico de pigmento es encontrada en células enriquecidas en Bchl y crecidas a baja intensidad de luz.

Se ha postulado que esta diferencia en las respuestas se debe a la manera en que ambos microorganismos regulan su nivel de Bchl 'antena'. Como se dijo previamente (A3-), mientras en *R. rubrum* y *Rps. viridis* la relación entre este complejo y el CR se mantiene constante, en *Rps. sphaeroides* el contenido de Bchl 'antena' relativo al de CR es variable. Por lo tanto, el aumento del contenido específico de Bchl observado en esta bacteria a bajas intensidades de luz respondería a un aumento en la relación 'antena'/CR (50).

## I C- CRECIMIENTO FOTOTROFO BACTERIANO

### C1- Eficiencia del crecimiento:

En los organismos heterótrofos, la relación entre el peso seco y la masa de sustrato (fuente de energía) consumida, conocida como  $Y_S$ , sirve como base para los cálculos del requerimiento energético del crecimiento (51-57).

Los organismos fotótrofos dependen de la luz, como energía radiante, ya que ella es su fuente primaria de energía. En el crecimiento fototrófico, la producción de biomasa está relacionada a los cuanta absorbidos; por lo tanto su rendimiento cuántico se corresponde con el  $Y_S$ .

A partir de la introducción de la teoría cuántica, fue posible realizar una correlación cuantitativa entre la luz y la transducción de energía lumínica.

Los primeros en aplicar el concepto cuántico a este proceso fueron Warburg y Negelein (1922): intentaron medir el rendimiento de la transducción fotosintética en algas verdes unicelulares en reposo, es decir, su eficiencia cuántica.

Estos trabajos se basaron en el supuesto que el proceso de transducción fotosintético puede ser tratado como una simple reacción fotoquímica entre el número de cuanta absorbidos y la cantidad de producto formado ( $O_2$ , por ejemplo) o sustrato consumido ( $CO_2$ ) (58).

La intención de medir rendimientos cuánticos para reacciones fotoquímicas elementales llevó a estudios en los cuales fueron usados fracciones celulares en vez de células enteras. Fue así como se estudiaron, en preparaciones de cloroplastos aislados, las reducciones inducidas por luz de  $NADP^+$  (59) y de oxalacetato (60).

Los sistemas transductores usados en estos estudios involucran mecanismos mucho más complejos que la simple reacción fotoquímica; por lo tanto, los factores a considerar para calcular su rendimiento cuántico pueden ser distintos.

El cálculo de la eficiencia cuántica de la reacción fotoquímica primaria fue posible finalmente, estudiando la fotooxidación de la clorofila del CR utilizando preparaciones aisladas del mismo (61,62).

Otra manera de encarar el problema del rendimiento cuántico del crecimiento es ampliar las mediciones a la totalidad del cultivo. Así, el número de cuanta absorbidos se relacionará con la biomasa formada.

El proceso de transducción de energía, encarado así su análisis, puede originar resultados biológicamente significativos, ya que puede estudiarse la variación de la eficiencia de la totalidad del proceso entre distintos organismos o en diferentes condiciones.

El requerimiento cuántico se encuentra, en general, en función de los sustratos usados, especialmente la fuente de carbono. La correlación de los cuanta requeridos y los sustratos utilizados permite, por ej., calcular el requerimiento energético de la fijación de  $N_2$  (58).

### C2- Irradiancia como sustrato:

De igual manera que para los sustratos energéticos en el crecimiento heterótrofo, el requerimiento cuántico sólo puede ser determinado cuando la irradiancia es el limitante del crecimiento.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las bacterias fotótrofas es dependiente de la irradiancia, siempre que todos los otros sustratos necesarios se hallen en exeso (58).

De esta manera los cuanta de luz son considerados como sustrato energético. Como tal presenta características muy especiales. Seguramente la más significativa para el análisis sea que este sustrato existe bajo la forma de un flujo proveniente de una fuente externa, por lo tanto no se encuentra distribuido homogéneamente en la suspensión celular transductora.

En la vasija de cultivo se establece un gradiente del flujo lumínico. Por lo tanto, las células que se encuentran en las porciones del cultivo más alejadas de la fuente disponen de menor cantidad de sustrato para el crecimiento.

Si bien una agitación vigorosa asegura que la totalidad de las células del cultivo dispongan de una provisión energética promedio semejante, es necesario tener en cuenta este proceso de auto-sombra en el análisis de los cultivos.

En la discusión de la provisión de luz a cultivos de algas, Myers consideró que, "enfrentados a la complejidad del problema, hemos considerado improbable que pueda ser hecho, por ahora, un tratamiento teórico riguroso sobre la dinámica del crecimiento de algas en relación a la luz como principal factor de control" (64).

En el estudio del requerimiento cuántico del crecimiento, es necesario entonces, disponer de una medición apropiada de la cantidad y calidad de los cuanta absorbidos por el cultivo.

Sin embargo, es posible calcular la irradiancia promedio como el parámetro determinante de la provisión cuántica. Esta provee mediciones directas, en unidades energéticas, estandarizadas a unidad de superficie y de tiempo.

### C3- Cultivos continuos fotótrofos:

Para estudiar el contenido y características celulares en condiciones definidas es necesario recurrir a la técnica de cultivo continuo. A diferencia del cultivo estático, el continuo origina células en crecimiento bajo condiciones estacionarias. En ellos la velocidad de crecimiento está limitada por la concentración de un determinado nutriente, la que no se modifica durante el cultivo.

Para aplicar la técnica del cultivo continuo al cálculo de requerimientos cuánticos, la provisión de cuanta al cultivo debe ser el factor limitante del crecimiento (58).

En este tipo de cultivos es bombeado medio estéril fresco a medida que la población crece, y la suspensión celular es desalojada de la vasija a igual velocidad, manteniéndose el volumen de cultivo constante. Por lo tanto, para que la densidad celular se mantenga invariable, el incremento de la población debe contrarrestar la dilución.

La variación en el número de células (biomasa) del cultivo, debida tanto a la dilución como al crecimiento, puede ser descripta algebraicamente.

Se define velocidad específica de dilución (D) como la relación entre la velocidad del flujo de medio y el volumen de la vasija de cultivo:

$$D = \frac{dV / dt}{V}$$

D es una medida de la porción del volumen de cultivo que es renovada por unidad de tiempo. También puede ser considerada como la velocidad de disminución de la densidad celular a través del proceso de dilución. De esta manera, la variación del número de células (biomasa) en el cultivo debida a la dilución, puede ser expresada como:

$$\frac{dN}{dt} = - D N$$

Por otro lado, el crecimiento del cultivo ocurre de manera exponencial, de manera que:

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

siendo N y  $N_0$  el número de células, o biomasa, en el tiempo t e inicial, respectivamente, y  $\mu$ , la velocidad específica de crecimiento.

Derivando con respecto al tiempo, la variación del número de células (biomasa) en el cultivo debida al crecimiento, puede ser expresada como:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

Entonces, la variación neta de la biomasa puede ser expresada.

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - D N = N \cdot (\mu - D)$$

Si ambas velocidades son iguales ( $\mu = D$ ), la biomasa del cultivo se mantendrá constante, es decir:

$$\frac{dN}{dt} = 0$$

De esta manera es posible estudiar la actividad metabólica de una población creciendo sin variaciones, ni en la densidad celular ni la concentración de sustratos o productos metabólicos. En cultivos estáticos esto no ocurre.

En el cultivo continuo, en condiciones estacionarias,  $\mu$  debe ser igual a la velocidad específica de dilución (D). Por lo tanto, en los cultivos limitados por la irradiancia, cada valor de ésta requerirá un cierto valor de D.

#### C4- Cultivos continuos regulados por la autosombra:

En cultivos continuos establecidos a D constante para distintas irradiancias incidentes, se verificaron dos tipos de estados estacionarios de crecimiento: el limitado por la luz y el limitado por otro sustrato o por el mecanismo de división celular *per se* (58).

Debido a que la velocidad de dilución específica fue la misma para todos los cultivos, la velocidad específica de crecimiento también lo fue. Se observó que, en el estado estacionario creado, la densidad celular aumentó con la irradiancia incidente (a bajos valores de ésta); mientras que a partir de un cierto valor, la biomasa se mantuvo constante.

Esto indica que el cultivo continuo logró su estado estacionario regulando la provisión de energía (irradiancia efectiva promedio) por medio de la autosombra; como es lógico, ésta aumenta con la densidad celular.

La luz es el limitante del crecimiento en el rango de irradiancias en el que se verifica un aumento de la densidad celular. Por otro lado, a irradiancias superiores, en las que la biomasa se mantiene constante, la concentración de lactato -única fuente de carbono del medio- alcanza un mínimo, en el que se mantuvo. En este rango de irradiancias el crecimiento está limitado por la fuente de carbono.

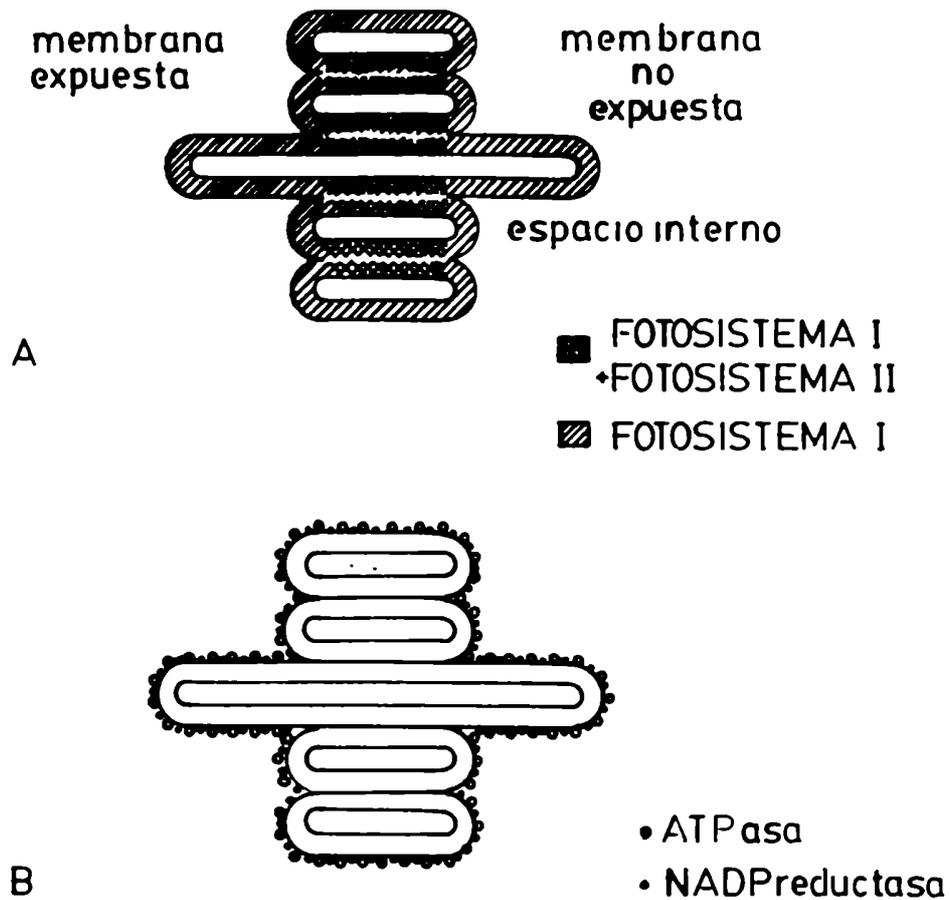
El contenido de Bchl decreció con la irradiancia en ambas situaciones. Sin embargo, la regulación de este contenido puede no ser lo suficientemente efectiva como para mantener el rendimiento cuántico en su máximo valor, ya que existe luz excedente siempre que el contenido de pigmentos sea menor que el máximo posible.

En experimentos realizados, en *Rps. capsulata*, con irradiancias incidentes de distintas longitudes de onda se verificó una mayor eficiencia cuántica del crecimiento a 860 nm (absorción de Bchl a). Sin embargo el valor de  $\mu_{max}$ , a irradiancia saturante, fue el mismo ( $0.33 \text{ h}^{-1}$ ) para las longitudes de onda ensayadas aunque fuera obtenido a distintas irradiancias efectivas (58).

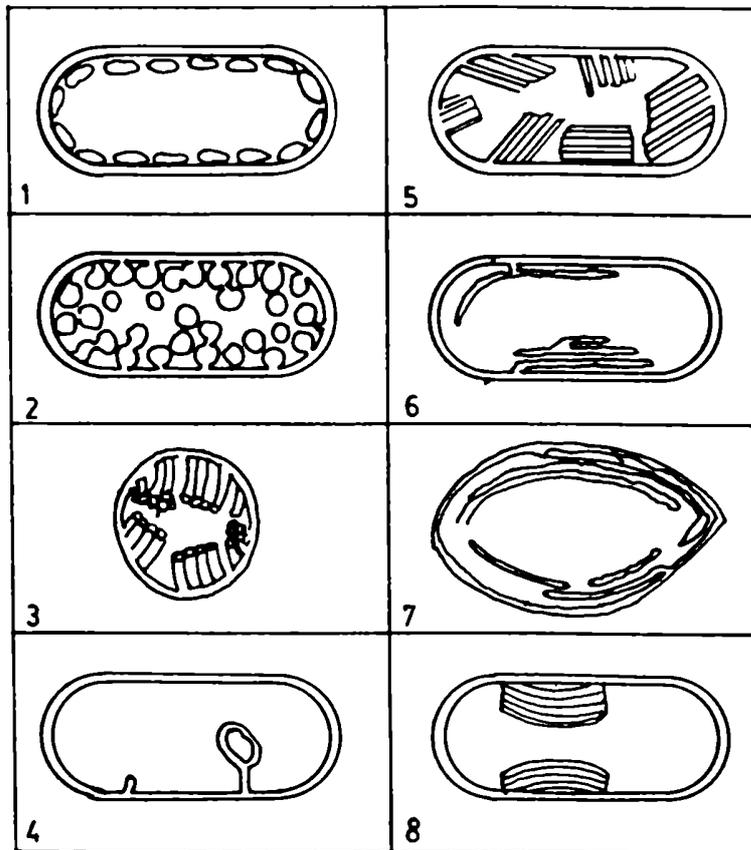
Se verificó que  $\mu$  varía con la irradiancia según la expresión de saturación semejante a la ecuación de velocidad de crecimiento limitada por sustrato, para crecimiento heterótrofo, formulada por Monod (65):

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot I}{K_S + I}$$

donde  $\mu_{max}$  es la máxima velocidad específica de crecimiento (a irradiancias saturantes) y  $K_S$ , la constante de saturación (irradiancia a la cual se obtiene  $\mu = \mu_{max}/2$ ).



**Figura I-1:** Representación esquemática de la distribución de algunos componentes del aparato fotosintético de cloroplastos sobre los distintos tipos de membrana de los grana. **A-** Fotosistemas I y II; **B-** Enzimas NADP<sup>+</sup>-reductasa y ATPasa. Ambos diagramas fueron tomados de (17).



**Figura 1-2:** Disposición de estructuras membranosas internas de bacterias fotótrofas. 1- Vesículas de *Chlorobium* en las bacterias sulfurosas verdes: *Chl. limicola*, *Chl. thiosulfatophilum*, *Chloropseudomonas etilicum*, etc. 2- Sistema de membranas vesiculares. 3- Sistema de membranas tubulares. 4- Invaginaciones aisladas, pequeñas e irregulares. 5- Superposiciones de cortas membranas dobles, unidas a la membrana citoplasmática. 6- Lamelas paralelas parcialmente ramificadas e irregulares. 7- Capas concéntricas de dobles membranas. 8- Superposiciones de dobles membranas, semejantes a grana, casi paralelas a la membrana citoplasmática. Este último tipo es el encontrado en células de *Rhodopseudomonas viridis*. Estos diagramas fueron tomados de (22).

## **II- OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS**

Todos los seres vivos pueden ser considerados como sistemas transductores de energía autorreproducibles; su biomasa es, simultáneamente, producto y catalizador de este proceso.

Las bacterias fotótrofas constituyen un sistema experimental relativamente sencillo para el estudio de la transducción biológica de energía luminica, tanto por su facilidad de cultivo como por poseer sólo un fotosistema.

En los organismos fotótrofos, las variaciones de luz, tanto en calidad (composición) como en intensidad, originan importantes cambios, no sólo morfológicos sino también fisiológicos, ya que la luz es, para ellos, el sustrato de crecimiento.

El objetivo general de esta tesis es, tal como lo expresa su título, el estudio de la influencia de la irradiancia sobre el crecimiento y el aparato fotosintético de la bacteria fotótrofa *Rhodopseudomonas viridis*. Para ello se definieron y estudiaron los siguientes objetivos parciales:

\* Variación de los parámetros del crecimiento con la irradiancia, tanto en cultivos estáticos como continuos.

\* Adaptación de los cultivos ante un cambio de las condiciones de irradiancia.

\* Variación del contenido celular con la irradiancia, especialmente el de pigmentos, cromatóforos y actividades enzimáticas de éstos relacionadas al STE (ATPasa y fotofosforilación).

\* Análisis de las distintas estandarizaciones posibles para estudiar la eficiencia del crecimiento, dadas las importantes variaciones en el contenido celular con la irradiancia.

## III- MATERIALES Y METODOS

### INDICE

<u>1-</u>	<u>Organismo</u>	
1a-	Cepa y mantención	23
1b-	Ubicación taxonómica y características metabólicas	23
<u>2-</u>	<u>Medios de cultivo</u>	
2a-	Medio Hutner (líquido)	23
2b-	Medio sólido	25
<u>3-</u>	<u>Dispositivos de cultivo</u>	
3a-	Inóculo y cultivo en botellas	25
3b-	Cultivo en fermentador	25
3c-	Cultivo en turbidostato	26
<u>4-</u>	<u>Condiciones de cultivo</u>	
4a-	Condiciones generales	27
4b-	Condiciones de irradiancia	
<u>5-</u>	<u>Determinaciones nefelométricas sobre los cultivos</u>	27
<u>6-</u>	<u>Determinación de las velocidades de duplicación (<math>\mu</math>)</u>	
6a-	Para cultivos realizados en fermentador	28
6b-	Para cultivos realizados en turbidostato	29
<u>7-</u>	<u>Determinaciones lumínicas</u>	
7a-	Medición de la irradiancia	29
7b-	Espectro de la irradiancia	29
<u>8-</u>	<u>Determinación de Bacterioclorofila (Bchl)</u>	
8a-	Método	30
8b-	Sobre muestras de cultivo	30
8c-	Sobre muestras de suspensiones de cromatóforos	31
<u>9-</u>	<u>Determinación de proteínas</u>	31
<u>10-</u>	<u>Preparación de las muestras para microscopía electrónica (ME)</u>	31
<u>11-</u>	<u>Preparación de cromatóforos</u>	32
<u>12-</u>	<u>Determinación de la actividad ATP-ásica</u>	32
<u>13-</u>	<u>Determinación de la actividad de fotofosforilación (lip)</u>	33
	 <u>Figuras (III-1 a III-5)</u>	 34

## 1- Organismo:

### 1a- Cepa y mantención:

Los cultivos fueron realizados con *Rhodopseudomonas viridis* cepa NHTC 133 (North Holland type culture).

La cepa fue mantenida en 'tubos punción' a 4º C y en oscuridad. Fue repicada cada 20-30 días, realizándose controles de axenidad en cada repique.

### 1b- Ubicación taxonómica y características metabólicas: (67-72)

*Rhodopseudomonas viridis* pertenece al orden Rhodospirillales que incluye todas las bacterias fotosintéticas, es decir aquellas que contienen bacterioclorofila y realizan el proceso de fotosíntesis sin liberación de oxígeno.

El orden Rhodospirillales está dividido en dos subórdenes: Rhodospirillinae y Chlorobiinae, diferenciados por el tipo de bacterioclorofila que poseen y la localización intracitoplasmática de ésta.

Los integrantes del primer suborden contienen Bchl 'a' ó 'b', localizada en membranas intracitoplasmáticas de diferentes tipos pero continuas con la membrana plasmática. El segundo suborden incluye aquellas bacterias con Bchl 'c', 'd' ó 'e'; presente como pigmento soluble, es decir no unida a membranas y en organelas con forma de 'cigarros' o 'lentejas', llamadas vesículas.

El suborden Rhodospirillinae agrupa dos familias: Rhodospirillaceae (en la que está incluida *Rps. viridis*) y Chromatiaceae.

Los integrantes de la familia Rhodospirillaceae tienen un metabolismo preferentemente fotoorganotrófico; es decir: crecen a expensas de energía lumínica utilizando compuestos orgánicos simples como dadores de electrones; el ácido sulfhídrico inhibe el crecimiento y generalmente son anaerobias facultativas.

Los integrantes de la familia Chromatiaceae utilizan el SH<sub>2</sub> como dador de electrones y poseen capacidad para fijar CO<sub>2</sub>; son fotoautótrofas, aunque algunas especies pueden ser también fotoorganótrofes.

## 2- Medios de cultivo:

### 2a- Medio de Hutner (líquido):

El medio completo final contiene las siguientes soluciones stock, en las cantidades indicadas:

solución A	20 ml
solución B	20 ml
solución C	40 ml
solución D	2 ml
solución E	10 ml
solución metal 44	1 ml
extracto de levadura	1 g

se llevó a 1 litro con agua destilada.

La composición de las soluciones stock es la siguiente:

**\*Solución A (solución base concentrada):**

cloruro de calcio	1.25 g
ácido nitrilotriacético (NTA)	5.00 g
sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O	1450 g
molibdato de amonio 4 H <sub>2</sub> O	4.60 mg
sulfato ferroso 7 H <sub>2</sub> O	50.00 mg
solución metal 44	25.00 ml

se ajustó el pH a 6.80 con KOH y se llevó a 1 litro con agua destilada

**\*Solución B (succinato de amonio):**

ácido succínico	59.50 g
-----------------	---------

se ajustó el pH a 6.80 con NH<sub>4</sub>OH y se llevó a 0.5 litros con agua destilada.

**\*Solución C:**

buffer fosfato de potasio 0.5 M pH 6.80.

**\*Solución D (factor de crecimiento):**

biotina	2.0 mg
bicarbonato de sodio	50.0 mg
clorhidrato de tiamina	50.0 mg
ácido nicotínico	100.0 mg

se llevó a 100 ml con agua destilada.

**\*Solución E:**

acetato de sodio 3 H <sub>2</sub> O	50.0 g
glutamato monosódico	60.0 g

se llevó a 500 ml con agua destilada.

**\*Solución metal 44:**

EDTA disódico		250.0 mg
sulfato de cinc	7 H <sub>2</sub> O	1095.0 mg
sulfato ferroso	7 H <sub>2</sub> O	500.0 mg
sulfato de manganeso	1 H <sub>2</sub> O	154.0 mg
sulfato cúprico	5 H <sub>2</sub> O	39.2 mg
nitrate de cobalto	6 H <sub>2</sub> O	24.8 mg
tetraborato de sodio	10 H <sub>2</sub> O	17.7 mg

se llevó a 100 ml con agua destilada.

### 2b- Medio sólido:

Fue utilizado para crecer las células en tubos punción y para realizar controles de contaminación por aerobios en placas. Se lo utilizó, también, para aislamiento y control de axenidad en jarras anaeróbicas. Se preparó de la siguiente manera:

extracto de levadura	3 g
agar	15 g

se llevó a 1 litro con agua destilada.

### 3- Dispositivos de cultivo:

#### 3a- Inóculo y cultivo en botellas:

El crecimiento se inició a partir de un 'tubo punción', se trituró el medio sólido con un ansa estéril, se llenó totalmente con medio líquido el volumen del tubo y se incubó con iluminación continua.

Una vez crecido en medio líquido, se transfirió del tubo a botellas de 50-100 ml y de ellas a otras de 500-1000 ml, siempre las botellas fueron completadas totalmente con medio líquido y cerradas herméticamente (condiciones anaeróbicas). Se obtuvieron así suficientes células viables como para inocular volúmenes mayores, o suficiente masa celular como para realizar algún ensayo previo.

Los volúmenes inoculados, especialmente en el fermentador y en el quimiostato, fueron siempre menores que el 5 % del volumen final del cultivo. La  $DO_{680}$  inicial (inmediatamente después de inocular) en estos cultivos fue siempre menor que 0.06.

Todos los tubos y botellas utilizados fueron de vidrio traslúcido.

#### 3b- Cultivo en fermentador:

Se utilizó un fermentador New Brunswick Magnaferm Model MF 403, provisto de:

- vasija de cultivo de 7 litros de capacidad (17 cm de diámetro y 48 cm de altura).
- regulador de temperatura, con rango  $\pm 0.5^\circ$  C, mediante dos circuitos de circulación interna de líquidos refrigerante y calefaccionante.
- entrada y salida de gases, a través de filtros, con flujo y presión controlados.
- agitación interna por medio de tres paletas dispuestas sobre un eje central. Fue usada también como agitador una paleta superior correspondiente al sistema de ruptura de espuma ("anti-foam"). Ambos sistemas poseen velocidad regulable.
- sifón extractor de muestra del seno mismo del cultivo.

### 3c- Cultivo en turbidostato:

La figura III-1 muestra el turbidostato diseñado y construido para obtener cultivos continuos fototróficos. El mismo consta de:

#### i- vasija de cultivo:

- cilíndrica, de 12 cm de diámetro, con un hueco interno de 6 cm de diámetro (por lo tanto, las bacterias crecen en una 'pared' circular de 3 cm de ancho).
- altura total: 27 cm, profundidad del hueco interno: 22 cm.
- volumen de cultivo: 1.9 litros.
- provista de: serpentina interna para circulación de refrigerante, dedo ciego para sensor térmico, dedo abierto para burbujeo de N<sub>2</sub> o Ar, agitador magnético interno, 2 entradas superiores (a- de medio fresco, b- del circuito cerrado de medición nefelométrica del crecimiento), 2 salidas inferiores (a- de cosecha del cultivo, b- idem antes).

#### ii- sistema de control de densidad celular:

- a- circuito cerrado de circulación de cultivo con bomba peristáltica continua.
- b- célula fotosensible.
- c- módulo controlador de turbidez con valores programados de apertura y corte de d-
- d- bomba peristáltica diluyente comandada por c-, transfiriendo medio de cultivo de f- a la vasija de cultivo.
- e- módulo contador del número de intervalos y duración de los mismos en los que c- comandó el encendido y corte de d-
- f- reservorio de medio de cultivo fresco.
- g- cosecha de cultivo, por simple diferencia de altura, manteniendo el volumen de cultivo constante.

#### iii- sistema de control de temperatura:

- a- teletermómetro con sensor térmico en un dedo ciego sumergido en el cultivo.
- b- módulo controlador de temperatura, con valores programados de apertura y corte de c-
- c- bomba impelente de líquido refrigerante por la serpentina interna de la vasija de cultivo.
- d- baño frío (-15° C).
- e- ventiladores -sólo en los cultivos de mayores irradiancias-.

#### iv- sistema de iluminación:

- aro de 8 portalámparas equidistantes entre sí y del centro de la vasija de cultivo. La distancia entre las lámparas y la superficie de la misma fue de 20 cm. Las lámparas utilizadas se describen en 4b.

#### **4- Condiciones de cultivo:**

##### **4a- Condiciones generales:**

Los cultivos se realizaron a 30 ° C, con agitación permanente (200 rpm) y en condiciones de anaerobiosis logradas por: desoxigenación del medio de cultivo previa a la inoculación mediante agitación vertiginosa y fuerte burbujeo de nitrógeno o argón, y suave burbujeo continuo de alguno de estos gases a lo largo de todo el cultivo. En casos donde no se dispuso de suficiente cantidad de gas se realizó un breve burbujeo en cada momento de extracción de muestra y se dejaron cerradas la salida y entrada de gases para evitar el intercambio.

##### **4b- Condiciones de irradiancia:**

Los distintos regímenes de irradiancia fueron obtenidos variando el número y potencia de lámparas ubicadas a distancias fijas y constantes de las superficies de las distintas vasijas de cultivo. El número, tipo y potencia de las lámparas varió de acuerdo a la irradiancia requerida para el cultivo, manteniéndose siempre la misma simetría con respecto a la vasija.

En el caso del fermentador, las lámparas -12 como máximo- se ubicaron en dos baterías verticales de portalámparas, ubicadas perpendicularmente entre sí; la distancia entre las bombas y la superficie del cultivo fue de 12 cm. En el caso del turbidostato, las lámparas fueron 8 como máximo, dispuestas con simetría radial y la distancia fue de 20 cm.

Las lámparas utilizadas fueron de 2 tipos: incandescentes blancas y reflectoras. Las primeras fueron de 25, 40, 60, 75, 100, 150 y 200 W; las segundas de 75, 100 y 150 W.

La irradiancia fue determinada como se describe en 7a. El rango de irradiancias de cultivo fue de 10 - 135 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> para los cultivos en fermentador y de 13 - 950 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> para los realizados en turbidostato.

En los casos de cultivos a irradiancias menores que 40 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>, todo el dispositivo de cultivo fue cubierto con telas negras para evitar la iluminación espúrea.

#### **5- Determinaciones nefelométricas sobre los cultivos:**

A intervalos variables de entre 0.5 y 5 horas fueron tomadas muestras de los cultivos. Se determinaron sus absorbancias a 680 nm y 1015 nm, en ciertos casos fueron determinados también los contenidos de pigmentos (Bchl y carotenos), por extacción con solventes (8-) y de proteínas (9-).

Ambas determinaciones nefelométricas fueron realizadas en un espectrofotómetro Zeiss DMR 21 en cubetas de 1 cm de ancho y, de acuerdo al control de linealidad hecho, todas las mediciones se efectuaron sobre diluciones de menos de 0.7 UDO para ambas longitudes de onda.

Las mediciones se realizaron contra agua y por triplicado. Se realizaron espectros de absorción del medio de cultivo sin inocular y del sobrenadante de un cultivo bien crecido ( $DO_{680} = 2.10$ ) luego de precipitar las células. Sus absorbancias resultaron despreciables, tanto en el visible como en el infrarrojo cercano; no fue necesaria, por lo tanto, corrección alguna sobre las mediciones de las muestras de cultivos.

La figura III-2 muestra el espectro de absorción de células crecidas a baja irradiancia; en ella se indican las longitudes de onda a las que se determinaron las absorbancias de las muestras de cultivos:

- a 680 nm se ponderó la biomasa, por turbidez general.
- a 1015 nm -pico de absorción de la Bchl b *in vivo* - se ponderó, indirectamente, el contenido de Bchl del cultivo.

En la figura III-2 se observa que la  $DO_{1015}$  está compuesta tanto por el contenido neto de Bchl ( $b$ , en dicha figura) como por el componente de turbidez a esa longitud de onda ( $a = 0.468 DO_{680}$ ). Como controles fueron realizados espectros de células crecidas a otras condiciones de irradiancia y, aunque el contenido neto de Bchl varía, el componente de turbidez a 1015 nm fue siempre el mismo porcentaje de la  $DO_{680}$  (46.8 %).

El contenido de Bchl ponderado *in vivo* de esta manera ( $DO_{1015} - 0.468 DO_{680}$ ) correlaciona estrictamente con el medido por extracción de solventes de muestras de cultivos ( 8-).

## 6- Determinación de las velocidades de duplicación ( $\mu$ ):

### 6a- Para cultivos realizados en fermentador:

Las velocidades de duplicación de los distintos parámetros medidos sobre los cultivos fueron determinadas mediante dos métodos:

i- gráfico: por medio de la pendiente del logaritmo del parámetro en estudio en función del tiempo. De hecho, se obtuvo de gráficos semilogarítmicos como los representados en las figuras IV A-1 y IV A-2, analizadas en IV A- Resultados y Discusión.

ii- analítico: mediante la utilización del programa de computación (lenguaje Basic) listado en la figura III-3, que calcula las  $\mu$  para los tres parámetros estudiados ( $DO_{680}$ ,  $DO_{1015}$  y  $DO_{1015} - 0.468 DO_{680}$ ).

La velocidad de duplicación característica para cada parámetro de cada cultivo fue obtenida promediando, con distinto peso relativo, mediante un programa de integración polinomial los valores correspondientes a la fase exponencial. Esta fase, que implica  $\mu$  constante, fue determinada como el período para el cual el promedio pesado de ésta fue obtenido con un error menor del 5 %.

### 6b- Para cultivos realizados en turbidostato.

Con este dispositivo se realizaron cultivos continuos, precedidos siempre por un cultivo estático para estandarizar las condiciones iniciales (ver IV B- Resultados y Discusión).

Para los cultivos estáticos previos, la velocidad de duplicación fue determinada por ambos métodos descritos en 6a-.

Para los cultivos continuos la velocidad de duplicación de la biomasa fue determinada por medio de la velocidad de dilución específica (D) necesaria para mantener la turbidez constante. Ver I C 3- Introducción.

El valor de D para cada cultivo se obtuvo integrando en función del tiempo los períodos durante los cuales estuvo accionada la bomba diluyente del turbidostato, de flujo conocido.

## 7- Determinaciones lumínicas:

### 7a- Medición de la irradiancia:

Los valores de irradiancia fueron medidos con un radiómetro Yellow Spring Instruments YSI-Kettering modelo 65A equipado con un sensor YSI 6551.

Sobre el fermentador las medidas fueron realizadas a espacios regulares sobre toda la superficie de la vasija, tanto sobre la parte expuesta como la que no. En el turbidostato, fueron realizadas tanto sobre la superficie externa como en el hueco interno. En ambos casos las mediciones se hicieron a distintas alturas y en distintos ángulos con respecto a las lámparas, y luego fueron promediadas según su peso relativo.

Para los ensayos de fotofosforilación (13-), la irradiancia fue medida con el sensor ubicado en el interior de un tubo sumergido en el baño termostatzado donde se realizaron los ensayos.

### 7b- Espectro de la irradiancia:

Se realizaron espectros de emisión tanto de las distintas lámparas utilizadas como de cada una de ellas ubicadas a distintas distancias (ver figura III-4).

Las mediciones fueron efectuadas en un espectrorradiómetro Li-Cor equipado con un sensor LI-200SB. Estas fueron convertidas a valores energéticos mediante la tabla de conversión provista por el fabricante, dependiente de la sensibilidad del sensor a las diferentes longitudes de onda.

Se verificó que la relación de los valores obtenidos, tanto para cada lámpara a distintas distancias como para distinto tipo de lámparas, no difirió en más de 5 % para el rango de longitudes de onda fotosintéticamente activas en la bacteria (400-1100 nm). Por lo tanto se puede afirmar que el espectro de emisión, en términos energéticos, no varió ni con el tipo de lámparas utilizado ni con la distancia de éstas.

Para los ensayos en que fue necesario recurrir a la variación de la distancia de la batería lumínica para obtener distintas irradiancias (ver 13-), se realizó el siguiente control adicional: se midió la irradiancia en el sitio de ensayo con las lámparas a distintas distancias. Se verificó que la irradiancia medida aumenta con la inversa del cuadrado de la distancia a la batería lumínica (ver figura 111-5).

Al variar de manera semejante la irradiancia medida en el punto de ensayo y la cantidad de fotones emitidos por la batería de lámparas (control anterior), se puede afirmar que el espectro de los fotones arribados al sitio de ensayo fue constante en el rango de distancias utilizado (16 - 70 cm).

## **8- Determinación de bacterioclorofila (Bchl):**

### **8a- Método:**

El contenido de Bchl, tanto de muestras de cultivos como de suspensiones de cromatóforos, fue determinado por el método descrito por Clayton (74).

Se dispersó vigorosamente un volumen pequeño (< 40  $\mu$ l) de muestra en una mezcla recién preparada de acetona-metanol 7:2 (v/v), se centrifugó inmediatamente en centrífuga clínica a 3500 rpm por 5 min y se determinó la DO a 795 nm -pico de absorción de Bchl b extraída- del sobrenadante.

El volumen de la muestra a extraer fue siempre menor que la 1/50 parte del volumen de la mezcla de solventes, para no modificar el medio y por ende el coeficiente de extinción.

La cantidad de Bchl extraída fue siempre lo suficientemente baja como para que el precipitado obtenido resulte incoloro; en estos casos una segunda extracción detecta cantidades despreciables de Bchl.

Tanto el proceso de extracción como la lectura se realizaron en el menor tiempo posible y durante todo el procedimiento se protegió el extracto orgánico de la luz para evitar la fotooxidación de los pigmentos.

Los cálculos de realizaron usando un coeficiente de extinción (1 mM, 1 cm) de 122 y se consideró un PM de 1000 (75).

### **8b- Sobre muestras de cultivos:**

Se procedió de la siguiente manera: tres alícuotas de distinto volumen de cada muestra de cultivo fueron centrifugadas en centrífuga clínica por 15 min a 3500 rpm, se descartó el medio de cultivo y se secaron bien las paredes del tubo con papel absorbente, sin tocar el precipitado. Este se resuspendió vigorosamente en la mezcla de solventes descrita y se determinó el contenido de Bchl en cada alícuota.

El valor de la concentración de Bchl para cada muestra de cultivo fue obtenido como la pendiente del contenido de Bchl de cada alícuota en función del volumen de la misma.

### 8c- Sobre muestras de suspensiones de cromatóforos:

Alícuotas de distintos volúmenes de las suspensiones de cromatóforos fueron dispersadas directamente en la mezcla de solventes y se determinó el contenido de Bchl de cada una.

El valor de la concentración de Bchl de cada preparación de cromatóforos se determinó de la misma manera que para las muestras de cultivos.

### 9- Determinación de proteínas:

El contenido proteico, tanto de muestras de cultivos como de suspensiones de cromatóforos, fue determinado por el método de Lowry (76).

Sobre ambos tipos de muestras fueron previamente extraídos los pigmentos con la misma mezcla de solventes que la utilizada en 8-. El precipitado obtenido fue hidrolizado en 0.5 N NaOH durante 2 horas a 60° C.

El valor de la concentración de proteínas para las distintas muestras fue obtenido como la pendiente del contenido de distintas alícuotas de la muestra en función de su volumen.

La curva de calibración fue realizada con BSA en las mismas condiciones alcalinas que las muestras en la reacción colorimétrica. Los valores medidos estuvieron en el rango de 10 - 100 µg de BSA, en el cual se verificó linealidad con la absorbancia a 650 nm.

### 10- Preparación de las muestras para microscopía electrónica (ME):

Las células fueron precipitadas por centrifugación en Sorvall a 4500 g durante 10 min a 4° C, no fueron lavadas ya que el medio de cultivo facilita el aglutinamiento necesario para los procesos posteriores.

Fueron seguidas las técnicas descritas previamente (77-79). Las células fueron fijadas en glutaraldehído 3 % en buffer fosfato de K 100 mM pH 7.4 durante 30 min, lavadas dos veces con el mismo buffer y refijadas en ácido ósmico 1.5 % en el mismo buffer. Luego de una impregnación en bloque con acetato de uranilo 2 %, fueron deshidratadas mediante una serie de alcoholes crecientes, finalizando con óxido de propileno y se procedió a la inclusión en resina Epan 812 y al corte en ultramicrotomo Porter-Blum MT-2-B.

Cada corte fue coloreado, por contraste, con citrato de plomo. La observación se realizó en microscopio electrónico Jeol JEM 100.S.

### **11- Preparación de cromatóforos:**

Las células, provenientes tanto de cultivos estáticos como continuos, fueron precipitadas por centrifugación en Sorvall a 4500 g durante 10 minutos a 4°C, lavadas con buffer Tris-ClH 5 mM pH 8.0 y centrifugadas nuevamente. Para la preparación de cromatóforos, las células cosechadas a lo largo de los cultivos continuos fueron recibidas y mantenidas en hielo y oscuridad durante no más de 12 horas.

Luego de lavadas, las células fueron resuspendidas en Tris-ClH 20 mM pH 8.0 y la suspensión fue pasada por French Press a 800 psi y centrifugada en Sorvall, en las mismas condiciones que previamente. El precipitado, conteniendo las células no rotas y trozos grandes de membrana y pared celular, fue resuspendido en el mismo buffer y nuevamente pasado por French Press a 500 psi. Luego de centrifugar, se juntaron ambos sobrenadantes. Esta preparación cruda de membrana fue centrifugada sobre un 'colchón' de sacarosa 15 % (p/v) en el mismo buffer, con rotor de ángulo móvil a 145000 g durante 1.25 horas. El precipitado fue resuspendido en Tris-ClH 20 mM pH 8.0 y representa la fracción cromatofórica.

### **12- Determinación de la actividad ATP-ásica:**

La reacción se llevó a cabo adicionando una alícuota de cromatóforos (7-15 µg de Bchl) a un volumen de mezcla de reacción conteniendo: Tris-ClH 50 mM pH 8.0,  $Cl_2Mg$  2 mM, ATP 2 mM pH 8.0. El volumen final de reacción fue de 1 ml.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos sumergidos en baños termostatzados a 30° C con agitación continua y en oscuridad. La hidrólisis fue desencadenada con el agregado rápido de cromatóforos e interrumpida con la adición de 80 µl de TCA 50 % (p/v), agitando inmediatamente y transfiriendo el tubo a hielo. Los tubos fueron mantenidos así en todo momento posible, para evitar la hidrólisis no enzimática del fosfato y/o B de los nucleótidos remanentes. Esta hidrólisis está favorecida por las condiciones ácidas que provocan el TCA y el posterior agregado del reactivo colorimétrico.

Luego de centrifugar 5 min a 3500 rpm en centrífuga refrigerada, para precipitar los cromatóforos, se tomó 0.8 ml del sobrenadante y se determinó el Pi según el método descrito por Tausky y Shorr (81), modificado en la concentración de sus componentes (4 veces mayor) a fin de aumentar la sensibilidad.

El reactivo colorimétrico se preparó de la siguiente manera:  $SO_4Fe \cdot 7 H_2O$ , 2 g; molibdato de amonio 10 % (p/v) en  $SO_4H_2$  10 N, 4 ml; se llevó a 10 ml con  $H_2O$  destilada, se lo protegió de la luz y se lo utilizó en el día.

Se agregó 140 µl de reactivo colorimétrico a los 0.8 ml de muestra. Se incubó 2 min a 30° C, para desarrollar color. Se leyó inmediatamente la DO a 660 nm.

La curva de calibración cumple la ley de Lambert-Beer hasta 0.9 UDO<sub>660</sub>, siendo la pendiente 2.7 UDO<sub>660</sub>·μmol Pi<sup>-1</sup>.

Las lecturas se realizaron contra un 'blanco de reacción no enzimática', incubado en ausencia de cromatóforos por un tiempo intermedio a los usados para las reacciones; luego de agregado el TCA, se adicionó la alícuota de cromatóforos y se procedió como con los demás tubos.

El valor de la actividad fue obtenido como la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos (dependiendo de la cantidad de cromatóforos disponible) menores que 6 minutos.

### **13- Determinación de la actividad de fotofosforilación (lip):**

La reacción se llevó a cabo adicionando una alícuota de cromatóforos (4-8 μg de Bchl) a un volumen de mezcla de reacción conteniendo: tricina-NaOH 29 mM pH 8.0, Cl<sub>2</sub>Mg 3.65 mM, ADP 0.2 mM, PMS 50 μM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 2 mM -con actividad específica (<sup>32</sup>P) ca. 10<sup>6</sup> cpm/μmol Pi<sup>-</sup>. El volumen final de reacción fue 1 ml.

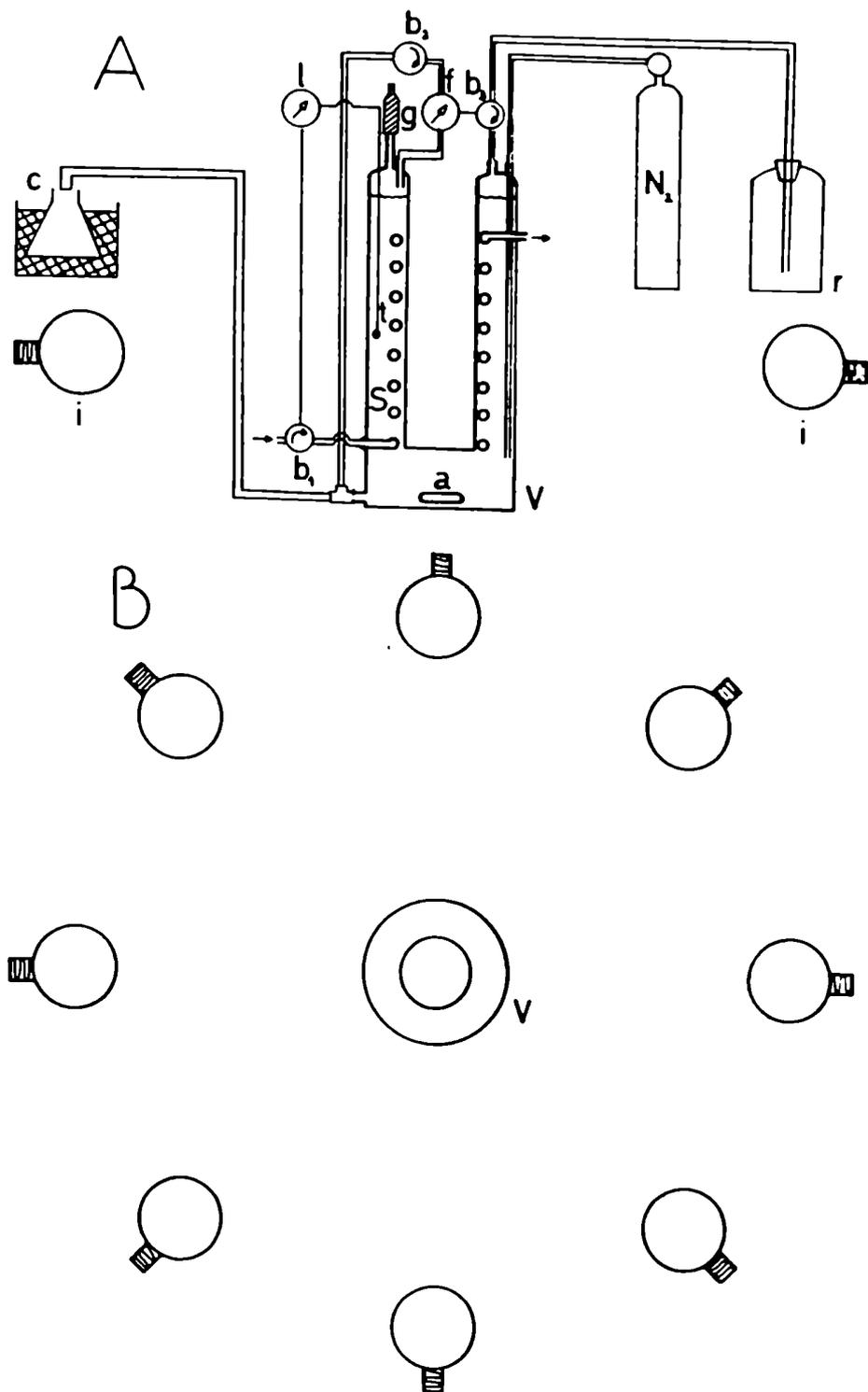
Las reacciones se llevaron a cabo en tubos sumergidos en baños termostatzados a 30<sup>o</sup> C con agitación continua e iluminación lateral de distintas irradiancias, las que fueron obtenidas siempre con la misma batería de 3 bombas incandescentes de 150 W ubicada a distancias variables (16 - 70 cm). Se verificó que el espectro de la irradiancia en el tubo de ensayo fuera el mismo para las distintas distancias de la batería (ver 7b-).

La irradiancia fue determinada como se describe en 7a.

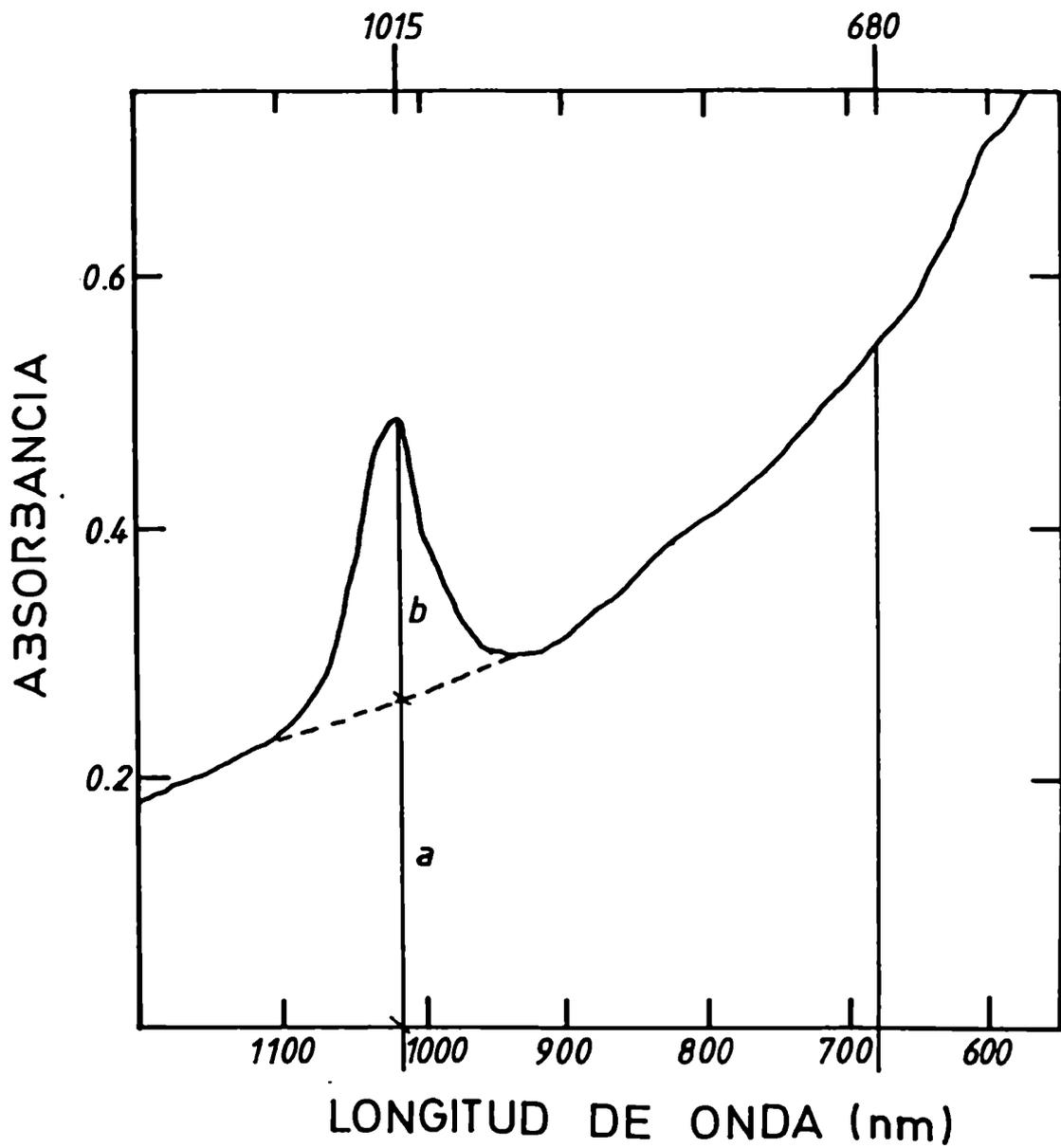
El rango de irradiancias de ensayo fue de 100 - 1800 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

La reacción se detuvo agregando 1 ml de 'reactivo de trietilamina', agitando inmediatamente y transfiriendo el tubo a hielo. Este reactivo permite la separación rápida y precisa del fosfato incorporado del remanente, el cual forma un complejo fosfomolibdico. Al desnaturalizarse, los cromatóforos son precipitados junto a este complejo. Luego de 5 min de centrifugación, en el sobrenadante se encuentra el P incorporado a ATP, el que fue determinado por radiactividad en un contador de centelleo líquido (82,83).

El valor de la actividad fue obtenido como la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos (dependiendo de la cantidad de cromatóforos disponible) menores que 6 minutos.



**Figura III-1:** Turbidostato diseñado y construido para cultivos fotótrofos. **A:** vista lateral; **B:** en planta. Las proporciones fueron mantenidas para la vasija y el sistema de iluminación exclusivamente. v: vasija de cultivo; s: serpentina refrigerante; a: agitador magnético; N<sub>2</sub>: tubo de nitrógeno; t: sensor térmico; l: teletermómetro; b<sub>1</sub>: bomba refrigerante; b<sub>2</sub>: bomba peristáltica; f: célula fotosensible; b<sub>3</sub>: bomba diluyente; r: reservorio de medio de cultivo; c: cosecha; g: salida de gases; i: lámparas.



**Figura III-2:** Espectro de absorción de células crecidas a baja irradiancia.  
 (---): extrapolación gráfica de la turbidez en la zona de absorción de la Bchl  
 b. (a) y (b): sendos componentes de la  $DO_{1015}$  (ver 5-).

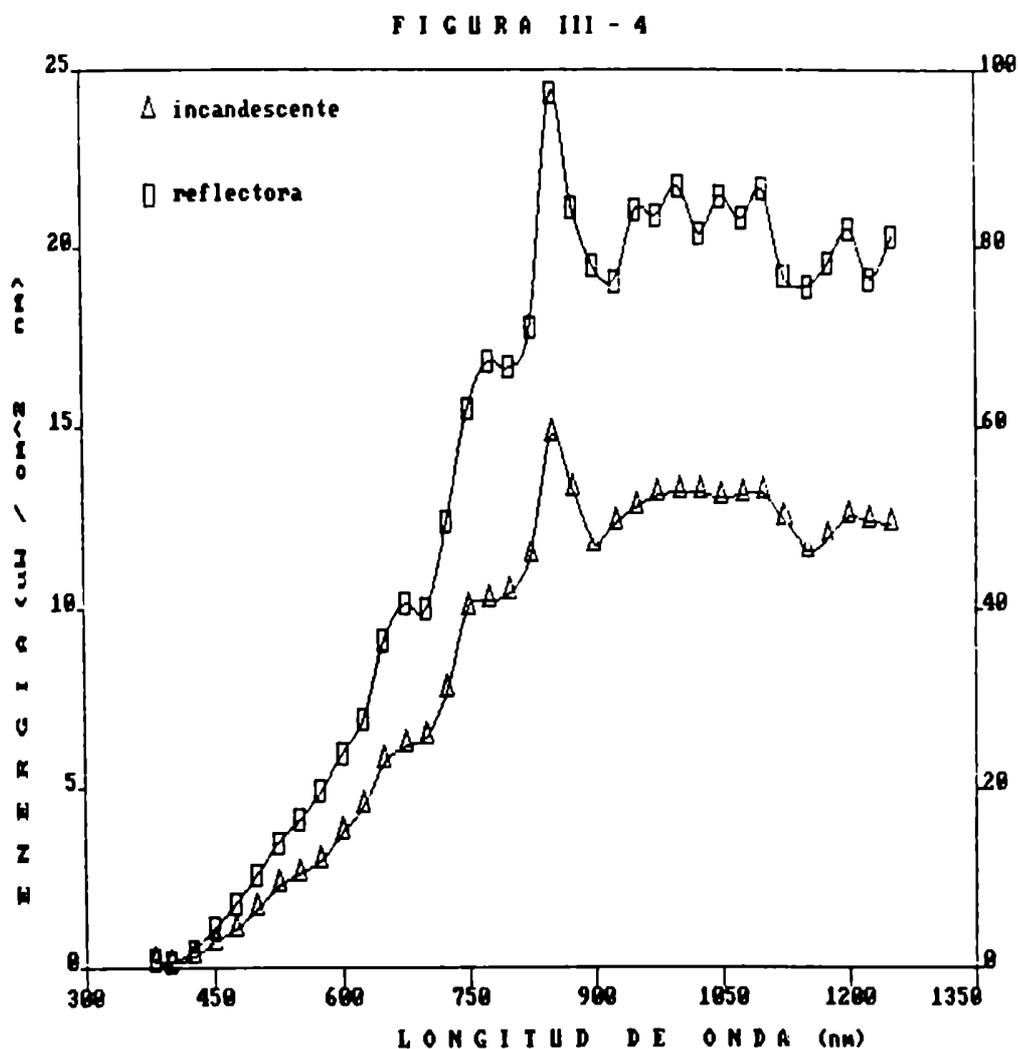
## F I G U R A III - 3

```

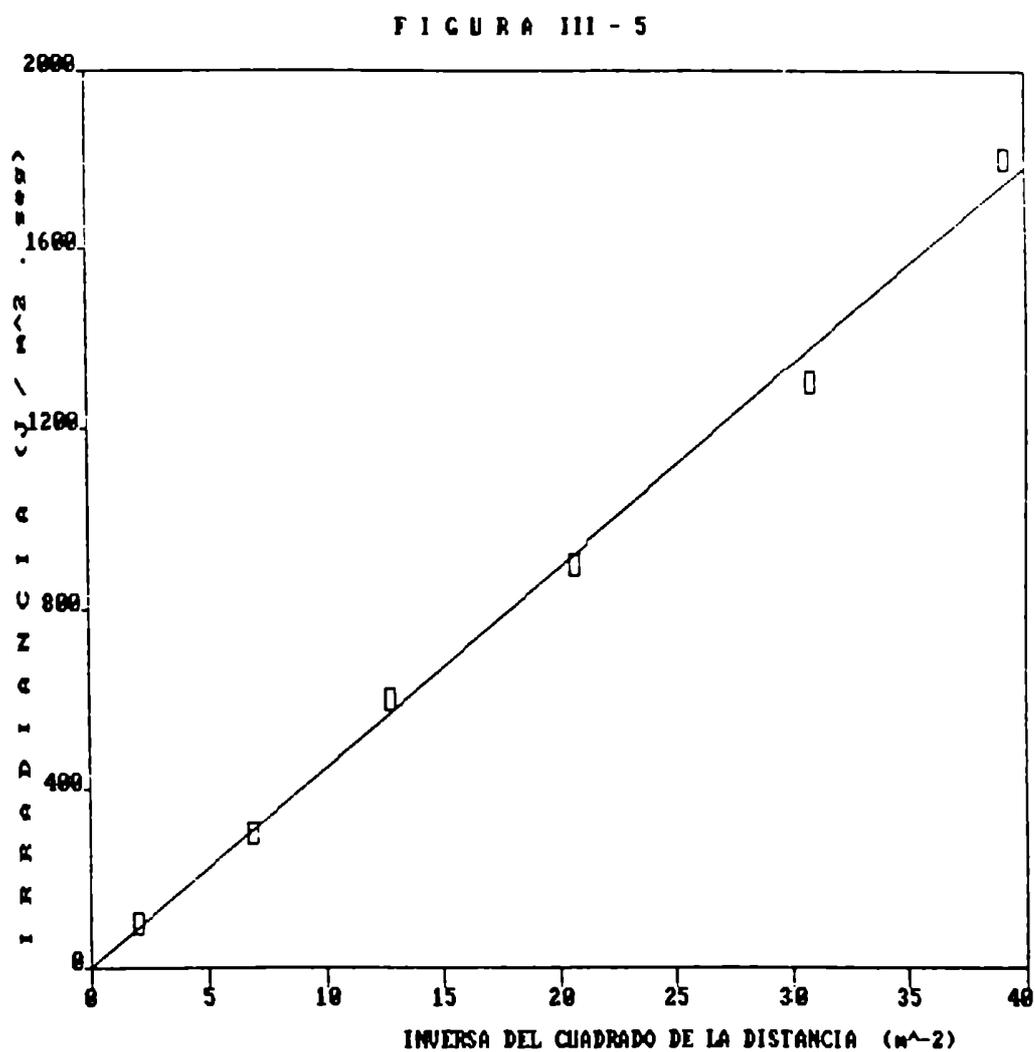
1  CLS
10 REM "CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO - RAUL"
15 REM "No olvidarse de cambiar los titulos en line 120 ni de poner los minuto
    iniciales como decimales"
16 REM "N = numero de puntos de una curva (ternas de datos: tiempo-DO680-DO1015
17 REM "Entrar los datos como ternas: OJO!: tiempo en horas consecutivas. minut
    sexagesimales"
20 INPUT "Numero de datos (ternas)="; N
30 INPUT "Minutos iniciales (para ser restados del t0 - entrar como decimales)
    "; G
40 DIM H(N), S(N), M(N), T(N), B(N), E(N)
50 DIM X(N), Y(N), Z(N)
60 FOR I=1 TO N
70 INPUT "TIEMPO";H(I):INPUT"DO680";S(I):INPUT"DO1015";M(I)
80 T(I)= INT(H(I)) + (H(I) - G - INT(H(I))) / .6
90 NEXT I
100 B(1)= M(1) - .468 * S(1)
110 E(1)= B(1) / S(1)
115 CLS
120 LPRINT "CURVA X - Condiciones tales - pagina x "
130 LPRINT
140 LPRINT
150 LPRINT "TIEMPO  DO680  DO1015  1015-680  C.sp.  u680  u1015  uBchl"
160 LPRINT " (hs)                Bchl  hs^-1  hs^-1  hs^-1"
165 LPRINT I
170 LPRINT USING "##.##  #.###  #.###  .####  .#####  "; T(1), S(1), M(1)
    B(1), E(1)
175 LPRINT
180 FOR X=2 TO N
190 B(X)= M(X) - .468 * S(X)
200 E(X)= B(X) / S(X)
210 D= T(X) - T(X-1)
220 X(X)= (LOG(S(X)) - LOG(S(X-1))) / D
230 Y(X)= (LOG(M(X)) - LOG(M(X-1))) / D
240 Z(X)= (LOG(B(X)) - LOG(B(X-1))) / D
250 LPRINT USING "##.##  #.###  #.###  .####  .#####  .####  .####  #.
    # "; T(X), S(X), M(X), B(X), E(X), X(X), Y(X), Z(X)
255 LPRINT I
260 NEXT X
270 INPUT "QUIERE VER LA TABLA DE VALORES? (S/N) ",T#
280 IF T#="S"OR T#="s" THEN 600
350 END
600 CLS
610 PRINT"TABLA DE VALORES"
614 PRINT"TIEMPO","DO680","DO1015"
620 FOR T=1 TO N
630 PRINT H(T),S(T),M(T)
640 NEXT

```

**Figura III-3:** Listado del programa de computación (lenguaje Basic) para calcular analíticamente los valores de las velocidades de duplicación de los parámetros medidos en los cultivos estáticos ( $DO_{680}$ ,  $DO_{1015}$  y  $DO_{1015}-0.468 \cdot DO_{680}$ ).



**Figura III-4:** Espectros de emisión de los dos tipos de lámparas utilizados. Estos espectros corresponden a: lámpara incandescente de 100 W situada a 20 cm del sensor del espectrorradiómetro (escala 0 - 25  $\mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ ), y lámpara reflectora de 75 W situada a la misma distancia (escala 0 - 100  $\mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ ).



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$(-4.492E-01) + (4.455E+01)*X$$

THE VARIANCE - 1.688E+03

**Figura III-5:** Dependencia de la irradiancia con la distancia a la fuente lumínica. El sensor de irradiancia fue ubicado en el interior de un tubo sumergido en un baño termostático, tal como fueron dispuestos los tubos en los ensayos de fotofosforilación (13-). La batería de bombas y las distancias a la que fue ubicada fueron las mismas que las utilizadas en estos ensayos.

## IV- RESULTADOS Y DISCUSION

### INDICE

#### IV A- Crecimiento en cultivos estáticos

<b>A1-</b> Análisis del crecimiento	40
<b>A2-</b> Variación de los parámetros del crecimiento con la irradiancia	41
<b>A3-</b> Variación del contenido específico de Bchl durante los cultivos	41
<b>A4-</b> Variación del contenido específico de Bchl con la irradiancia	42
<b>A5-</b> Variación de la velocidad de crecimiento con la irradiancia	43
<b>A6-</b> Cambios en la irradiancia de cultivo	44
<b>A7-</b> Velocidad de crecimiento relativa al contenido específico de Bchl	46
<b>A8-</b> Energía disponible por el cultivo	48
Tabla <b>IV-1</b>	49
Figuras <b>IV A-1 a IV A-8</b>	50

#### IV B- Contenido y organización de membranas internas

<b>B1-</b> Influencia de la irradiancia sobre el crecimiento en cultivos continuos	58
<b>B2-</b> Organización y desarrollo del sistema de membranas internas (SMI)	59
<b>B3-</b> Variación del contenido específico de Bchl de células y cromatóforos con la irradiancia	60
<b>B3-</b> Variación del contenido de cromatóforos con la irradiancia	61
Tabla <b>IV-2</b>	63
Figuras <b>IV B-1 a IV B-6</b>	64

#### IV C- Membranas internas aisladas

<b>C1-</b> Observación microscópica	70
<b>C2-</b> Actividad de ATP-ásica	70
<b>C2-</b> Actividad de fotofosforilación (lip)	72
Tablas <b>IV-3 y IV-4</b>	76
Figuras <b>IV C-1 a IV C-6</b>	78

## IV A- CRECIMIENTO EN CULTIVOS ESTÁTICOS

### AI- Análisis del crecimiento:

El crecimiento de *Rhodospseudomonas viridis* en cultivos estáticos fue seguido mediante la evolución de 3 parámetros: densidades ópticas a 680 y 1015 nm y el valor calculado como  $DO_{1015} = 0.468 DO_{680}$ . El primero y el último ponderan turbidez general y contenido de Bchl del cultivo, respectivamente; mientras que la  $DO_{1015}$  representa una medición conjunta de ambos parámetros. (ver Materiales y Métodos 5- y figura III-2).

La variación de estos parámetros durante el cultivo fue analizada gráfica y analíticamente como se describió en Materiales y Métodos 6-.

Las figuras IV A-1 y IV A-2 muestran la variación de estos tres parámetros en cultivos de dos condiciones de irradiancia distintas (105 y 25  $J.m^{-2}seg^{-1}$ )

En todos los cultivos realizados se observó que en la evolución de los parámetros analizados se diferencian tres fases típicas del crecimiento bacteriano: latencia o "lag", crecimiento exponencial y "plateau" (89).

Las características observadas en cada fase y la definición operativa de éstas fueron las siguientes:

i- fase "lag". Se consideró esta fase como el período que medió entre la inoculación y el momento en el cual los distintos parámetros adquirieron un  $t_d$  constante. Durante esta fase se observaron variaciones significativas en el contenido de Bchl. Dependiendo de las condiciones de cultivo y del inóculo, este contenido disminuyó (para irradiancias de cultivo superiores - figura IV A-1) o aumentó (para irradiancias de cultivo inferiores - figura IV A-2) hasta alcanzar una relación con la  $DO_{680}$  característica para cada irradiancia; es decir, que el crecimiento exponencial comenzó recién cuando las células hubieron adquirido un determinado contenido específico de Bchl.

ii- fase exponencial. Los parámetros medidos no comenzaron ni finalizaron simultáneamente su variación exponencial; y además, durante esta fase las velocidades específicas de duplicación ( $\mu$ ) de cada uno fueron distintas. Para el cálculo de la  $\mu$  característica de cada parámetro durante esta fase, sólo se consideraron aquellos cultivos en los cuales la fase exponencial se mantuvo por lo menos por tres generaciones, es decir que el parámetro en cuestión hubiera aumentado 8 veces sin variar significativamente su  $\mu$ . Este cálculo se realizó con distinto margen de error para los distintos parámetros: para la  $DO_{680}$  y el contenido de Bchl fueron determinados con mayor precisión, mientras que  $\mu_{1015}$  se modifica leve, pero constantemente, a lo largo del crecimiento exponencial.

Esta modificación se debe a que ambos componentes de la  $DO_{1015}$  (el contenido de Bchl y la contribución de la turbidez a esa longitud de onda) varían con distinto  $t_d$  -ver Tabla IV-1- y se demuestra que la variación de un parámetro compuesto por dos factores que varían exponencialmente con distinta velocidad específica de duplicación ( $\mu$ ) no puede ser exponencial.

iii- "plateau": se verificó que los parámetros medidos abandonaron el crecimiento exponencial a tiempos distintos; en general, primero la turbidez, lo que indica que aunque las bacterias hayan cesado de multiplicarse, continua modificándose su contenido específico de Bchl.

### **A2- Variación de los parámetros del crecimiento con la irradiancia:**

Fueron realizados cultivos estáticos a distintas irradiancias; en cada uno de ellos fueron calculados: el contenido específico de Bchl en el momento de comenzar la fase de crecimiento exponencial, el  $t_d$  y la velocidad específica de duplicación ( $\mu = \ln 2/t_d$ ) en esta fase, de los tres parámetros medidos, y la  $DO_{680}$  en la cual los cultivos alcanzaron el "plateau".

Estos valores se encuentran sumarizados en la Tabla IV-1.

Se observó que tanto la velocidad de duplicación de los parámetros (figura IV A-3) como el total de biomasa producida al finalizar el cultivo (calculada como la turbidez del mismo en el "plateau", Tabla IV-1), aumentan con la irradiancia. Por lo tanto, puede afirmarse que, en el rango de irradiancias ensayado, ésta fue el factor limitante del crecimiento.

Debido a las diferencias de biomasa producida en el momento de finalización del crecimiento exponencial para las distintas irradiancias, la duración de esta fase, medida en tiempos de generación, varió de 2.5/3.0 para las irradiancias menores hasta 4.0/4.5 para las mayores.

### **A3- Variación del contenido específico de Bchl durante los cultivos:**

Según los estudios clásicos microbiológicos, "el tamaño de las células y el contenido celular son constantes durante la fase de crecimiento exponencial, por lo tanto se puede hablar de 'células estándar'. Sin embargo, en muchos casos, las células también sufren cambios durante esta fase en un cultivo estático, ya que el medio cambia: disminuye la concentración de sustratos, aumenta la densidad celular y se acumulan productos del metabolismo" (1).

Este es el caso de los cultivos realizados, ya que la diferencia señalada entre los  $t_d$ 's de Bchl y de biomasa indica que el contenido específico de Bchl cambia continua y gradualmente, aumentándolo a lo largo del crecimiento exponencial. Este enriquecimiento sostenido del contenido específico del pigmento se debe a la disminución de la irradiancia efectiva a la que están sometidas las células, ya que la propia multiplicación celular origina un proceso de 'autosombra'.

En la Tabla IV-1 se observa que el tiempo de duplicación del contenido de Bchl fue sensiblemente menor que el de la biomasa, para todas las irradiancias, indicando un aumento en el contenido específico de Bchl de las células durante el cultivo.

En algunos cultivos fueron medidos, a distintos tiempos, el contenido de Bchl (por extracción con solvente) y el de proteínas (método de Lowry); observándose una estrecha correlación con las mediciones directas sobre el cultivo ( $DO_{1015} = 0.468 DO_{680}$  y  $DO_{680}$  respectivamente).

De esta manera se observó que el aumento del contenido específico de Bchl durante un mismo cultivo (más precisamente durante la fase de crecimiento exponencial) ocurre también en forma exponencial. Ello se debe a que ambos parámetros de los que depende (contenido de Bchl y biomasa) crecen exponencialmente pero con distintos valores de velocidad de duplicación; y se demuestra que la relación entre ambos debe variar también exponencialmente, pero con una velocidad específica ( $\mu_{ce}$ ) dependiente de las antedichas, según la expresión:

$\mu_{ce} = \mu_B - \mu_{680}$ , donde  $\mu_B$  es la velocidad específica de duplicación del contenido de Bchl del cultivo y  $\mu_{680}$  la de la  $DO_{680}$ .

Los valores de velocidad específica de duplicación del contenido específico de Bchl calculados de esta manera concuerdan significativamente con los obtenidos mediante análisis gráfico y computacional de dicha relación punto a punto.

Según los valores calculados para los distintos cultivos, el contenido específico de Bchl aumenta desde casi un 10 % por cada duplicación de la biomasa, para los cultivos de menores irradiancias, hasta un 52% para los de mayores.

#### **A4- Variación del contenido específico de Bchl con la irradiancia:**

El contenido específico de Bchl indicado en la Tabla IV-1 corresponde al momento en el cual los respectivos cultivos se encontraban a una  $DO_{680}=0.3$ . Se eligió esta turbidez debido a que en ella todos los cultivos habían iniciado ya su crecimiento exponencial, habiéndose duplicado no menos de una ni más de dos veces.

En la Tabla IV-1 y en la figura IV A-4 se observa la importancia de la variación del contenido específico de Bchl con la irradiancia: disminuye 9 veces en el rango estudiado.

Por lo tanto, esta variación es más significativa que la que ocurre durante un mismo cultivo y fue analizada previamente. Para que un cultivo de irradiancia máxima aumente 9 veces su contenido específico de Bchl deben transcurrir 6 generaciones (es decir, aumentar 64 veces su biomasa) manteniendo constante su velocidad específica de duplicación del contenido específico de Bchl (52 % por cada generación).

Esto no ocurre debido a dos razones: i- ninguno de los cultivos realizados mantuvo su crecimiento exponencial por más de 5 generaciones, y ii- a medida que el cultivo crece, la velocidad específica de duplicación del contenido específico de Bchl disminuye.

#### A5- Variación de la velocidad de crecimiento con la irradiancia:

Todo crecimiento biológico puede ser considerado como el producto de un proceso de transducción de energía (52,55).

Los microorganismos fotosintéticos catalizan la transformación de un sustrato (irradiancia) para producir biomasa con una determinada velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{680}$ ) (58).

La constancia, reproducibilidad y concordancia de estas velocidades verificadas en los distintos cultivos y mediante los distintos métodos de análisis indican que existe una fase bien definida de los mismos en la cual la biomasa aumenta exponencialmente.

Por lo tanto, se puede afirmar que la energía transducida por unidad de biomasa -sustrato para su producción- se mantiene constante durante el crecimiento exponencial, en cada una de las irradiancias ensayadas. Esto ocurre a pesar del proceso de 'autosombra' provocado por el propio crecimiento, que disminuye la irradiancia efectiva durante el cultivo.

Por otro lado, se verifica la modificación del STE debida al enriquecimiento en Bchl analizado previamente. Este enriquecimiento sería, precisamente, el encargado de dar cuenta de esta aparente paradoja.

Es importante remarcar que en todos los cultivos incluidos en la Tabla IV-1, el incremento exponencial de biomasa ( $\mu_{680}$  constante) se mantuvo durante por lo menos 2.5 generaciones.

En la figura IV A-3 se observa la dependencia de dicha velocidad con la irradiancia. Se puede afirmar que, en el rango de irradiancias estudiado, la velocidad específica de crecimiento aumenta linealmente según la siguiente expresión:

$$\mu_{680} = m \cdot I + b,$$

siendo I, la irradiancia y el coeficiente y factor:  $b = 0.052 \text{ h}^{-1}$  y  $m = 6.5 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1} \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{seg}$ ,

Según esto, podría afirmarse que el proceso de transducción de energía sigue una cinética de primer orden (con ordenada al origen distinta de cero) con respecto a la irradiancia como sustrato. La interpretación de este valor de  $b$  no es clara: podría considerarse como la velocidad de crecimiento en ausencia de luz y a expensas de oxidaciones de compuestos del medio; es decir, algo así como el nivel umbral del metabolismo quimiótrofo.

Es necesario tener en cuenta que *Rps. viridis* si bien fotótrofo, no es un organismo autótrofo; es decir, requiere para aumentar su biomasa de compuestos carbonados con cierto grado de reducción ya que no puede fijar  $\text{CO}_2$ . Pero podría, como lo hacen otros miembros de la familia Rhodospirillaceae crecer a expensas de los compuestos carbonados del medio (succinato, glutamato y acetato) contando con un aceptor de electrones apropiado.

Esta interpretación parece ser bastante improbable debido a 2 razones:

i- no se detectó nunca crecimiento de *Rps. viridis* en oscuridad (ni en aerobiosis ni en anaerobiosis), y

ii- *Rps. viridis* está reportada como una bacteria anaerobia estricta (67,68,72,91). La experiencia acumulada durante los cultivos realizados y ciertas ocasiones donde se aislaron clones confirman esto: recién se verificó crecimiento cuando fueron logradas estrictas condiciones de anaerobiosis.

Por lo tanto, la variación de la velocidad específica de crecimiento graficada en la figura IV A-3 representa mas bien la resultante de la transducción de energía por parte de distintos STE y del aprovechamiento de esta energía por la maquinaria biosintética; cada uno de ellos (tanto el STE como la maquinaria biosintética) correspondiente a una determinada irradiancia y por lo tanto, muy posiblemente distintos.

Entonces, la explicación de la ordenada al origen de dicho gráfico sería, muy probablemente, que a cada irradiancia específica se sintetiza un determinado STE de cuya cinética de transducción con respecto a la irradiancia (como sustrato) sólo puede averiguarse un punto mediante este análisis: el correspondiente a su propia irradiancia de cultivo, ya que cualquier variación en ésta se traduce en una adaptación que modifica la composición del sistema.

#### **A6- Cambios en la irradiancia de cultivo:**

Una manera de estudiar la capacidad de transducir energía de los distintos STE es realizar cambios en la irradiancia de cultivo y analizar su capacidad de producción de biomasa. Es importante tener en cuenta las limitaciones de esta metodología:

i- inmediatamente de cambiar la irradiancia de cultivo comienza a modificarse el contenido específico de Bchl de manera distinta a la que lo hace un cultivo de irradiancia incedente constante. Esto indica que apenas producido el cambio, el STE comienza a variar. Por lo tanto, en este tipo de análisis, sólo se tuvo en cuenta lo acontecido en un lapso no mayor que la mitad del menor  $t_d$  (el del contenido de Bchl si el cambio era de alta a baja irradiancia o el de biomasa en caso contrario, ver figuras IV A-2 y IV A-5).

ii- la velocidad de producción de biomasa ( $\mu_{680}$ ) es un buen método para la estimación de la energía transducida, siempre y cuando el microorganismo se encuentre creciendo exponencialmente; es decir, que los flujos de masa y energía se encuentren, a través de su metabolismo, en un estado estacionario (55-58).

Por el contrario, un cambio en el medio que requiera alguna adaptación del microorganismo, necesariamente modificará los flujos internos de masa y/o energía, y por lo tanto, también en la partición entre la energía para el crecimiento y para mantenimiento (52). Por consiguiente, pierde validez en estas situaciones la estimación de la energía transducida a través de la velocidad de producción de biomasa.

Teniendo en cuenta estas limitaciones y con el fin de estudiar el tipo y velocidad de respuesta, fueron realizados cambios en las condiciones de irradiancia de los cultivos.

La figura IV A-2 muestra el efecto de un cambio de condiciones de baja a alta irradiancia: un cultivo de  $25 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , al final de su fase exponencial, fue sometido a  $120 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , retomando el crecimiento exponencial.

En todas las experiencias de cambios de irradiancia en este sentido (de bajas a altas), se verificó un inmediato incremento de la biomasa, mientras que la síntesis de Bchl se detuvo completamente (o por lo menos su acumulación neta en el cultivo). El incremento de la  $\text{DO}_{1015}$ , en estas condiciones, reflejó exclusivamente el del componente de la turbidez a esa longitud de onda.

El incremento en la  $\mu_{680}$  verificado ante el cambio de irradiancia dependió de los valores inicial y final de ésta. Es importante destacar que la  $\mu_{680}$  alcanzada inmediatamente después del cambio no se modificó hasta el final del cultivo, ni aún cuando hubo sido alcanzado el contenido específico de Bchl característico para esa irradiancia, y por lo tanto, el contenido de Bchl del cultivo hubo retomado el incremento exponencial.

Dicho valor de  $\mu_{680}$  fue el mismo que el de los cultivos adaptados a esas condiciones de irradiancia (Tabla IV-1). Es decir que, comparando entre ambos cultivos, a pesar de poseer contenidos específicos de Bchl notoriamente distintos, incluso con distinto 'pattern' de variación entre ellos, ambas velocidades de producción de biomasa son iguales.

Debido a lo dicho anteriormente, nada puede afirmarse acerca de la cantidad de energía transducida en cada caso. El supuesto de que ésta sea semejante en ambos casos (como la velocidad de formación de biomasa), indicaría que la eficiencia por mol de Bchl de los distintos STE aumenta con la irradiancia a la cual fueron originados.

Con respecto al tiempo durante el cual se mantuvo constante el contenido de Bchl del cultivo después de un cambio, dependió también de las irradiancias inicial y final, o más precisamente de la diferencia entre los contenidos específicos de Bchl característicos de cada una de ellas. Es así como en la experiencia graficada en la figura IV A-2, se verificó que en 45 horas, lapso en el cual la biomasa ( $DO_{680}$ ) aumentó a poco más del doble, el contenido de Bchl del cultivo aumentó menos del 20 % y por lo tanto el contenido específico de Bchl (calculado como la relación  $DO_{1015} - 0.468 DO_{680} / DO_{680}$ ) disminuyó al 58 % del inicial.

Por otro lado, cuando un cultivo es cambiado de alta a baja irradiancia, la variación de la biomasa se detiene abruptamente, mientras que el contenido de Bchl aumenta a una velocidad aún mayor que la de las condiciones previas (figura IV A-5). Por lo tanto se puede afirmar que, a pesar de no existir división celular, tiene lugar el proceso de transducción de energía.

No se puede precisar claramente si la cantidad de energía transducida varía significativamente, ya que, como se discutió previamente, el indicador utilizado, la producción de biomasa, sólo es útil durante la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, se puede afirmar que evidentemente existe/n paso/s regulatorio/s dependiente/s de la irradiancia en la maquinaria biosintética celular para el flujo de la energía transducida; el/los que privilegiaría/n en estas circunstancias, la síntesis de Bchl y/o otros componentes del STE sobre la división celular.

#### A7- Velocidad de crecimiento relativa al contenido específico de Bchl:

Se ha demostrado que el tamaño de la unidad fotosintética (UF -contenido de Bchl de complejos antena relativo a la cantidad de CR-) de *Rps. viridis* se mantiene invariable para un amplio rango de irradiancias (85).

En cambio, para otras bacterias de la misma especie (*Rps. capsulata* y *Rps. sphaeroides*) se han descrito 2 tipos de complejos antena: uno, el B870, mantiene una relación constante con el CR, mientras que el otro, el B800-850, varía su contenido dependiendo de la irradiancia de cultivo (86). Esta variación en el tamaño de la UF permitiría modificar la eficiencia de absorción de fotones, optimizando el STE para diferentes irradiancias.

Por otro lado, en membranas de *Rps. viridis* crecido a distintas irradiancias se verificaron diferentes ordenamientos de complejos pigmento-proteína (85,87). Dichos ordenamientos podrían modificar los eventos primarios de la captación lumínica, como el tiempo medio de excitación o la velocidad de transferencia de la misma, variando de esta manera la eficiencia del proceso de transducción de energía en su conjunto.

Sin embargo, estos cambios en el ordenamiento se verifican a irradiancias saturantes para el crecimiento, como se evidencia en el  $t_d$  constante reportado para estos cultivos (87); mientras que para el rango de irradiancias limitantes del crecimiento, como las verificadas en los presentes experimentos, el ordenamiento hexagonal de los complejos sobre la superficie de la membrana aparenta no cambiar sustancialmente (85).

La figura IV A-6 muestra la dependencia con la irradiancia de la velocidad específica de duplicación de la biomasa relativa al contenido de Bchl del cultivo ( $\mu_{680}$  relativa). La figura IV A-7 muestra la variación del mismo parámetro en escala logarítmica.

Debido a que el tamaño de la UF se mantiene constante en *Rps. viridis* el contenido específico de Bchl representa directamente el de CR. Por lo tanto este parámetro ( $\mu_{680}$  relativa), calculado a partir de los valores de  $\mu_{680}$  y contenido específico de Bchl presentados en la Tabla IV-1, representa la velocidad específica de duplicación de biomasa estandarizada a igual contenido de CR de los cultivos. Es decir, representa el aporte que haría cada UF (o CR, directamente) de los distintos STE a la velocidad específica de crecimiento.

El STE involucra, esquemáticamente, 3 procesos: captación de luz, transporte de electrones, y síntesis de ATP. Al mantenerse invariable la UF -responsable del primer proceso-, puede interpretarse que las figuras IV A-6 y IV A-7 representan, en realidad, la variación exponencial con la irradiancia de, o bien:

- i- la capacidad de cada UF para captar energía lumínica; o,
- ii- la capacidad del resto de las etapas del proceso de transducción para procesar la energía captada por cada UF.

Estas posibilidades, extremas tal como están planteadas, no necesariamente son excluyentes; pudiendo verificarse ambas en distinto grado y resignando parcialmente alguno de sus supuestos. Así, por ejemplo, la primera es válida siempre y cuando el resto de las etapas involucradas en el proceso de transducción (transporte de electrones y síntesis de ATP) no varíen en absoluto sus parámetros cinéticos con la irradiancia, ni se conviertan en limitantes para procesar la energía captada.

### A8- Energía disponible por el cultivo:

Otra manera de analizar la eficiencia de la transducción de energía es considerar el cultivo como un todo; según esto, el crecimiento depende de la velocidad de captación de energía lumínica por parte del mismo. Este parámetro puede ser definido como el producto entre la irradiancia y el contenido específico de Bchl, y representa la cantidad de energía radiante disponible para ser transducida por unidad de  $DO_{680}$  y por unidad de tiempo (sustrato efectivo para la transducción de energía).

Debido a que la irradiancia determina el contenido específico de Bchl, también regula la energía disponible. La figura IV A-8 muestra que, para estas condiciones experimentales, la energía disponible por unidad de masa celular alcanza un máximo a irradiancias cercanas a  $75 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , disminuyendo de manera semejante para irradiancias tanto superiores como inferiores.

Para ser estrictos, y según este razonamiento, la velocidad de producción de biomasa debe ser estudiada en función de este parámetro. Esto establece una evidente paradoja: si bien la velocidad específica de duplicación aumenta sostenidamente durante todo el rango de irradiancias ensayado, la energía disponible -dependiente del contenido de Bchl del cultivo- sólo lo hace para irradiancias menores que  $75 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , mientras que para irradiancias mayores disminuye.

De ello pueden extraerse importantes apreciaciones sobre el significado de la regulación del contenido específico de Bchl en la adaptación de las células a la irradiancia:

- en el rango de  $0 - 75 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , la disminución del contenido específico de Bchl es, relativamente, poco importante ya que la energía disponible aumenta proporcionalmente con la irradiancia y, por otro lado, el aumento de  $\mu_{680}$  relativa a este contenido es, comparativamente, menos significativa que a irradiancias superiores ( figura IV A-7).

- mientras que, para irradiancias superiores a  $75 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  la disminución del contenido específico de Bchl del cultivo provoca que éste disponga de una menor cantidad de energía, aunque, y pese a ello, la  $\mu_{680}$  relativa aumenta en este rango de manera más importante ( figura IV A-7).

**\* TABLA IV-1:**

Valores de los principales parámetros de crecimiento y del contenido celular de cultivos estáticos a diferentes regímenes de irradiancia.

Irradiancia $J.m^{-2}.seg$	$t_d$ $DO_{680}$ h	$t_d$ $DO_{1015}$ h	$t_d$ Bchl h	Contenido esp. Bchl	$DO_{680}$ "plateau"
10	11.54	10.76	9.52	8.58	0.70
25	9.74	9.27	8.21	8.37	1.00
50	8.51	8.02	6.73	6.68	1.50
75	7.02	6.52	5.01	5.25	2.50
80	6.75	5.96	4.52	4.86	2.60
95	6.00	5.47	4.08	2.94	2.60
100	5.94	5.42	3.91	2.47	2.70
105	5.73	5.42	3.54	2.29	3.00
110	5.73	5.21	3.28	1.82	3.00
120	5.17	5.08	2.85	1.17	3.00
125	5.12	5.08	2.87	1.09	2.90
135	4.92	4.88	2.83	0.96	3.10

$t_d$ : tiempo de duplicación, expresado en horas, obtenido a partir de entre uno y cinco cultivos para cada irradiancia, por métodos gráfico y analítico.

El contenido específico de Bchl está expresado en  $\mu g$  Bchl/mg proteína y corresponde al momento en el cual la  $DO_{680}$  del cultivo = 0.3.

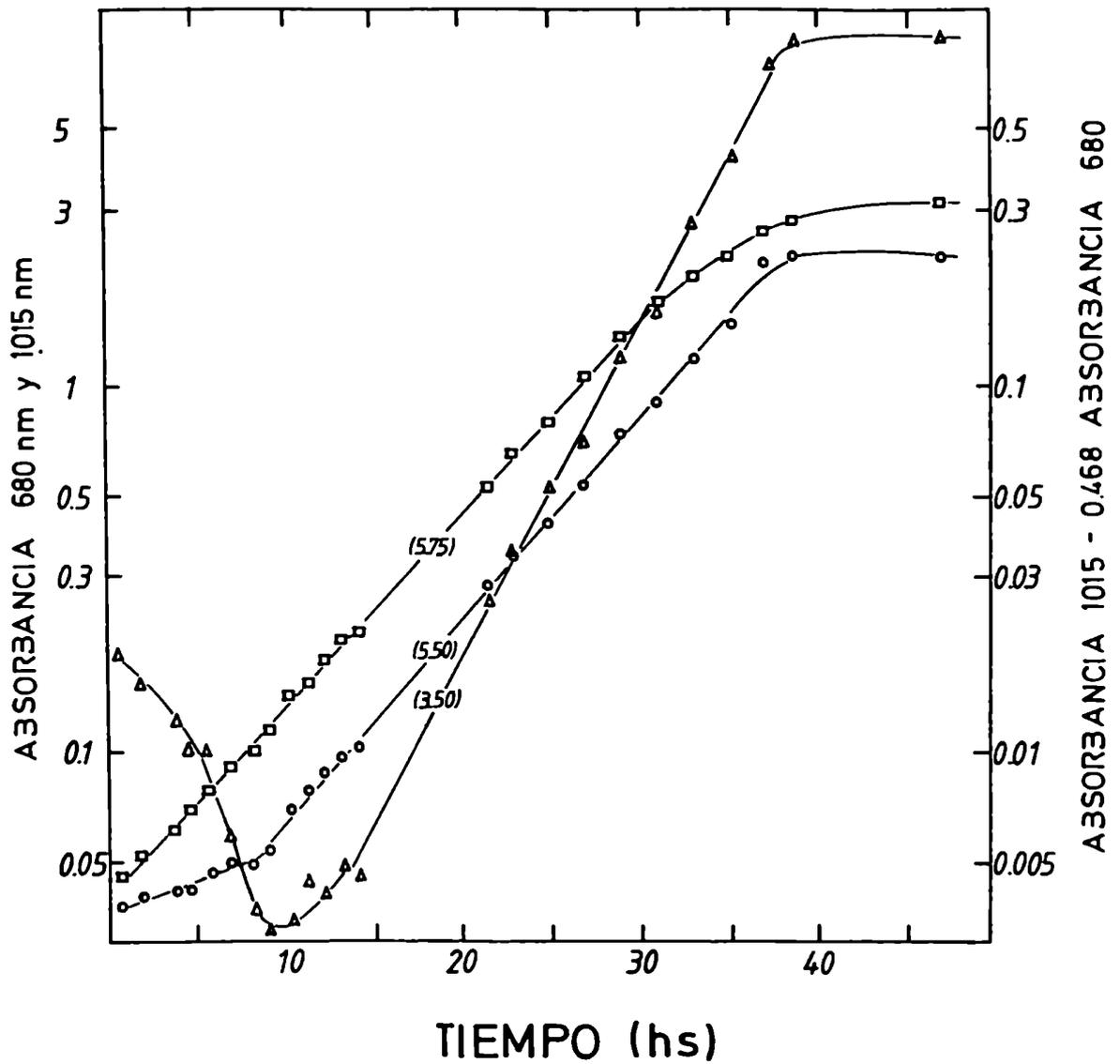
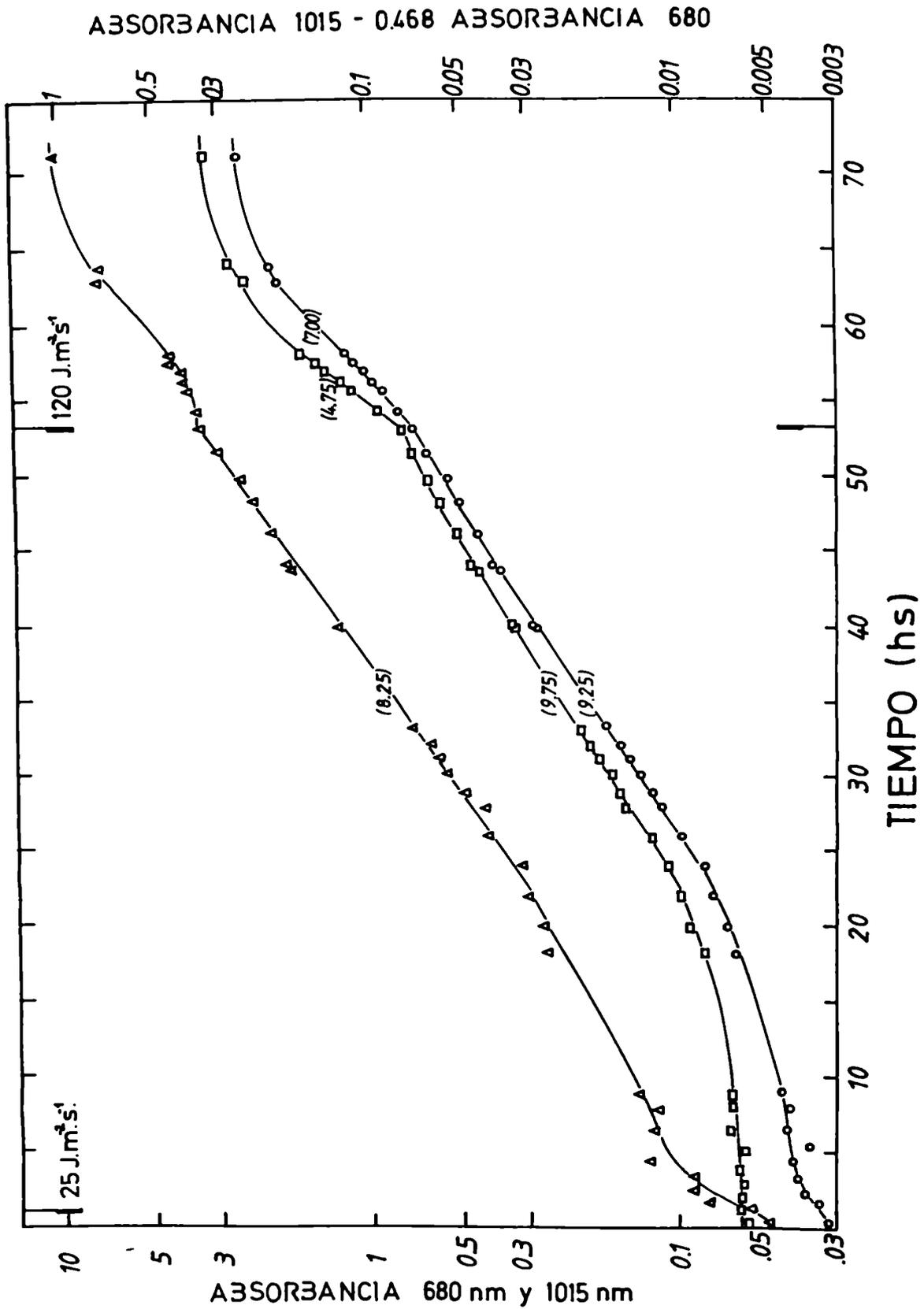
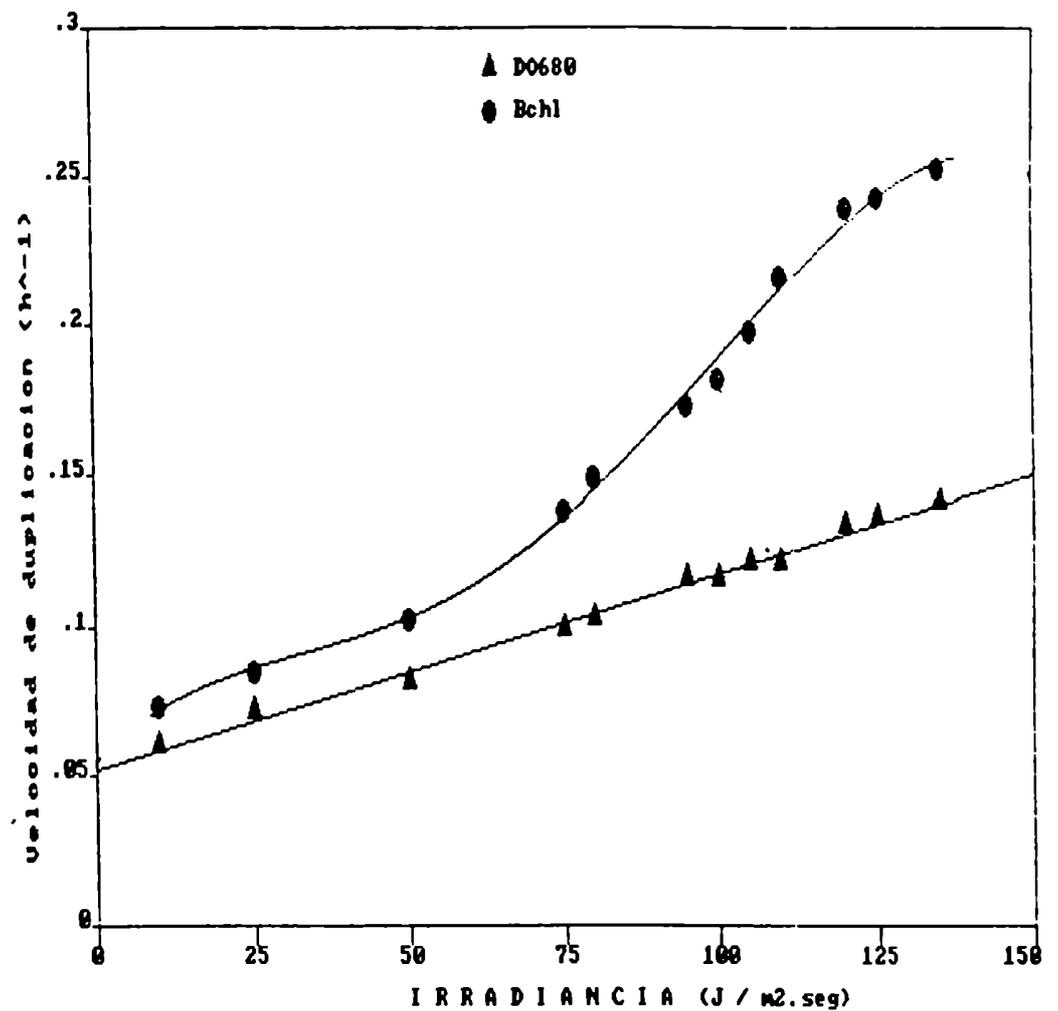


Figura IV A-1: Curva de crecimiento obtenida a  $105 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  (□)  $\text{DO}_{680}$ ; (○)  $\text{DO}_{1015}$ ; (Δ)  $\text{DO}_{1015} - 0.468 \text{ DO}_{680}$ . Los números entre paréntesis indican el  $t_d$ , en horas, calculado gráficamente.



**Figura IV A-2:** Curva de crecimiento obtenida a  $25 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  hasta las  $53^{\frac{30}{60}}$  horas, luego a  $120 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . ( $\square$ )  $\text{DO}_{680}$ ; ( $o$ )  $\text{DO}_{1015}$ ; ( $\Delta$ )  $\text{DO}_{1015} - 0.468 \text{ DO}_{680}$ . Los números entre paréntesis indican el  $t_d$ , en horas, calculado gráficamente.

FIGURA IVA - 3



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 5.205E-02) + ( 6.531E-04)*X$$

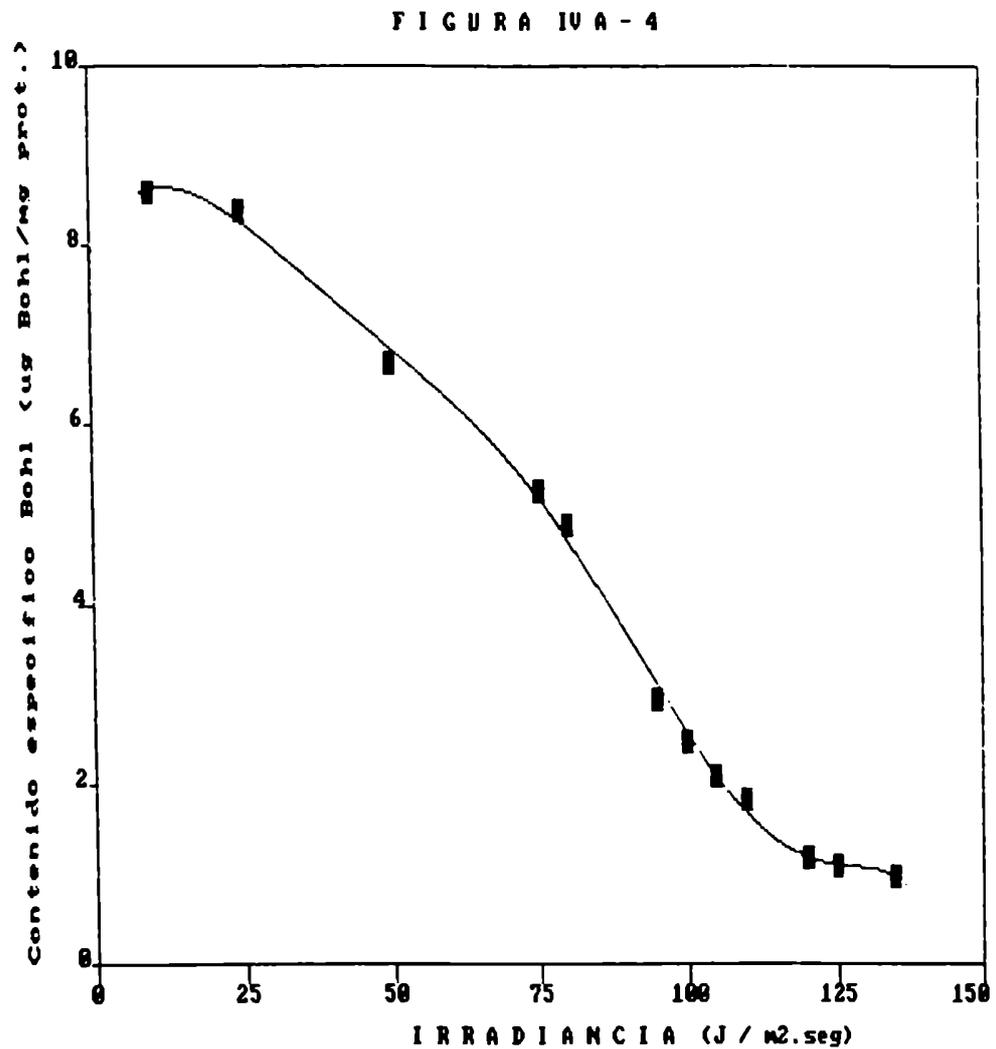
THE VARIANCE - 4.924E-06

THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 2 -

$$( 5.512E-02) + ( 3.259E-01)*X + (-1.207E+00)*X^2 + ( 2.433E+00) \\ + (-1.357E+00)*X^4$$

THE VARIANCE - 1.284E-05

**Figura IV A-3:** Variación de las velocidades de duplicación de biomasa (▲) y del contenido de Bchl (●), en función de la irradiancia de cultivo. Los valores de velocidad de duplicación fueron calculados a partir de los  $t_d$  de la Tabla IV-1.

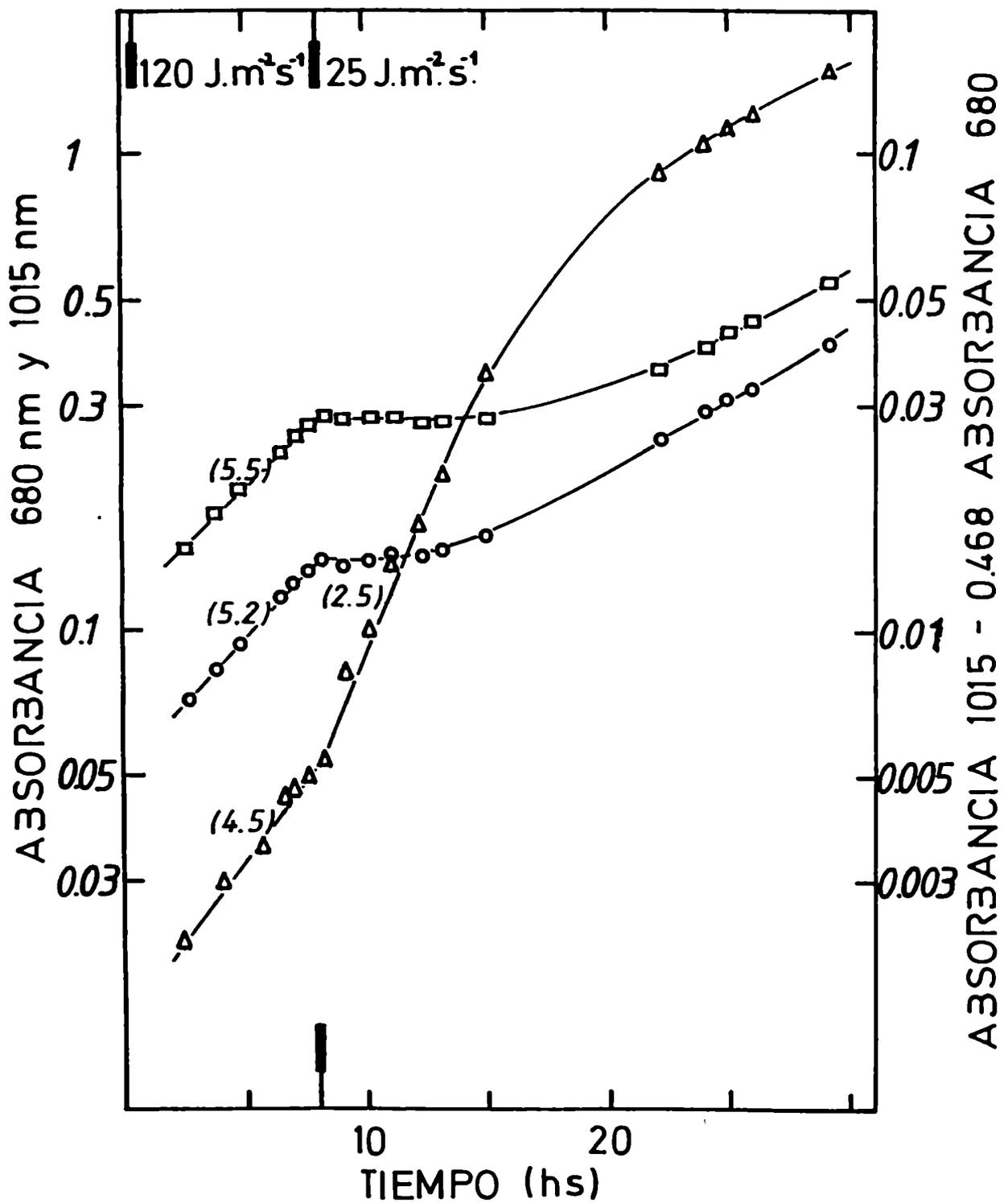


THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$\begin{aligned}
 & ( 7.922E+00) + ( 1.989E+01)*X + (-1.695E+02)*X^2 + ( 4.510E+02)*X^3 \\
 & + (-4.689E+02)*X^4 \\
 & + ( 4.694E+01)*X^5 + (-1.763E+02)*X^6 + ( 7.089E+02)*X^7 + (- \\
 & 23E+02)*X^8
 \end{aligned}$$

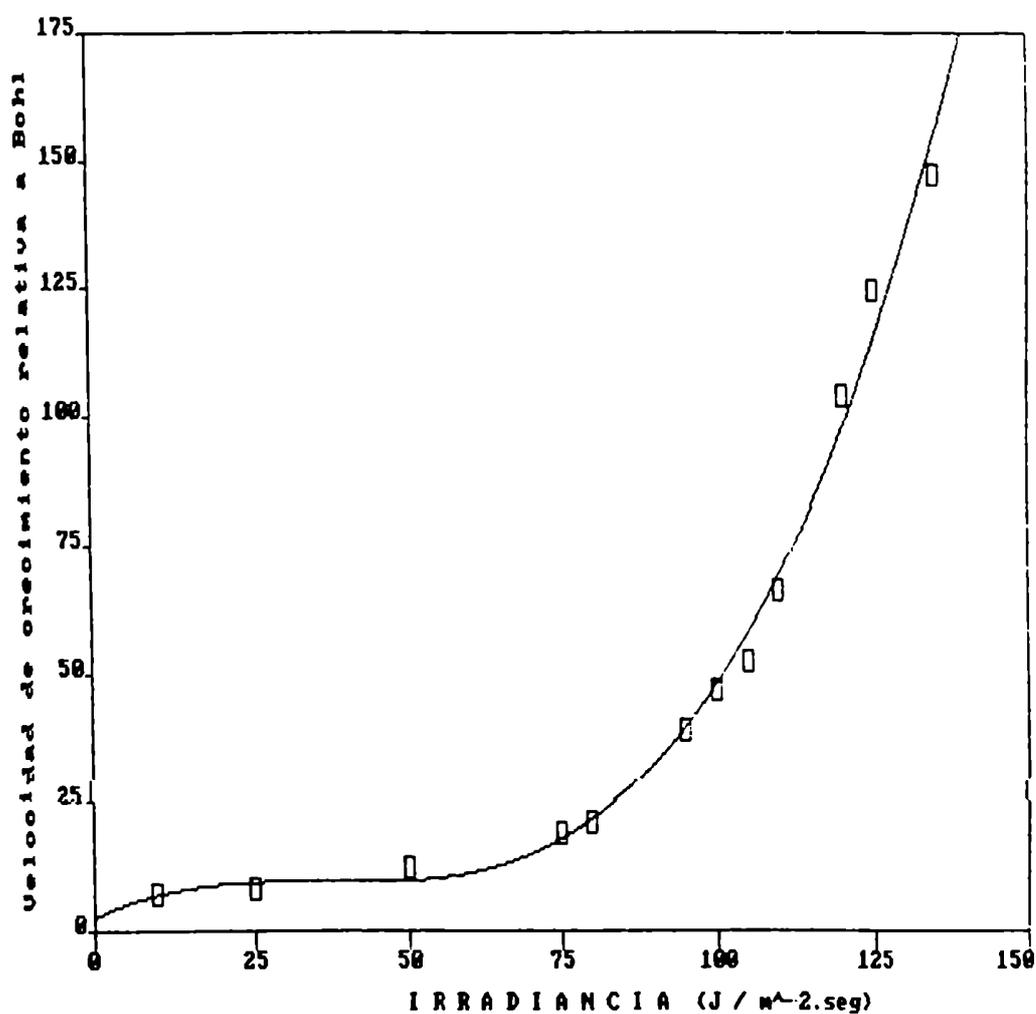
THE VARIANCE - 1.117E-02

**Figura IV A-4:** Variación del contenido específico de Bchl de las células en función de la irradiancia de cultivo. Los valores se corresponden con los presentados en la Tabla IV-1.



**Figura IV A-5:** Efecto de un cambio del régimen de irradiación. El cultivo, creciendo a  $120 \text{ J.m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ , fue sometido a  $25 \text{ J.m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ . (□)  $\text{DO}_{680}$ ; (o)  $\text{DO}_{1015}$ ; (Δ)  $\text{DO}_{1015} - 0.468 \text{ DO}_{680}$ . Los números entre paréntesis indican el  $t_d$ , en horas, calculado gráficamente.

FIGURA IVA-6



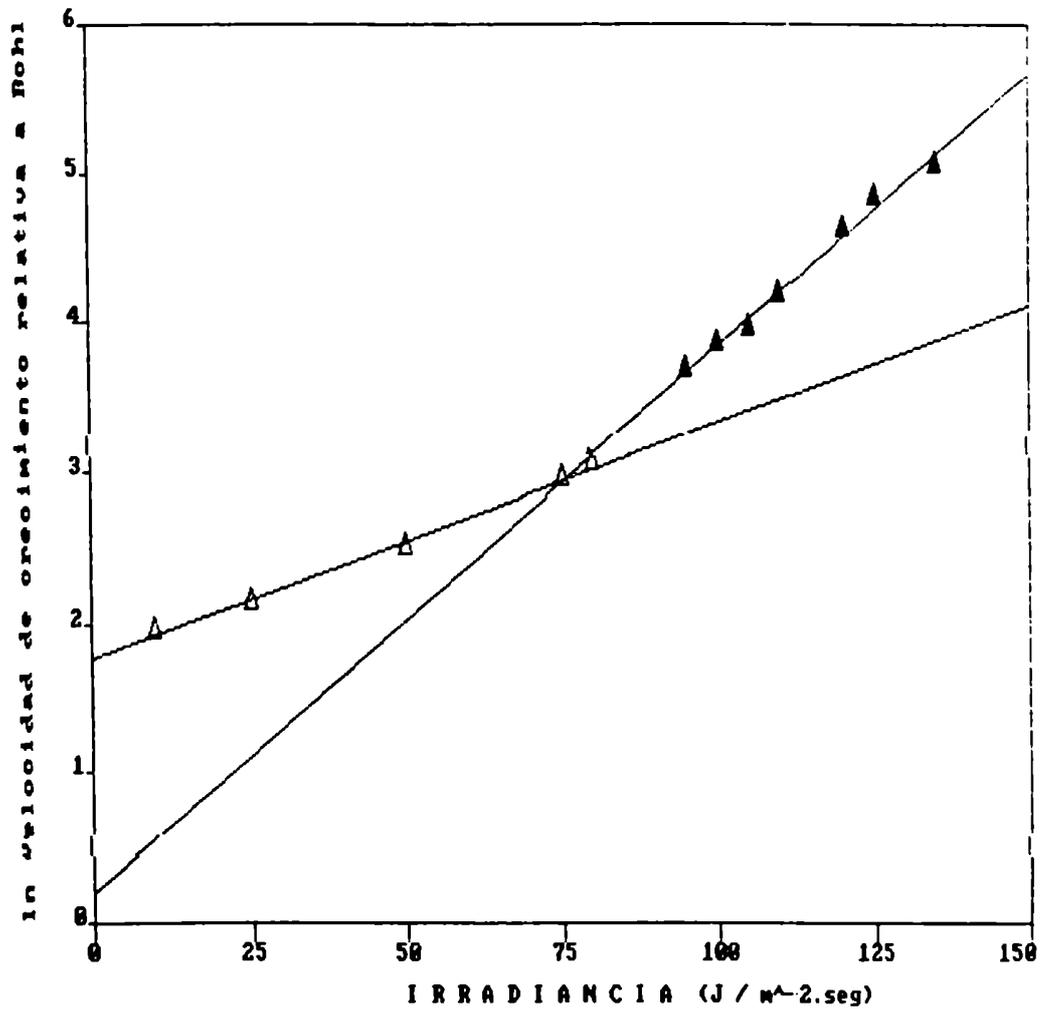
THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 2.617E+00) + ( 8.914E+01)*X + (-3.743E+02)*X^2 + ( 5.145E+02)*X$$

THE VARIANCE - 2.016E+01

**Figura IV A-6:** Velocidad de crecimiento relativa al contenido específico de Bchl en función del régimen de irradiación. El contenido específico de Bchl y la velocidad de crecimiento fueron calculados a partir de los datos de la Tabla IV-1. Este parámetro se encuentra expresado en  $h^{-1}.mg\ Bchl^{-1}.mg\ prot$

FIGURA IVA - 7.



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 1.761E+00) + ( 1.573E-02)*X$$

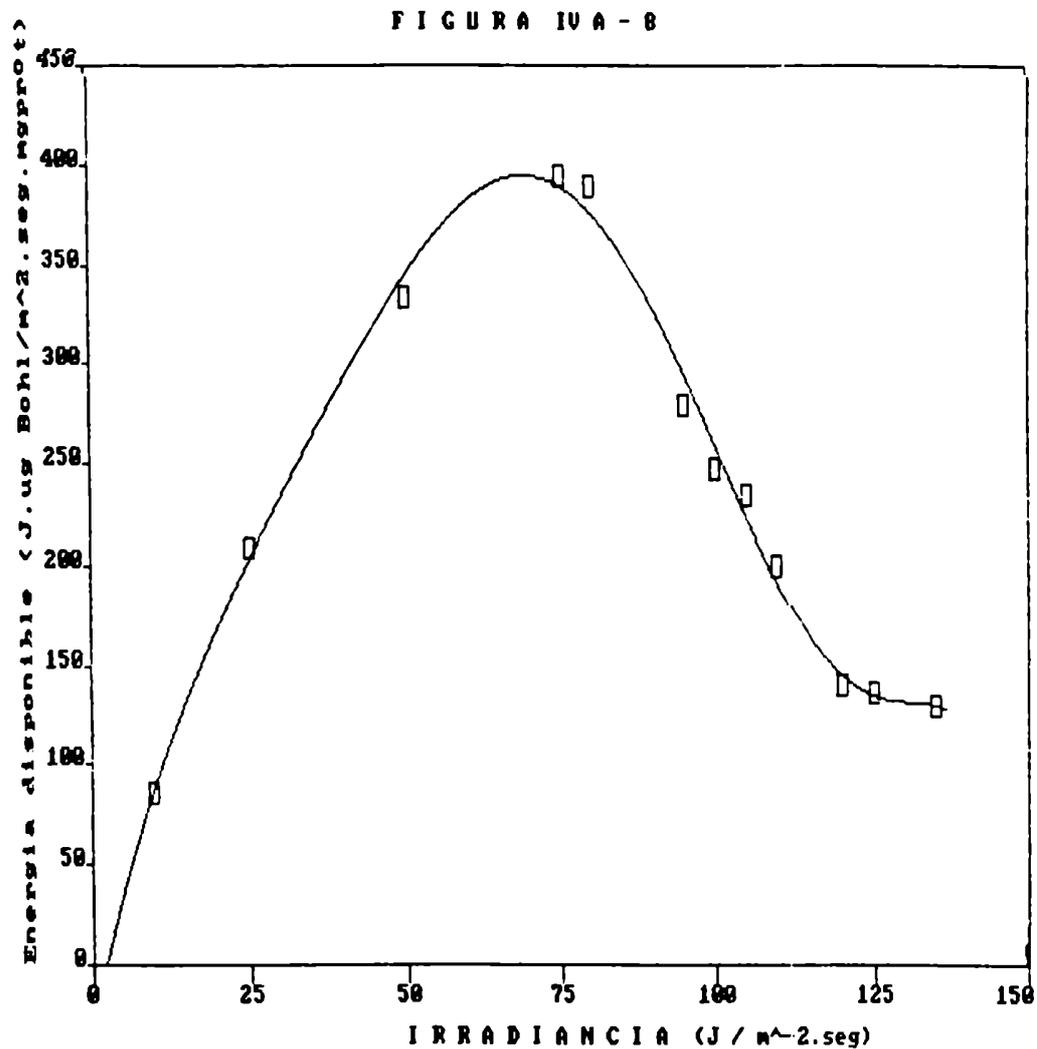
THE VARIANCE - 8.802E-04

THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 2 -

$$( 1.921E-01) + ( 3.649E-02)*X$$

THE VARIANCE - 2.492E-03

**Figura IV A-7:** Variación del logaritmo de la velocidad de crecimiento relativo al contenido específico de Bchl con la irradiancia. Los valores se corresponden con los de la figura anterior.



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$\begin{aligned}
 & (-2.741E+01) + (2.152E+03)*X + (-7.570E+03)*X^2 + (2.191E+04)*X^3 \\
 & (-2.595E+04)*X^4 \\
 & + (-6.997E+02)*X^5 + (-5.334E+03)*X^6 + (4.130E+04)*X^7 + (-2.79E+04)*X^8
 \end{aligned}$$

THE VARIANCE - 7.991E+01

**Figura IV A-8:** Energía disponible por unidad de masa celular en función de la irradiancia. La energía disponible fue calculada como el producto entre la irradiancia y el contenido específico de Bchl a partir de los datos de la Tabla IV-1.

#### **IV B- CONTENIDO Y ORGANIZACION DE MEMBRANAS INTERNAS:**

##### **B1- Influencia de la irradiancia sobre el crecimiento en cultivos continuos:**

Con el turbidostato descrito (Materiales y métodos 3c-) se realizaron cultivos continuos a distintas irradiancia, manteniendo la turbidez constante.

Luego de la inoculación, se dejó transcurrir el "lag" (tiempo de adaptación) y el comienzo de un cultivo estático hasta una  $DO_{680}$  de 1-1.5; momento en el cual los cultivos fueron diluidos con medio fresco hasta una  $DO_{680} = 0.25/0.30$  y se inició el cultivo continuo, durante el cual se mantuvo la densidad celular entre esos márgenes. Se procedió de esta manera con el objeto de: estandarizar las condiciones iniciales de los cultivos, obtener valores de la velocidad de duplicación por distintos métodos, y evitar inconvenientes por comenzarlos con células no adaptadas a la irradiancia de cultivo.

La duración de los cultivos continuos fue variable, entre 2 y 5 días, dependiendo de la irradiancia a la que fueron realizados. Esto se debió a que la cantidad de células (biomasa) requerida para obtener suficientes cromatóforos, como para realizar las mediciones enzimáticas analizadas en **IV C-**, depende de la irradiancia a la que fueron crecidas (puesto que el desarrollo de las MIC depende de ésta, como se analizó previamente).

La velocidad de crecimiento, para las distintas irradiancias, fue obtenida según 2 métodos (ver Materiales y métodos 6b-):

i- gráficamente, en el cultivo estático previo al desarrollo del cultivo continuo.

ii- por medio de la tasa de dilución (D) necesaria para mantener la turbidez constante durante el cultivo continuo.

Los valores obtenidos por ambos métodos guardaron una correlación muy estrecha. Se observó, sin embargo, que la velocidad de crecimiento obtenida para los cultivos estáticos fue siempre levemente mayor (2-5 %) que la obtenida en los cultivos continuos. Incluso en éstos se observó que la tasa de dilución, y por lo tanto la velocidad de crecimiento, disminuye con el tiempo del cultivo (80-90 % del valor inicial al 4º día).

La figura **IV B-1** muestra la dependencia de la velocidad de crecimiento con respecto a la irradiancia efectiva de cultivo; se observa que se alcanza un máximo (correspondiente a un  $t_d$  de 6.5 horas) entre 110 y 150  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ .

Tanto para irradiancias mayores, como para menores, la  $\mu$  disminuye llegando a valores, en ambas irradiancias extremas ensayadas, cercanos a la mitad del máximo (correspondientes a  $t_d$ 's de 12.5 - 13 horas).

Los valores de  $\mu$  obtenidos en estos cultivos en el rango de irradiancias menores (figura IV B-1) representan aproximadamente el 90 % de los calculados según la expresión lineal descrita (A5- y figura IV A-3) para los cultivos estáticos.

Esta diferencia puede deberse a una leve inhibición provocada por la continua provisión de medio fresco (55,58), lo que explicaría también la diferencia apuntada más arriba con los cultivos estáticos iniciales realizados en el turbidostato.

Al margen de esta diferencia, la variación de  $\mu$  es lineal con la irradiancia (figura IV B-1), en el rango en común en ambos tipos de cultivos.

Esta figura confirma que la irradiancia actúa como limitante del crecimiento a valores menores que 110-150  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ . Irradiancias superiores no sólo son saturantes del crecimiento, sino que inclusive presentarían un cierto efecto inhibitorio.

### B2- Organización y desarrollo del sistema de membranas internas (SMI):

Muestras de células de cultivos continuos a distintas irradiancias fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión.

Las figuras IV B-2 a IV B-4 muestran las micrografías obtenidas de células crecidas a tres irradiancias significativas en la variación de la velocidad específica de crecimiento.

La principal y notoria variación observada fue en el contenido y organización del SMI. Estas membranas internas se distinguen por su alto ordenamiento en capas paralelas, especialmente a bajas irradiancias de cultivo (24,25).

No fueron detectadas variaciones significativas con respecto al tamaño y/o forma celular.

En los distintos cortes observados el volumen celular ocupado por estas membranas internas disminuye del 40-45 % para las células de la menor irradiancia observada (17  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ ) al 15-20 % (para células de 106  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ ); porcentaje que disminuye, mucho menos significativamente, hasta 10-15 % en las células de la mayor irradiancia (950  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ ).

Esta disminución del SMI se correlaciona tanto con el decaimiento del contenido de cromatóforos calculado analíticamente como con el porcentaje de proteína celular componente de los mismos, ambos calculados más adelante (B3-).

Los apilamientos de membranas internas se encontraron paralelos a la membrana plasmática en la periferia celular, para todas las irradiancias de cultivo observadas.

En cuanto a la organización y grado de desarrollo de las membranas internas, fueron analizadas las siguientes características: disposición en las células, largo y número de capas en los apilamientos.

En las células de la menor irradiación observada ( $17 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ) los apilamientos ocupan la mayor parte de la periferia celular, compuestos por hasta 8-9 capas continuas (figura IV B-2). A medida que aumenta la irradiación de cultivo (hasta  $106 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ), disminuye principalmente el largo de las capas (ocupan menos del 30 % del perímetro celular). Sin embargo el número de capas disminuye menos significativamente (figura IV B-3)

A irradiaciones superiores se observaron disminuciones no sólo en el largo de los apilamientos sino también en el número de capas que los componen. Hasta llegar a diferenciarse éstos sólo en algunas células (menos del 15 % de las observadas), con 3 ó 4 capas como máximo, y de un largo menor que el 15 % del perímetro celular, para el caso de la máxima irradiación analizada ( $950 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , figura IV B-4).

### B3- Variación del contenido específico de Bchl de células y cromatóforos con la irradiación:

Se determinó el contenido proteico y de Bchl de células provenientes de cultivos continuos a diferentes irradiaciones, obteniéndose los resultados de la Tabla IV-2, en ella se observa que:

i- el contenido proteico de las células se mantiene prácticamente invariable en el rango de irradiación ensayado.

ii- el contenido de Bchl decae notoriamente con el aumento de la irradiación y,

iii- debido a lo dicho en i- y ii-: el contenido específico de Bchl decae de manera semejante al absoluto.

Con células provenientes de cultivos continuos a estas mismas irradiaciones se prepararon cromatóforos y se determinó su contenido específico de Bchl.

La figura IV B-5 representa la variación del contenido específico de Bchl en células y cromatóforos obtenidos a diferentes irradiaciones de cultivo.

Para estudiar si los decaimientos observados en esta figura ocurren de manera exponencial, es decir si responden a la siguiente ecuación:

$$f(x) = M \cdot e^{-kx}, \text{ se realizó el siguiente análisis:}$$

el decaimiento estudiado, es decir la disminución del contenido específico de Bchl en función de  $I$ , tendría que responder a la siguiente fórmula:

$$[\text{Bchl}]_i = B_0 \cdot e^{-k \cdot i}, \text{ donde:}$$

$[\text{Bchl}]_i$  : contenido específico de Bchl a una cierta irradiación  $i$ ,  $B_0$  : contenido específico de Bchl a  $i = 0$  (teórico, obtenido por extrapolación) y  $k$ : constante de decaimiento.

Por lo tanto, aplicando logaritmo:

$$\ln [Bchl]_i = \ln B_0 - k \cdot i$$

Se verifica que cuando  $i = \ln 2 / k$ ,  $[Bchl]_i = B_0/2$ , o lo que es semejante, cuando la irradiancia aumenta de  $I_1$  a  $I_2$  de forma tal que  $\Delta I (I_2 - I_1) =$

$= \ln 2/k$ , se verifica que  $[Bchl]_2 = [Bchl]_1/2$ , es decir el contenido específico de Bchl disminuye a la mitad.

Se define, "irradiancia de semi-decaimiento" ( $I_{sd}$ ) al valor obtenido:

$$I_{sd} = \ln 2 / k$$

En la figura IV B-6 se observa que el decaimiento del contenido específico de Bchl, tanto en células como cromatóforos, no ocurre según una única función exponencial; sino que asemeja responder a dos decaimientos exponenciales distintos, según el rango de irradiancia y con  $k$  notoriamente distintos.

Se puede observar también, que el cambio en la constante de decaimiento se dá, para ambos contenidos, a valores de irradiancia muy próximos (120 y 140  $J \cdot m^{-2} \cdot seg^{-1}$ ).

De la figura IV B-6 se obtienen los siguientes valores:

	rango de $I$ $J \cdot m^{-2} \cdot seg^{-1}$	$k$ $[J \cdot m^{-2} \cdot seg^{-1}]^{-1}$	$I_{sd}$ $J \cdot m^{-2} \cdot seg^{-1}$
Células	0 - 130	$1.60 \times 10^{-2}$	43.3
	130-950	$1.36 \times 10^{-3}$	509.7
Cromatóforos	0 - 130	$1.03 \times 10^{-2}$	67.3
	130-950	$1.38 \times 10^{-3}$	502.3

#### B4- Variación del contenido de cromatóforos con la irradiancia:

Asumiendo que la Bchl se encuentra exclusivamente en la fracción cromatofórica, el contenido específico de Bchl celular depende de dos factores:

- a- la cantidad de cromatóforos por célula
- b- el contenido específico de Bchl de éstos.

De los valores obtenidos de la figura IV B-6, se puede deducir que para irradiancias superiores a 130  $J \cdot m^{-2} \cdot seg^{-1}$  la cantidad de cromatóforos por célula se mantiene invariable; ya que la diferencia entre las constantes de decaimiento ( $1.36 \times 10^{-3}$  y  $1.38 \times 10^{-3}$ ) es sólo de 1.5 % y, por lo tanto, el decaimiento del contenido específico de Bchl de las células refleja exclusivamente el de los cromatóforos.

En cambio, en el rango de  $0 - 130 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , se dá un "doble juego" de la regulación del contenido específico de Bchl celular: por un lado, disminuye el contenido específico de Bchl de los cromatóforos, (lo que no explica *-per se-* el decaimiento en el contenido celular) y por el otro, varía la cantidad de cromatóforos por célula. Esta variación sólo fue reportada cualitativamente en ésta y otras bacterias (22,24,85,87,119) y se encuentra apoyada, también por las observaciones microscópicas analizadas previamente (B2-).

Se puede obtener una aproximación a la disminución del contenido de cromatóforos, descontando del decaimiento del contenido específico de Bchl celular el producido en los cromatóforos, se obtiene así una "constante de decaimiento" del contenido de cromatóforos ( $k_{CCR}$ ):

$$k_{CCR} = k_{BcI} - k_{BCr} = 1.60 \times 10^{-2} - 1.03 \times 10^{-2} = 5.7 \times 10^{-3}$$

siendo,  $k_{BcI}$  la constante de decaimiento del contenido específico de Bchl celular, y  $k_{BCr}$ : la del de cromatóforos; ambas obtenidas previamente (B3-).

Se obtuvo, también, la "irradiancia de semi-decaimiento" del contenido de cromatóforos,  $I_{sdCCR} = 121.6 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , a partir de este valor de  $k_{CCR}$

Se puede calcular entonces, la variación del contenido de cromatóforos con la irradiancia: en el rango de  $0 - 130 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  es de 2.1 veces, ya que decae al 47.7 % del contenido inicial; mientras que, como ya se demostró previamente, para irradiancias mayores que  $130 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  el contenido de cromatóforos se mantiene constante.

Estas conclusiones son coincidentes con los datos de porcentaje de proteína celular componente de los cromatóforos, obtenidos dividiendo el contenido específico de Bchl celular por el de cromatóforos (asumiendo también que la totalidad de la Bchl contenida en la célula se encuentra en los cromatóforos). Con este cálculo se obtiene que, entre 13 y  $106 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , el contenido de cromatóforos decae un 44% (de 0.52 a 0.29), mientras que con la  $k_{CCR}$  obtenida ( $5.7 \times 10^{-3}$ ) y para ese  $\Delta i$  ( $93 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ) el decaimiento teórico es del 42 %.

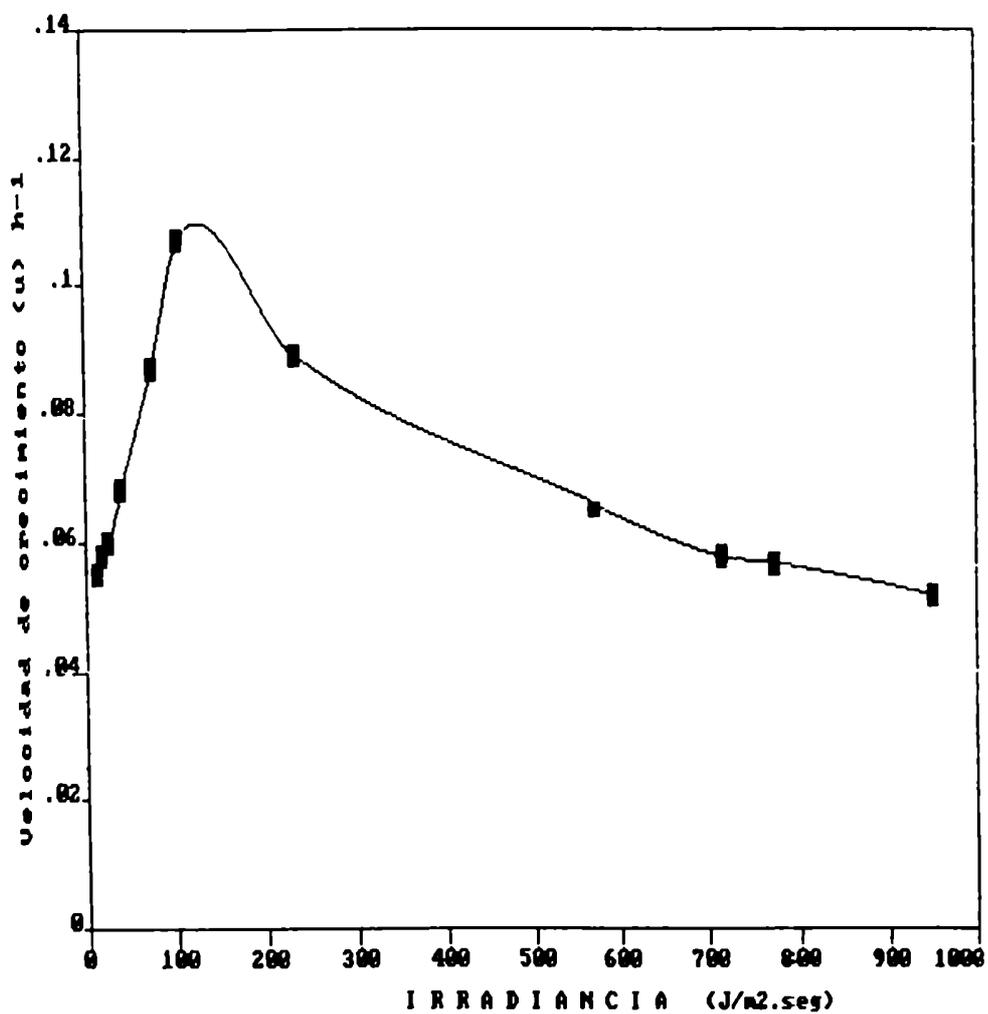
Con el cálculo propuesto de porcentaje de proteína celular componente de los cromatóforos, se observa también que, para irradiancias mayores de  $234 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , el contenido de cromatóforos se mantiene constante.

Es importante señalar que el rendimiento en la obtención de cromatóforos fue semejante en todo el rango de irradiancias ensayado (29-33 %, en masa de Bchl); teniendo en cuenta esto, quedan minimizadas las posibilidades de que las diferencias observadas se deban a distinta sensibilidad a la ruptura de las células y/o al enriquecimiento diferencial en alguna fracción durante la obtención de cromatóforos provenientes de distintas irradiancias.

**\* TABLA IV-2:**

Contenidos de proteínas y Bchl de células provenientes de cultivos continuos a distintos regimenes de irradiancia:

Irradiancia	Proteínas	Bchl	Bchl específica
$J.m^{-2}.seg^{-1}$	$\mu g \text{ prot.}$ $.ml^{-1}.UDO_{680}^{-1}$	$\mu g \text{ Bchl.}$ $.ml^{-1}.UDO_{680}^{-1}$	$\mu g \text{ Bchl.mg prot}^{-1}$
13	215	2.120	9.86
17	210	1.875	8.93
40	200	1.185	5.93
106	220	0.480	2.18
234	218	0.320	1.47
570	225	0.220	0.98
775	232	0.152	0.66
950	215	0.124	0.58



**Figura IV B-1:** Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) en función de la irradiancia del cultivo.  $\mu$  fue calculada a partir del valor de D (tasa de dilución) para cultivos continuos mantenidos a una densidad celular de 0.25/0.30 UDO<sub>680</sub>.



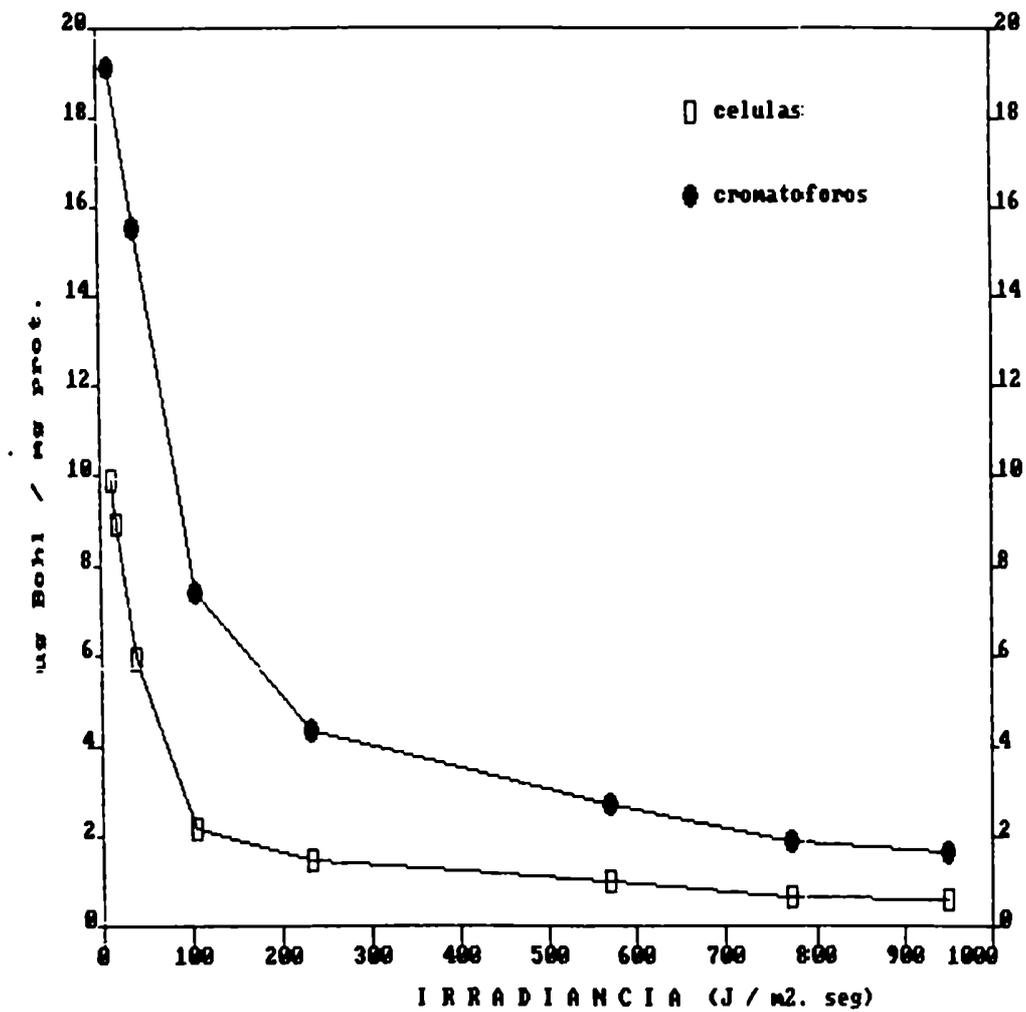
**Figura IV B-2:** Micrografía electrónica, por transmisión, de células crecidas en cultivo continuo a turbidez constante ( $DO_{680} = 0.25/0.30$ ) e irradiancia de  $17 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . Aumento 60000X.



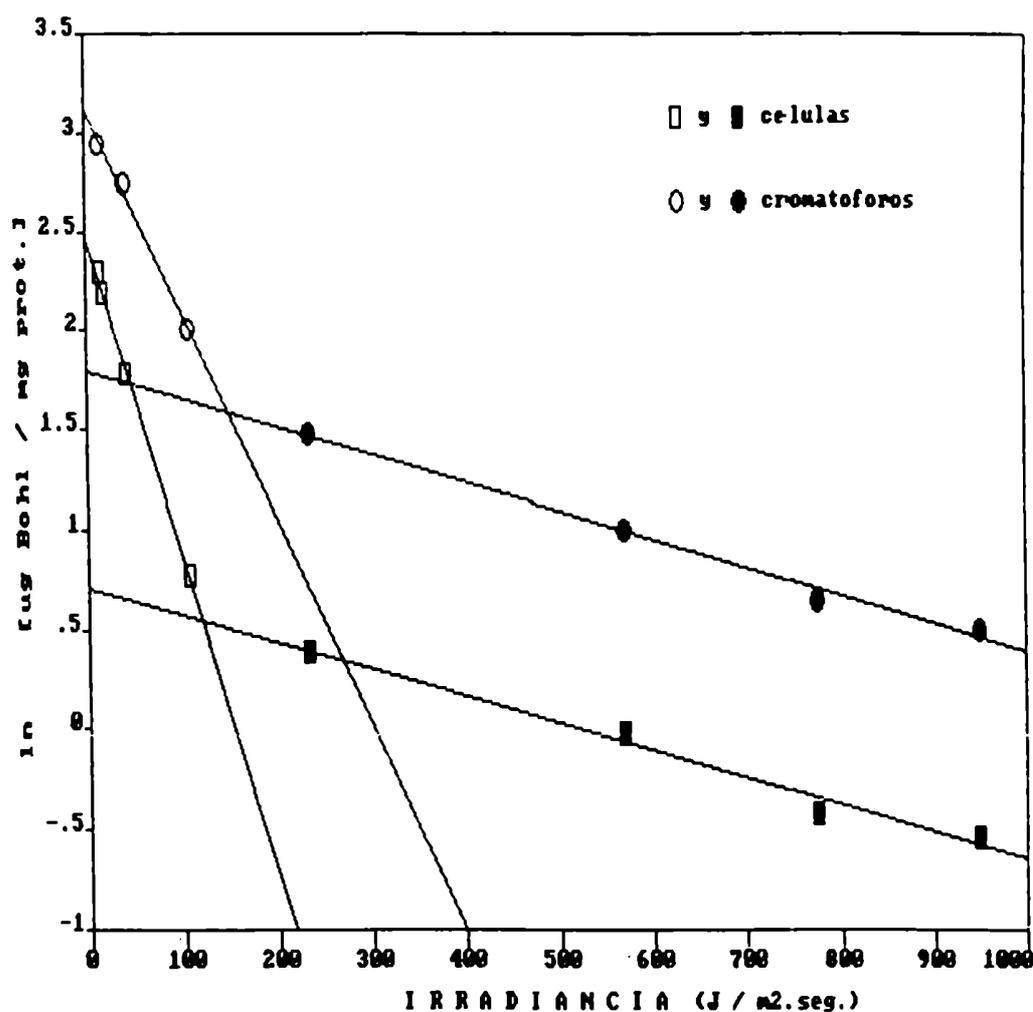
**Figura IV B-3:** Micrografía electrónica, por transmisión, de células crecidas en cultivo continuo a turbidez constante ( $DO_{680} = 0.25/0.30$ ) e irradiancia de  $106 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . Aumento 80000X.



**Figura IV B-4:** Micrografía electrónica, por transmisión, de células crecidas en cultivo continuo a turbidez constante ( $DO_{680} = 0.25/0.30$ ) e irradiancia de  $950 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . Aumento 80000X.



**Figura IV B-5:** Contenidos específicos de Bchl de células crecidas a diferentes irradiancias de cultivo y de cromatóforos obtenidos a partir de ellas. Los datos de las células se corresponden con los de la tabla IV-2.



THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 1 -

$$( 2.465E+00) + (-1.601E-02)*X$$

THE VARIANCE - 8.097E-04

THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 2 -

$$( 7.115E-01) + (-1.359E-03)*X$$

THE VARIANCE - 2.391E-03

THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 3 -

$$( 3.112E+00) + (-1.029E-02)*X$$

THE VARIANCE - 8.306E-04

THE REGRESSION POLYNOMIAL OF LINE 4 -

$$( 1.799E+00) + (-1.414E-03)*X$$

THE VARIANCE - 1.535E-03

**Figura IV B-6:** Decaimiento del contenido específico de Bchl en células y cromatóforos provenientes de distintas irradiancias. Los datos se corresponden con la figura IV B-5.

## **IV C- MEMBRANAS INTERNAS AISLADAS**

### **C1- Observación microscópica:**

Los cromatóforos obtenidos de células crecidas en cultivos continuos a distintas irradiancias fueron observados al microscopio electrónico de transmisión.

Se observó que éstos se encuentran mayoritariamente formando vesículas cerradas, aunque un porcentaje no despreciable (25-30 %) está presente como membranas abiertas. Este porcentaje no varió con la irradiancia de cultivo de las células de las que fueron obtenidos.

Sin embargo, en cromatóforos de células crecidas a irradiancias menores, se observó la presencia de membranas apiladas (figura IV C-1) y la inclusión de vesículas dentro de otras (figura IV C-2). Esto no fue observado en cromatóforos provenientes de irradiancias de cultivo mayores que  $106 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

Entre las distintas muestras de irradiancias menores, la frecuencia de observación de ambas estructuras disminuyó con el aumento de la irradiancia de cultivo.

Fueron observadas también, diferencias en cuanto al tamaño de las vesículas.

Para irradiancias de cultivo menores éste no fue homogéneo, variando gradualmente desde vesículas de tamaño semejante al celular hasta otras 6-7 veces menores en diámetro. Para irradiancias de cultivo mayores, todas las vesículas fueron del tamaño semejante al menor del caso anterior.

### **C2- Actividad ATP-ásica:**

Con los cromatóforos obtenidos de células crecidas en cultivos continuos a distintas irradiancias se ensayó la actividad ATPásica.

Como se observa en la figura IV C-3 el perfil de esta actividad en función de las condiciones de irradiancia del cultivo varía según a qué componente de los cromatóforos, proteína o Bchl, se la estandarice.

Esta variación es, en principio, obvia debido al decaimiento del contenido específico de Bchl de los cromatóforos analizado previamente (B3-). Sin embargo, ambas representaciones facilitan la extracción de ciertas conclusiones.

Se considera que la medición de actividad ATPásica cuantifica los complejos ATPasa funcionales hidrolíticamente, lo que no significa que sean activos en el proceso de síntesis, ya que para ello se requiere que se encuentren acoplados al sistema de transporte de electrones y éste a su vez al sistema de captación lumínica.

La actividad ATPásica fue ensayada a diferentes concentraciones de CCCP para evitar subestimaciones en su determinación, éstas pueden deberse a diferentes grados de acoplamiento en los cromatóforos provenientes de distintas irradiancias de cultivo.

Este compuesto es un inhibidor del STE, caracterizado como desacoplante ya que aumenta la permeabilidad de las membranas a los protones. Los desacoplantes inhiben la fosforilación, pues colapsan la formación de un gradiente de protones a través o dentro de la membrana transductora según las teorías vigentes del mecanismo de acoplamiento (125).

Debido a esto, los desacoplantes activan la reacción de hidrólisis de ATP, ya que inhiben la 'back pressure' de los protones bombeados al interior de la membrana por esta misma reacción (126). Por lo tanto, mediante la titulación de la actividad ATPásica a distintas concentraciones de desacoplante puede estudiarse el grado de acoplamiento de las membranas.

Se observó que el grado de acoplamiento de todas las preparaciones de cromatóforos fue el mismo, ya fueron semejantes tanto el perfil de titulación como la activación máxima (180-200 %), lograda a la misma concentración de CCCP (1  $\mu$ M).

Teniendo en cuenta esto, es posible afirmar que la curva de actividad ATPásica relativa al contenido proteico de la figura IV C-3 representa, de hecho, la variación del contenido específico de esta enzima en los cromatóforos sintetizados a distintas irradiancias.

Se puede observar que entre 120 y 140  $\text{J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  se encuentra un mínimo del contenido específico de esta enzima. Como se indicó en los capítulos anteriores (IV A- y IV B-), hasta esos valores, la irradiancia es el factor limitante del crecimiento y, en ellos, se verifica un importante cambio en la adaptación de los STE's.

La variación de la actividad ATPásica relativa al contenido de Bchl de los cromatóforos sintetizados a distintas irradiancias, mostrada en la misma figura, puede interpretarse también como la variación de la relación entre los contenidos específicos de ATPasa y de Bchl. Puede observarse que esta relación es casi invariable para irradiancias menores que 120  $\text{J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , para luego ir aumentándose gradualmente.

Se puede inferir entonces, que las síntesis de Bchl y ATPasa se encuentran acopladas hasta la irradiancia mencionada, ya que si bien en ese rango de irradiancias ambos contenidos específicos decaen (como se muestra en las figuras IV B-5 y IV C-3), lo hacen conjuntamente y en la misma proporción, manteniendo una relación estequiométrica constante.

Sin embargo, no es correcto inferir que la única causa del decaimiento de ambos contenidos específicos sea la disminución de ambas síntesis con el aumento de la irradiancia; ya que es posible que la membrana se enriquezca notoriamente en otras proteínas (transporte de electrones, por ej.).

El aumento en la relación ATPasa/Bchl verificado a irradiancias mayores que  $120 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  se debe tanto al decaimiento del contenido específico de Bchl (figura IV B-5) como al aumento del contenido específico de ATPasa (figura IV C -3) e indica que ambos componentes de la membrana han dejado de mantener una relación constante en ese rango de irradiancias.

Por lo tanto, se puede afirmar que, para irradiancias mayores que  $120 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , ambas síntesis se encuentran desacopladas: es lógico pensar tanto en la represión de la síntesis de Bchl a altas irradiancias, como en el aumento de la del complejo ATPasa, para poder utilizar una mayor cantidad de energía captada. La magnitud de las variaciones en ambas síntesis no puede ser inferida de los contenidos de ambos compuestos, debido a la influencia que sobre ellos puede tener la variación de otras proteínas componentes de la membrana.

### C3- Actividad de fotofosforilación (11p):

Se ensayó la actividad de fotofosforilación de los cromatóforos obtenidos de células crecidas a distintas irradiancias efectivas en cultivos continuos a turbidez constante; es decir, de los distintos STE's sintetizados en esas condiciones.

Dicha actividad fue medida a varias irradiancias como sustrato; ellas fueron: 100, 300, 600, 900 y  $1800 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  para todas las preparaciones; además, los cromatóforos provenientes de células crecidas a  $17 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  fueron ensayados también a  $1300 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . Los resultados se expresan en la Tabla IV-3.

Con el objetivo de calcular los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de esta actividad, fueron realizadas las linealizaciones de Hofstee ( $v$  en función de  $v/s$ ). Este tipo de linealización, basada en el siguiente reordenamiento de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = V_{max} - K_m \cdot v/s,$$

origina una recta de pendiente negativa, para la que se demuestra que la ordenada al origen representa  $V_{max}$ , la intersección con el eje x ( $v/s$ )  $V_{max}/K_m$  y la pendiente es  $-K_m$  (121,122).

Fue elegido este tipo de linealización, frente a otros ensayados ( $v^{-1}$  vs  $s^{-1}$  y  $s/v$  vs  $s$ ) ya que permite visualizar las desviaciones del comportamiento michaeliano observadas, que otras linealizaciones ensayadas. Esto se debe a una mejor distribución de los puntos experimentales y una mayor sensibilidad a desviaciones de la linealidad (123).

Las figuras IV C-4 y IV C-5 muestran las linealizaciones de Hofstee obtenidas para las distintas preparaciones de cromatóforos.

Debido al tipo de linealización utilizado y a que las distintas preparaciones fueron ensayadas a las mismas condiciones de sustrato (irradiancia), se observa en dichas figuras que los puntos que corresponden a la misma condición de reacción se encuentran sobre una recta que fuga al origen y cuya pendiente es, precisamente, la irradiancia ensayada.

En dichas figuras se observa también que todas las linealizaciones presentan un cambio de pendiente, que varía en importancia según la preparación.

Este quiebre representa un cambio en los parámetros cinéticos que rigen la reacción. Una de las explicaciones para este hecho, y la que más se ajusta a nuestro caso, es que la actividad ensayada involucra una secuencia de dos o más reacciones catalizadas con parámetros cinéticos de valores tales que permiten verificar cambios en el paso limitante del proceso total (123).

La máxima velocidad, con sustrato saturante, que alcanza un sistema multi-enzimático es la menor de las  $V_{max}$  de los pasos que lo componen. Sin embargo, si este paso posee también la mayor  $K_m$ , la reacción que cataliza será siempre (a cualquier [S]) el paso limitante del proceso total catalizado por el sistema. Pero si esto no es así, es decir que los valores de los parámetros cinéticos de las reacciones comprendidas en el sistema son tales que a distintas [S] las reacciones limitantes son distintas, se verificará un cambio en el paso limitante, el que se detectará como un quiebre en las linealizaciones de Hofstee.

La fotofosforilación no se realiza por medio de una sola reacción catalizada por una única enzima; por el contrario, están involucrados 3 pasos principales: captación de luz, transporte de electrones y síntesis de ATP.

Por lo tanto, los quiebres observados en las figuras IV C-4 y IV C-5 representan cambios en el paso limitante del proceso de fotofosforilación a distintas irradiancias de ensayo.

Es importante destacar que todas las preparaciones ensayadas presentan sólo un cambio de paso limitante y que el mismo se verifica, en todas, a un valor de irradiancia, como sustrato, cercano a  $700 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

Se pueden definir, entonces, para los diferentes STE's ensayados, dos rangos de irradiancias en los cuales el paso limitante del proceso de fotofosforilación es distinto.

A partir de las figuras IV C-4 y IV C-5 se pueden calcular los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de los distintos pasos limitantes para cada preparación y cada rango de irradiancias; los que se muestran en la Tabla IV-4.

La figura IV C-6 muestra la variación de la velocidad con la irradiancia de ensayo de los dos pasos limitantes determinados para cada preparación de cromatóforos. Para la definición de estas funciones se utilizaron los parámetros de la Tabla IV-4.

Cada gráfico de la figura IV C-6 muestra también los puntos experimentales. Se observa que éstos se disponen sobre la curva de menor velocidad para todas las irradiancias de ensayo y que las curvas teóricas se cruzan, todas, a un valor cercano a  $700 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

En el análisis de los valores de la Tabla IV-4 es necesario tener en cuenta que la  $K_m$  para un determinado sustrato es una propiedad intrínseca de una reacción y su catalizador, mientras que la  $V_{\max}$  depende de la concentración de este último.

Con respecto a la  $K_m$  se pueden definir, entonces, tres grupos de pasos limitantes:

a- el limitante de todas las preparaciones a bajas irradiancias, con  $K_m$  que varían de 470 a  $880 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

b- el limitante a altas irradiancias para las preparaciones provenientes de cultivos de 106 y  $234 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ , con  $K_m$  menor que  $10 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

c- el limitante a altas irradiancias para las restantes preparaciones, cuyas  $K_m$  varían de 190 a  $340 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

Con respecto a las  $V_{\max}$  se puede afirmar que sólo el paso limitante a bajas irradiancias (a-) presenta variaciones significativas (de  $2.61$  a  $6.80 \text{ mmol ATP.min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ) ya que las  $V_{\max}$  de los otros pasos limitantes varían muy poco en un caso (c-, de  $2.16$  a  $2.92 \text{ mmol ATP.min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ) o directamente son iguales en el otro (b-,  $3.17$  y  $3.19 \text{ mmol ATP.min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ).

Es importante tener en cuenta que los valores de actividad se encuentran referidos al contenido de Bchl de cada preparación y que el tamaño de la UF (relación antena/CR) es constante en *Rps. viridis* (85,87), por lo tanto, si el proceso de captación lumínica llegara a ser alguno de los pasos limitantes descritos, su  $V_{\max}$  estandarizada a masa de Bchl no debería variar.

Este parece ser el caso del paso limitante b-, ya que los valores de las  $V_{\max}$  en las preparaciones y condiciones en que se manifiesta, prácticamente no difieren ( $3.17$  y  $3.19 \text{ mmol ATP.min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ). Esta suposición aparece apoyada, también, por el hecho de que este paso limitante posee una  $K_m$  notoriamente menor que los restantes ( $<10 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ), es decir que es el paso más afín a la irradiancia (por lo menos 25 y 70 veces con respecto a los pasos a- y c-, respectivamente).

El paso a-, limitante a irradiancias menores de  $700 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  para todas las preparaciones, debería ser el más significativo fisiológicamente, debido a dos razones principales:

i- es el limitante en el rango de irradiancias a las cuales fueron crecidas las células, salvo para las dos mayores; aunque es necesario tener en cuenta que la irradiancia efectiva sobre los STE's *in vivo*, debe ser menor que la incidente sobre el cultivo.

ii- presenta la mayor variación de  $V_{max}$  (260 %, de 2.61 a 6.80 mmol ATP.min<sup>-1</sup>.mg Bchl<sup>-1</sup>) es decir, que el/los catalizador/es de este paso presenta/n una significativa variación, que podría ser tanto cuantitativa, con respecto al contenido de Bchl, como cualitativa.

Por otro lado, la  $K_m$  de este paso presenta variaciones, entre las distintas preparaciones, que si bien no son importantes (menores que 2 veces), definen claramente dos tipos de preparaciones: por un lado las provenientes de células crecidas hasta 106 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> (con  $K_m$  de 470 a 550 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>) y por el otro, las de cultivos de mayores irradiancias, con  $K_m$  que varía de 750 a 880 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

Es importante destacar que precisamente entre estas dos irradiancias de cultivo, 106 y 234 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>, se presentan otros cambios significativos en el crecimiento y aparato fotosintético de *Rps. viridis* estudiados en esta tesis.

**\* TABLA IV-3:**

Actividad de fotofosforilación de preparaciones de cromatóforos provenientes de células crecidas en cultivos continuos a distintas irradiancias, ensayados a diferentes irradiancias como sustrato.

Irradiancia de cultivo	Irradiancias de ensayo					
	100	300	600	900	1300	1800
17	0.40	0.92	1.35	1.54	1.72	1.83
40	0.50	1.15	1.69	1.92		2.15
106	0.96	2.14	3.07	3.15		3.17
234	0.81	1.94	3.01	3.14		3.15
570	0.54	1.33	2.10	2.41		2.64
775	0.46	1.15	1.82	2.14		2.36
950	0.42	1.04	1.66	1.91		2.12

La irradiancias de cultivo y las de ensayo están expresadas en  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ ; la actividad de fotofosforilación en  $mmol\ ATP.min^{-1}.mg\ Bchl^{-1}$ .

**\* TABLA IV-4:**

Parámetros cinéticos de los dos pasos limitantes de la actividad de fotofosforilación calculados a partir de las figuras IV C-4 y IV C-5, para preparaciones de cromatóforos provenientes de células crecidas en cultivos continuos a distintas irradiancias.

Irradiancia de cultivo	Rango de irradiancias de ensayo			
	0 - 700		700 - 1800	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
17	550	2.61	340	2.16
40	540	3.21	270	2.50
106	470	5.49	<10	3.19
234	750	6.80	<10	3.17
570	840	5.06	190	2.92
775	880	4.51	220	2.66
950	870	4.07	230	2.40

Las irradiancias de cultivo, los rangos de irradiancias de ensayo y las  $K_m$  están expresadas en  $J.m^{-2}.seg^{-1}$ ; las  $V_{max}$  en  $mmol\ ATP.min^{-1}.mg\ Bchl^{-1}$ .

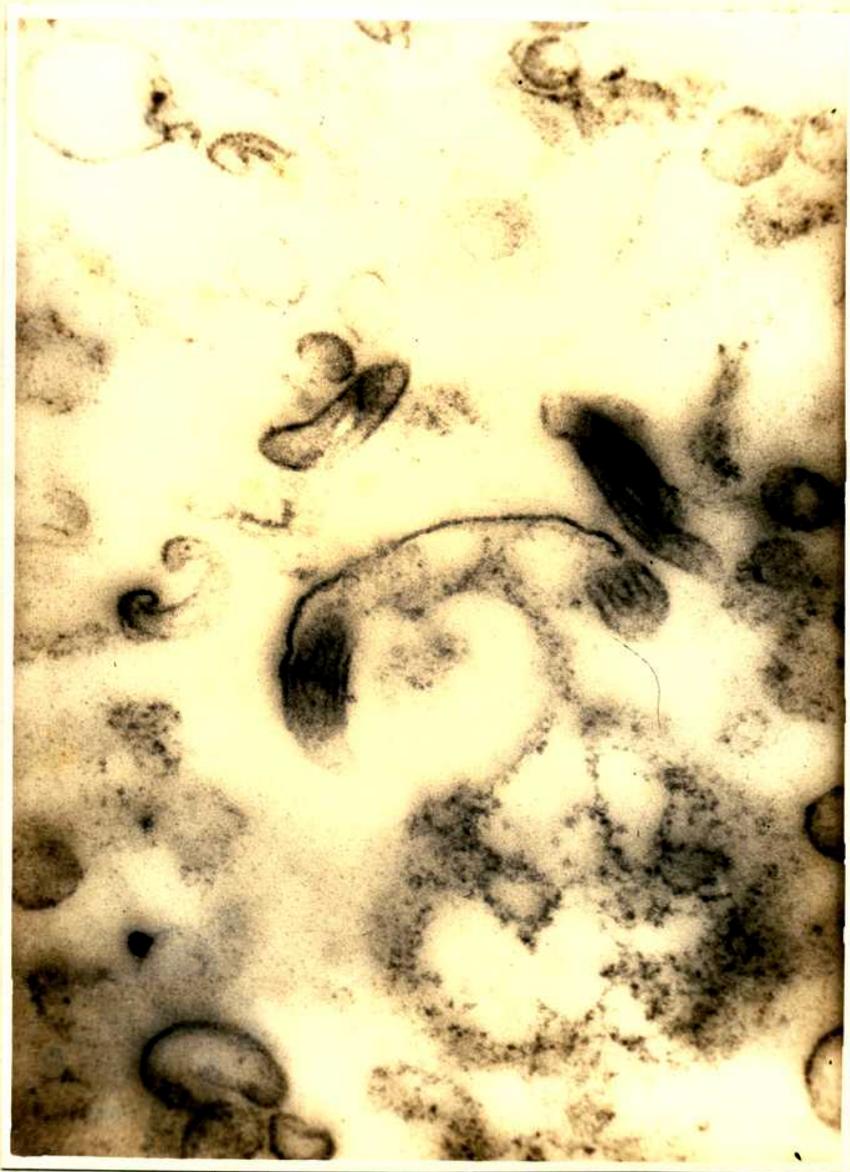


Figura IV C-1: Micrografía electrónica, por transmisión, de cromatóforos obtenidos de células crecidas en cultivo continuo a  $17 \text{ J.m}^{-2}\text{.seg}^{-1}$ . Aumento 80000X.

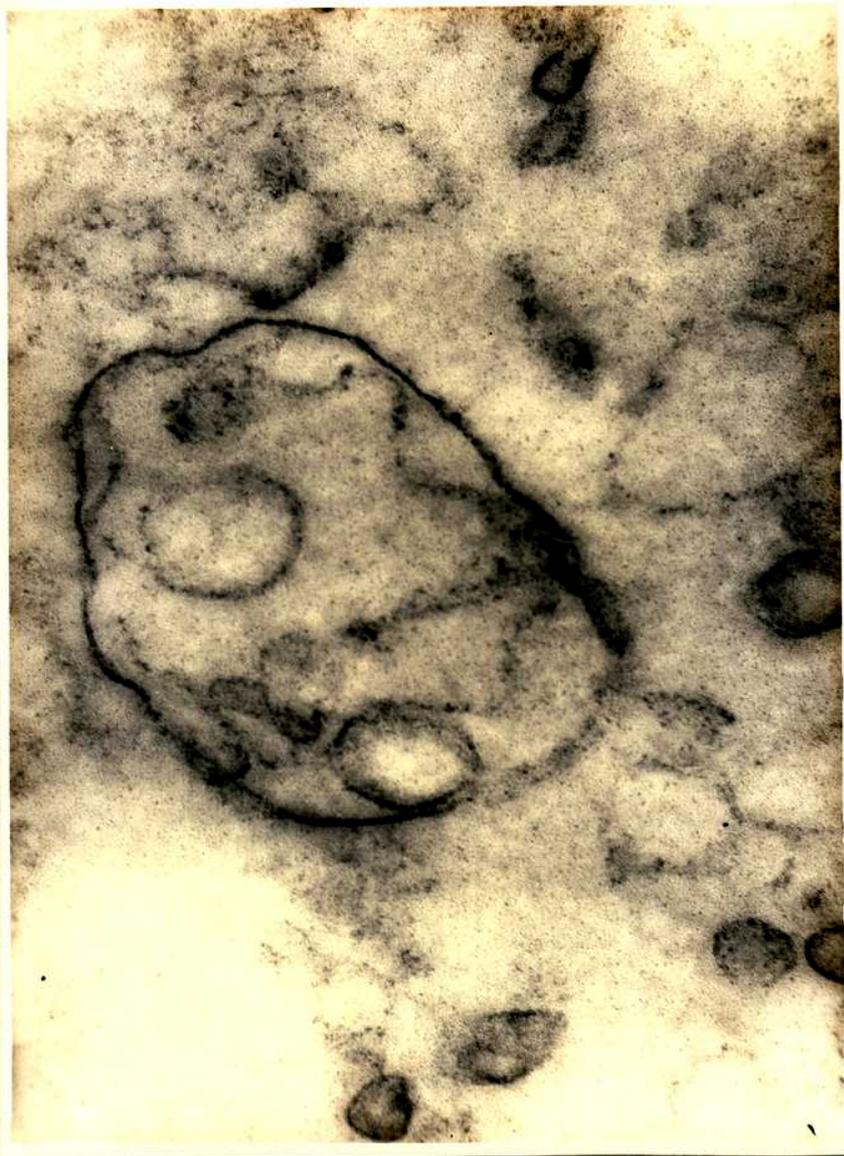
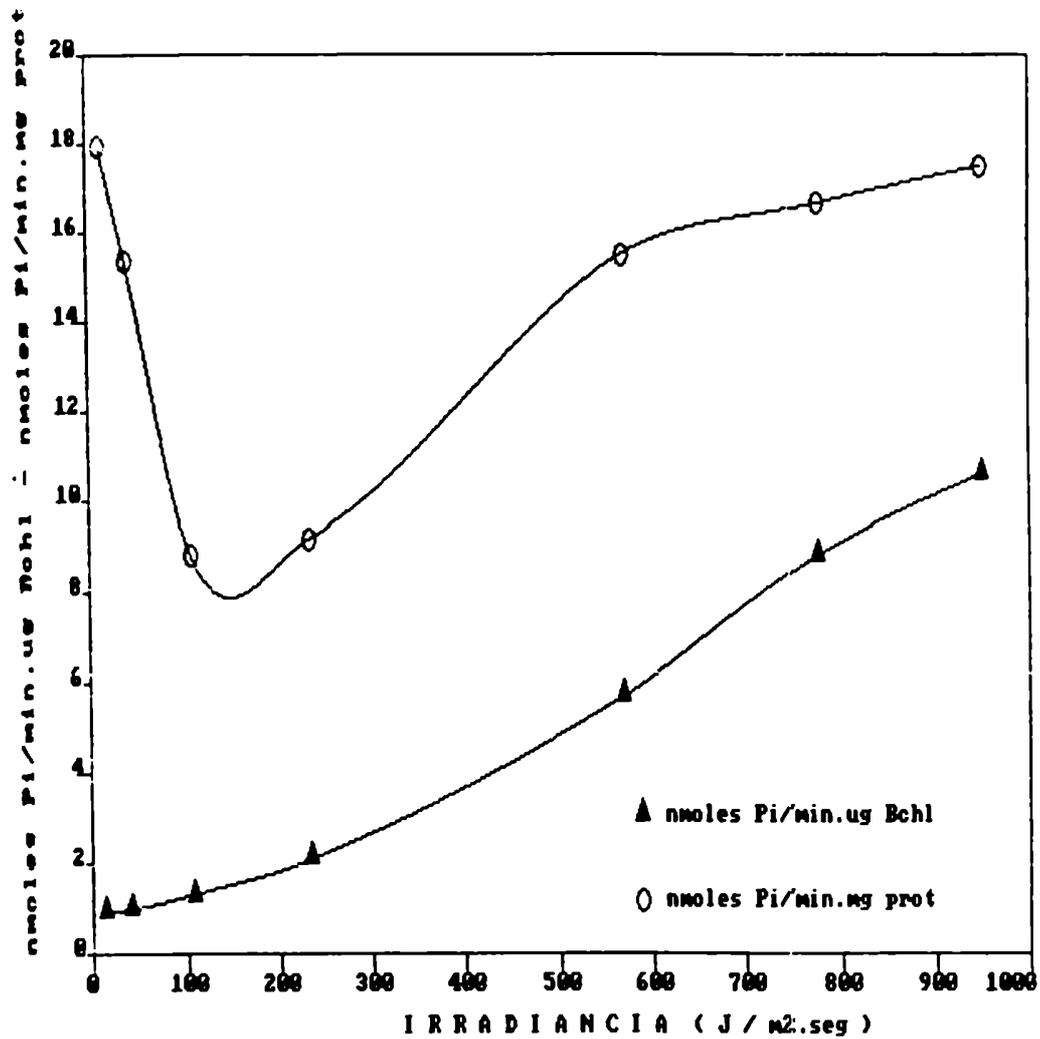
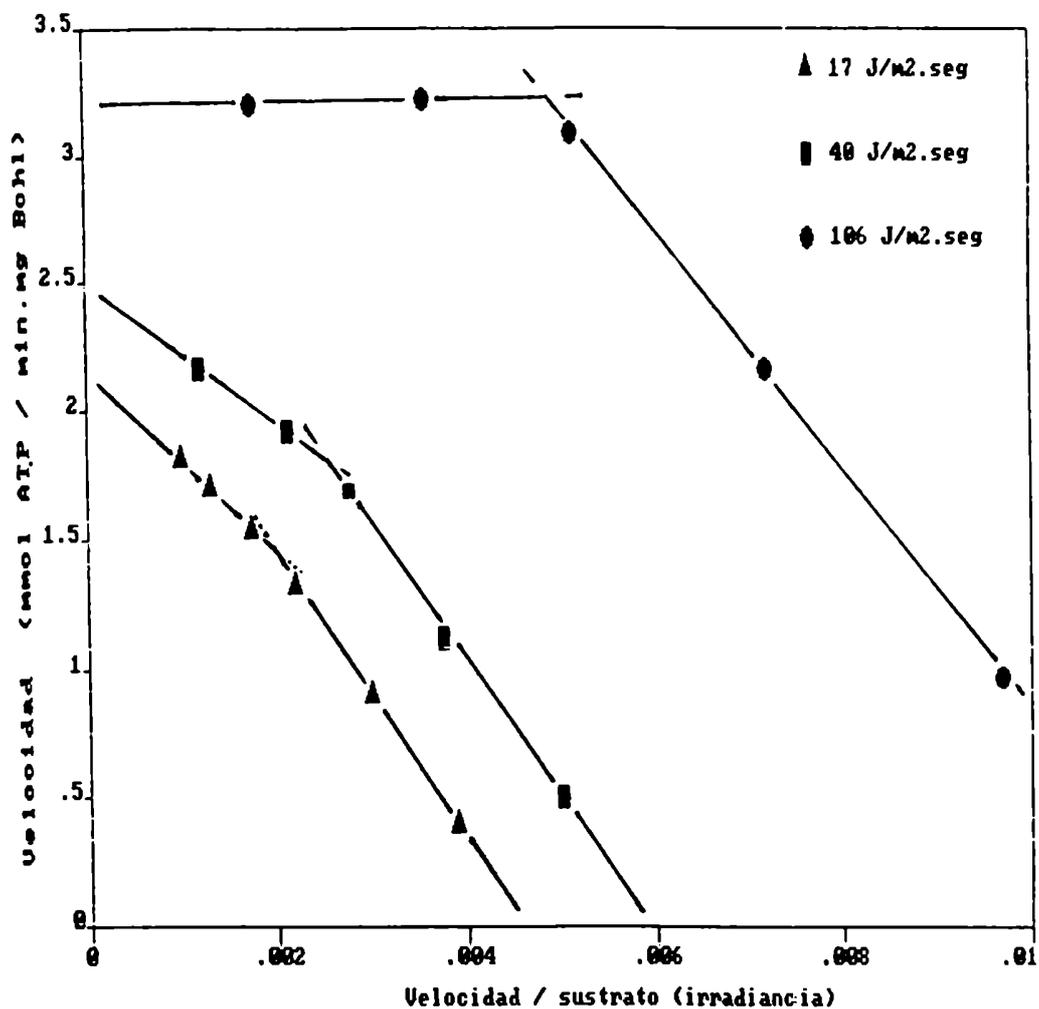


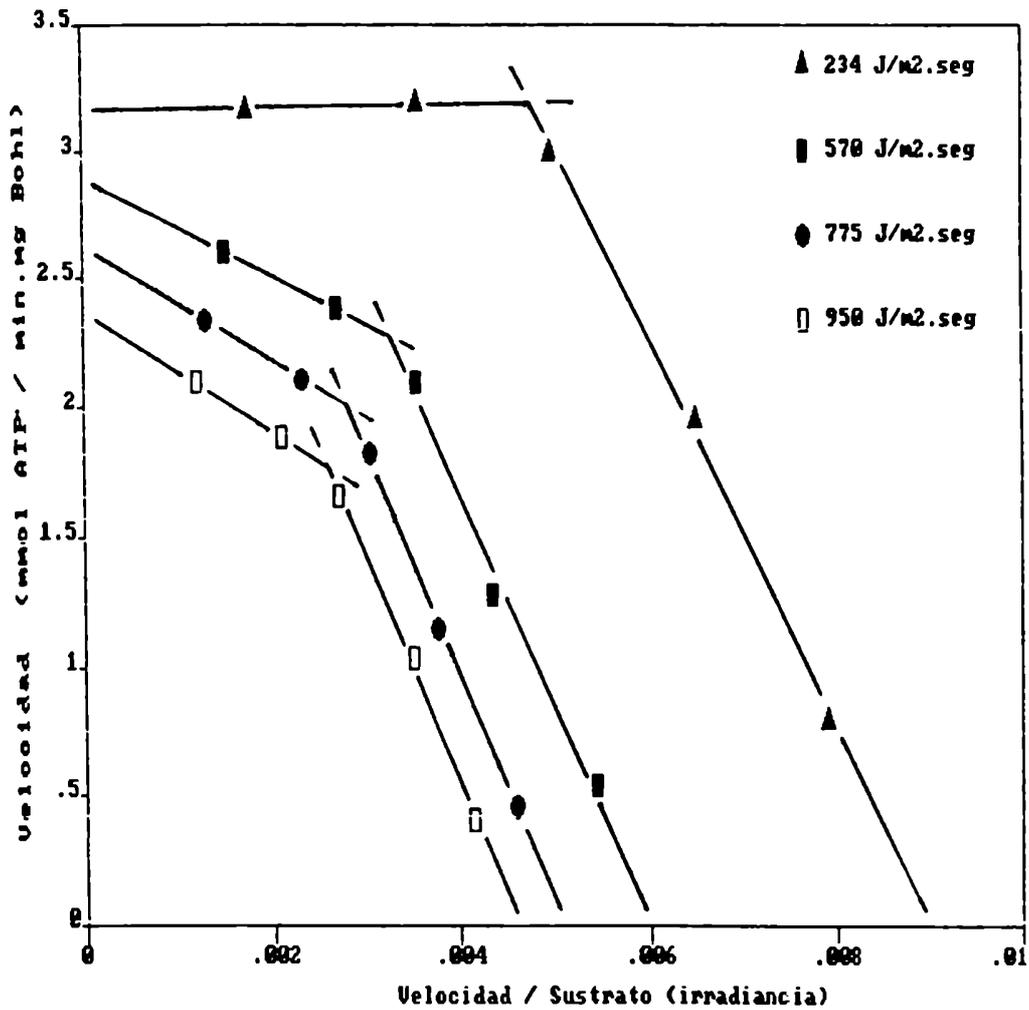
Figura IV C-2: Micrografía electrónica, por transmisión, de cromatóforos obtenidos de células crecidas en cultivo continuo a  $40 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ . Aumento 80000X.



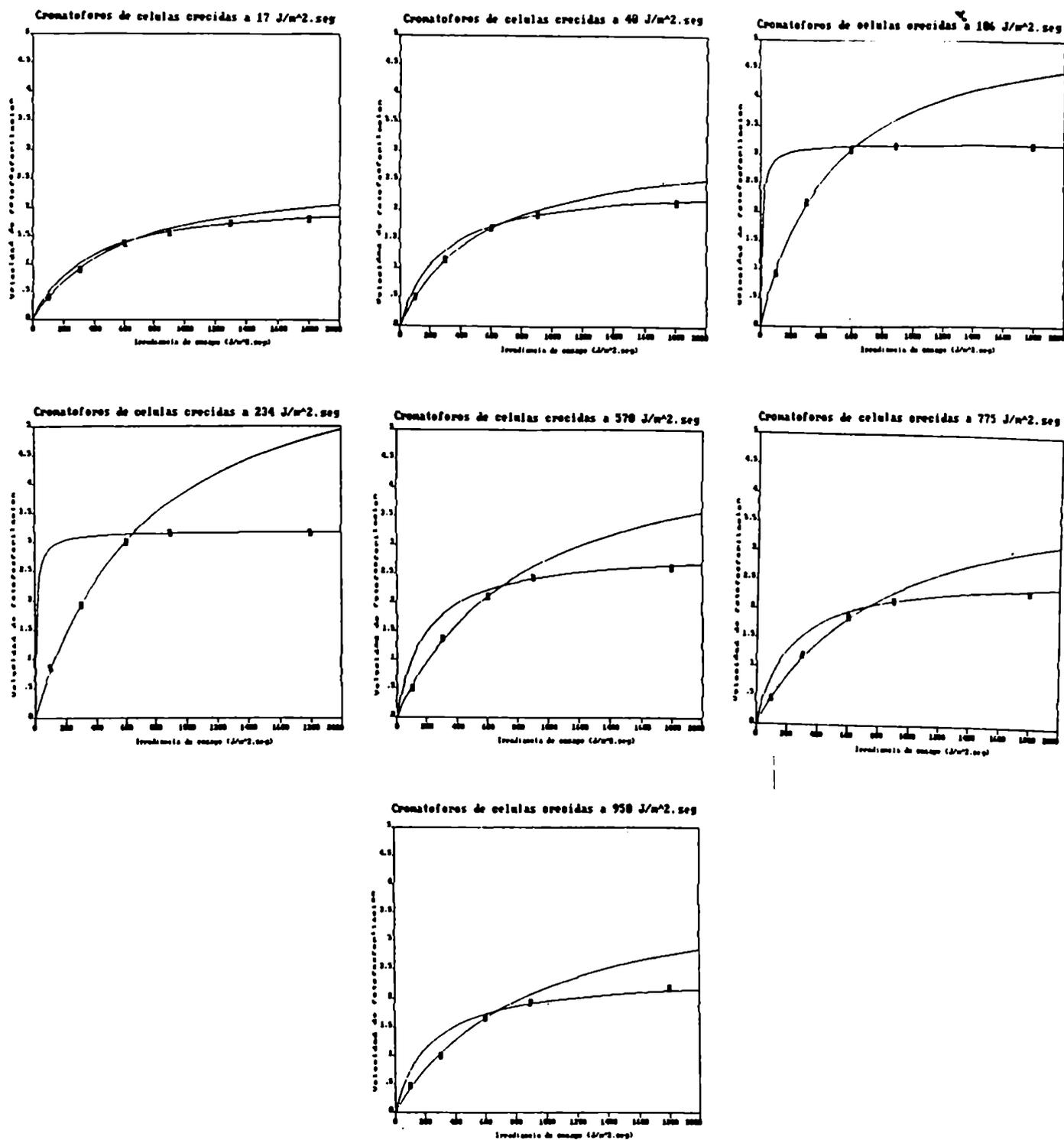
**Figura IV C-3:** Actividad de hidrólisis de ATP de distintas preparaciones de cromatóforos en función de la irradiancia de cultivo de las células de las que provienen. La actividad fue referida tanto al contenido proteico como al de Bchl de los cromatóforos. Cada valor representa la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos.



**Figura IV C-4:** Linealización de Hoftee de la actividad de fotofosforilación de cromatóforos provenientes de células crecidas a 17, 40 y 106  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ . Cada valor representa la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos.



**Figura IV C-5:** Linealización de Hofree de la actividad de fotosforilación de cromatóforos provenientes de células crecidas a 234, 570, 775 y 950  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ . Cada valor representa la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos.



**Figura IV C-6:** Actividad de fotofosforilación en función de la irradiancia de ensayo. En cada gráfico se representan los valores experimentales (Tabla IV-3) y las curvas teóricas de los dos pasos limitantes caracterizados para cada preparación (Tabla IV-4). Las preparaciones difirieron en la irradiancia de cultivo de las células de las que provienen. La velocidad de fotofosforilación está expresada en  $\text{mmol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Bchl}^{-1}$ . Cada valor experimental representa la pendiente de una curva de tiempo de 3 a 5 puntos.

## Y- RESUMEN Y CONCLUSIONES

En los cultivos estáticos, realizados a irradiancias efectivas de entre 10 y 135 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>, se verificó que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{680}$ ) aumenta linealmente con la irradiancia, con valores de entre 0.06 y 0.14 h<sup>-1</sup>, pendiente de  $6.5 \times 10^{-4}$  [h. J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup> y ordenada al origen de 0.05 h<sup>-1</sup>. Se verificó también, un aumento de la DO<sub>680</sub> del 'plateau' alcanzado para cada irradiancia.

Se puede afirmar, por lo tanto, que en este rango de irradiancias, ésta fue el factor limitante del crecimiento.

En todos los cultivos realizados se observó que el contenido de Bchl del cultivo aumenta a mayor velocidad que la biomasa. Esto indica un progresivo aumento del contenido específico de Bchl de las células. Este aumento ocurre también de manera exponencial, con una velocidad específica de duplicación ( $\mu_{ce}$ ) dependiente, obviamente, de las  $\mu$  del contenido de Bchl del cultivo ( $\mu_B$ ) y de biomasa ( $\mu_{680}$ ), según la expresión:

$$\mu_{ce} = \mu_B - \mu_{680}$$

A lo largo de un mismo cultivo, y dependiendo de la irradiancia incidente, el contenido específico de Bchl aumentó de 3 a 5 veces.

Este enriquecimiento constituiría la adaptación de las células ante la disminución de la irradiancia efectiva sobre ellas debida al propio crecimiento del cultivo (proceso de 'autosombra'). Este enriquecimiento dificulta la definición del STE correspondiente a cada irradiancia incidente.

Por otro lado, y estandarizando el contenido específico de Bchl a la misma turbidez del cultivo (es decir, en iguales condiciones de 'autosombra'), se verificó que éste disminuye con la irradiancia en prácticamente un orden; varió de 8.6  $\mu$ g Bchl/mg prot. en cultivos de 10 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> a 1  $\mu$ g Bchl/mg prot. en cultivos de 135 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

Esta variación indica que las células adaptadas a distintas irradiancias varían en sus STE's, por lo menos en cuanto a la cantidad.

Las micrografías electrónicas y el contenido específico de Bchl de los cromatóforos obtenidos de células de cultivos continuos demuestran que la organización de las membranas internas y la relación Bchl/proteína de éstas también se modifica con la irradiancia.

Es así como, si bien la dependencia lineal de  $\mu_{680}$  con la irradiancia representa la variación de la velocidad específica de duplicación de la biomasa, los STE's adaptados a cada irradiancia no son necesariamente semejantes, tanto cuali como cuantitativamente.

Se define, entonces, la velocidad específica de crecimiento relativa al contenido específico de Bchl; es decir, la velocidad de duplicación de biomasa estandarizada a igual contenido de CR. Este parámetro representa el aporte que haría cada UF (o CR directamente, en el caso de *Rps viridis*) a la velocidad específica de crecimiento.

Se verificó que este parámetro aumenta exponencialmente (desde 7 [h.mg Bchl.mg prot<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup> para cultivos de 10 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> hasta 147 [h.mg Bchl.mg prot<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup> para cultivos de 135 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>), según dos constantes: 1.6 [J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup> para irradiancias menores que 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> y 3.6 [J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup> para mayores irradiancias. Esto indica una cinética de grado 2 con respecto a la irradiancia como sustrato, con cambio de exponente a 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

Por otro lado y considerando el cultivo en su totalidad como una suspensión de STE's, el crecimiento depende de la velocidad de captación lumínica por parte del mismo. Puede ser definida entonces, la energía disponible por unidad de biomasa del cultivo como el producto entre la irradiancia y el contenido específico de Bchl desarrollado a esa irradiancia.

Este parámetro representa la cantidad de energía radiante disponible para ser transducida por unidad de biomasa y de tiempo, y constituye el sustrato efectivo para la transducción de energía.

La energía disponible por unidad de biomasa alcanza un máximo a irradiancias cercanas a 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

Debido a que, precisamente a 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup> se verifica también el cambio de exponente de la variación de  $\mu$  relativa a Bchl con la irradiancia, puede afirmarse con respecto a la regulación del contenido de Bchl en la adaptación de las células a la irradiancia, que:

a- en el rango de 0 - 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>, la disminución del contenido específico de Bchl es, relativamente, poco importante ya que la energía disponible igual aumenta con la irradiancia, mientras que el aumento de la  $\mu$  relativa (aporte de cada CR a  $\mu_{680}$ ) ocurre con un exponente menor que a irradiancias superiores.

b- a irradiancias mayores que 75 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>, la disminución del contenido específico de Bchl provoca que el cultivo disponga de una menor cantidad de energía; pese a ello, también origina que, en este rango, la  $\mu$  relativa aumente con un exponente mayor.

Por otro lado, fueron realizados cultivos continuos, en los que se mantuvo la turbidez constante. Por este motivo, y debido también a la diferencia en la geometría del dispositivo utilizado (el cultivo se desarrolla en una capa de 3 cm de ancho), el rango de irradiancias efectivas en el que se realizaron fue mayor que el de los cultivos estáticos; éste fue de 13 a 950 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>.

Se verificó que la velocidad específica de crecimiento alcanza un máximo entre 110 y 150 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>. A irradiancias menores, tanto los valores como la variación con la irradiancia fueron semejantes a los observados en los cultivos estáticos.

Se confirma, por lo tanto, que la irradiancia actúa como limitante del crecimiento hasta  $\pm$  130 J.m<sup>-2</sup>.seg<sup>-1</sup>. Por otro lado se verificó que irradiancias superiores no sólo son saturantes del crecimiento sino que inclusive presentarían un cierto efecto inhibitorio.

Ambos contenidos específicos de Bchl, de células y de cromatóforos obtenidos a partir de ellas, disminuyen según dos constantes de decaimiento cada uno. El cambio de constante se verifica, para ambos contenidos a valores de irradiancia de cultivo muy cercanos ( $120$  y  $140 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ )

El decaimiento del contenido específico de Bchl de las células se debe a dos razones principales:

i- el decaimiento del contenido de cromatóforos por célula

ii- el decaimiento del contenido específico de Bchl de los cromatóforos *per se*.

Se verificó que i- sólo tiene lugar en el rango de irradiancias de  $0$  a  $130 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ .

Según las constantes de decaimiento obtenidas, en este rango el contenido de cromatóforos disminuye a menos de la mitad, mientras que para irradiancias superiores el contenido de cromatóforos se mantiene constante.

Las observaciones microscópicas y el cálculo del porcentaje de proteína celular componente de los cromatóforos confirman esta regulación del contenido de membranas internas con la irradiancia.

Con el objetivo de estudiar las variaciones con la irradiancia de cultivo de las actividades enzimáticas relacionadas al STE, fueron ensayadas las actividades ATPásica y de fotofosforilación de cromatóforos provenientes de células crecidas a distintas condiciones, y en cultivos continuos a turbidez constante.

La variación de la actividad ATPásica depende de a qué componente de la membrana (proteínas o Bchl) se la estandarice.

El control realizado con un desacoplante (CCCP) permite afirmar que la medición de la actividad ATPásica cuantifica los complejos ATPasa funcionales hidrolíticamente; y por lo tanto, esta actividad relativa a proteínas representa el contenido específico de esta enzima en los cromatóforos sintetizados a distintas irradiancias.

La actividad ATPásica relativa a Bchl puede interpretarse como la relación entre los contenidos específicos de los complejos ATPasa y de Bchl.

En el rango en el cual la irradiancia es limitante del crecimiento ( $0$ - $130 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ), el contenido específico de ATPasa decae de manera semejante al estudiado para Bchl; por lo tanto, se verifica que la relación entre ambos complejos se mantiene prácticamente invariable. Para irradiancias superiores esta relación aumenta gradualmente hasta llegar a ser 10 veces mayor en la máxima irradiancia de cultivo estudiada.

Por su parte, la actividad de fotofosforilación fue ensayada a distintas condiciones de irradiancia como sustrato. Se observó que esta actividad presenta un cambio de constantes cinéticas en todas las preparaciones ensayadas. Esto fue atribuido a un cambio en el paso limitante del proceso de fotofosforilación; ya que éste se compone por, por lo menos, 3 pasos: captación de energía lumínica, transporte de electrones y síntesis de ATP.

En base a las  $K_m$  calculadas para cada uno de los 2 pasos limitantes detectados en cada preparación, se diferencian tres grupos. Se postula que el paso limitante de la fotofosforilación a bajas irradiancias de ensayo ( $< 700 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ ) es el mismo para todas las preparaciones. Sin embargo, la  $K_m$  de este paso varió de  $\pm 520 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  para las preparaciones provenientes de cultivos limitados por la irradiancia a  $\pm 835 \text{ J.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$  para aquellas de cultivos a irradiancias saturantes. La  $V_{m\acute{a}x}$  varió más significativamente, aumentándose en el rango de irradiancias limitantes más del doble ( de  $2.6$  a  $5.5 \text{ mmol ATP. min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ) para disminuir (hasta  $4.1 \text{ mmol ATP. min}^{-1}.\text{mg Bchl}^{-1}$ ) a irradiancias de cultivo superiores.

**BIBLIOGRAFIA:**

- 1- Schlegel HG, (1975) "Microbiología general". 1ª ed. Ed. Omega, Barcelona.
- 2- Shavit N (1980) Ann Rev Biochem 49:111-138.
- 3- Trebst A, Avron M (1977) eds. Photosynthesis I en Encyclopedia of Plant Physiology. NS 5. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- 4- Hinkle PC, Mc Carty RE (1978) "Cómo fabrican ATP las células", Investigación y Ciencia 20:58-75.
- 5- Neumann J, Jagendorf AT (1964) Arch Biochem Biophys 107: 109-119.
- 6- Von Stedingk LV, Baltscheffsky H (1966) Arch Biochem Biophys 117:400-404.
- 7- Boyer PD (1975) FEBS Lett 58:1-6.
- 8- Mitchell P (1977) FEBS Lett 78:1-20.
- 9- Mitchell P (1968) "Chemiosmotic coupling and energy transduction", Glynn Research Ltd. Bodmin, UK.
- 10- Williams RJP (1961) J Theor Biol 1:1.
- 11- Williams RJP (1974) FEBS Lett 53:123.
- 12- Williams RJP (1977) FEBS Lett 85:9-19.
- 13- Boyer PD (1965) en Oxidases and related redox systems (King TE, Mason HS, Morrison M eds.) 2:994. Wiley, Nueva York.
- 14- Maloney PC (1982) J Membrane Biol 67:1.
- 15- Mühlethaler K (1977) "Introduction to structure and function of the photosynthetic apparatus" pp 503-521 en Photosynthesis I (Trebst A, Avron M, eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- 16- Miller KR (1979) "La membrana fotosintética", Investigación y Ciencia 39:62-74.
- 17- Sane PV (1977) "The topography of the thylakoid membrane of the chloroplast" pp 522-542 en Photosynthesis I (Trebst A, Avron M, eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

- 18-Lichtenthaler HK, Kuhn G, Prenzel U, Meier D (1982) *Physiol Plant* 56:183-188.
- 19-Anderson JM, Goodchild DJ, Boardman NK (1973) *Biochem Biophys Acta* 325:573-585.
- 20-Pucheu NL (1977) Tesis doctoral. Fac. de Cs. Exactas y Naturales. UBA.
- 21-Dews G, Lampe HH, Ladwig R (1969) *Arch Microbiol* 65:12-19.
- 22-Oelze J, Dews G (1972) *Biochem Biophys Acta* 265:209-239.
- 23-Holmqvist O (1979) *FEMS Microbiol Lett* 6:37-40.
- 24-Miller KR (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6415-6419.
- 25-Jacob JS, Miller KR (1983) *Arch Biochem Biophys* 223:282-290.
- 26-Remsen ChC (1978) pp 31-60 en "The photosynthetic bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR eds.) Plenum, Nueva York.
- 27-Niederman RA, Gibson KD (1978) pp 79-118 en "The photosynthetic bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR eds.) Plenum, Nueva York.
- 28-Reed DW, Raveed D (1972) *Biochim Biophys Acta* 283:79-95.
- 29-Oelze J, Biedermann M, Dews G (1969) *Biochim Biophys Acta* 173:436-461.
- 30-Niederman RA (1974) *J Bacteriol* 117:19-25.
- 31-De Duve C, Berthlet J, Beaufay H (1959) *Prog Biophys* 9:325-337.
- 32-Collins MLP, Nierderman RA (1976) *J Bacteriol* 126:1326.
- 33-Takacs BJ, Holt SC (1971) *Biochim Biophys Acta* 233:278.
- 34-Boork J, Wennerström H (1984) *Biochim Biophys Acta* 767:314-320.
- 35-Pucheu NL, Kerber NL, García AF (1973) *FEBS Lett* 33:119-124.
- 36-Cohen-Bazire G, Kujisawa R (1960) *Proc Natl Acad Sci USA* 46:1543.
- 37-Cohen-Bazire G (1963) pp 89-110 en "Bacterial photosynthesis" (Gest H, San Pietro A, Vernón LP eds.) Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.

- 38-Cohen-Bazire G, Kunisawa R (1963) *J Cell Biol* 16:401-408.
- 39-Cohen-Bazire G, Sistrom WR (1966) pp 313-341 en "The chlorophylls" (Seeley GR, Vernon LP eds.) Academic Press, Nueva York.
- 40-Drews G, Garcia AF, Dierstein R, Shiozawa J (1981) en "Photosynthesis V. Chloroplast development" (Akoyunoglou G ed.) Balaban International Science Services, Filadelfia.
- 41-Drews G (1982) *Prog Bot* 44:14-21.
- 42-Dierstein R, Schumacher A, Drews G (1981) *Arch Microbiol* 128:376-383.
- 43-Drews G, Oelze J (1981) *Prog Bot* 42:21.
- 44-Boork J, Strid A, Baltscheffsky M (1985) *FEBS Lett* 180:314-316.
- 45-Lascelles J (1968) pp 1-42 en *Advances in Microbial Physiology Vol 2* (Rose AM, Wilkinson JF eds.) Academic Press, Nueva York.
- 46-Takemoto J, Lascelles J (1974) *Arch Biochem Biophys* 163:507.
- 47-Takemoto J, Lascelles J (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* 70:799.
- 48-Ketchum PA, Holt SC (1970) *Biochim Biophys Acta* 196:141.
- 49-Cho HM, Mancino LJ, Blankenship RE (1984) *Biophys J* 45:455-461.
- 50-Aagaard J, Sistrom WR (1972) *Photochem Photobiol* 15:209-225.
- 51-Payne WJ (1970) *Ann Rev Microbiol* 24:17-52.
- 52-Stouthamer AH, Bettenhausen C (1973) *Biochim Biophys Acta* 301:53-70.
- 53-Aiba S, Ogawa T (1977) *J Gen Microbiol* 102:179-182.
- 54-Tempest DW (1978) *Trends Biochem Sci* 3:180-184.
- 55-Tempest DW, Neijssel OM (1984) *Ann Rev Microbiol* 38:456-486.
- 56-Crabbendam PM, Neijssel OM, Tempest DW (1985) *Arch Microbiol* 142:375-382.

- 57-Kahru A, Paalme T, Vilu R (1987) FEMS Microbiol Lett 41:305-308.
- 58-Göbel F (1978) pp 907-925 en "The photosynthetic bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR eds.) Plenum, Nueva York.
- 59-Avron M, Gozal B (1969) pp 1185-1196 en "Progress in Photosynthesis Research" (Metzner H, ed.) 3.
- 60-Heber U, Kirk MR (1975) pp 1041-1046 en "Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis" (Avron M, ed.) 2 Elsevier Sci Pub Co., Amsterdam.
- 61-Wraight CA, Clayton RK (1973) Biochim Biophys Acta 333:246.
- 62-Wraight CA, Leigh JS, Dutton PL, Clayton RK (1974) Biochim Biophys Acta 333:401.
- 63-Chory J, Kaplan S (1983) J Bacteriol 153:465-474.
- 64-Myers J (1966) J Ferm Technol 44:344.
- 65-Monod J (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Thèse 2. Ed. Hermann, Paris. 1958.
- 66-Snozzi M, Crofts AR (1984) Biochim Biophys Acta 766:451-463.
- 67-Pfenning N, Trupper HG (1974) en "Bergey's Manual of determinative Bacteriology" 8<sup>o</sup> ed. (Buchanan RE, Gibbons NE eds.) pp. 24-64, The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- 68-Trupper HG, Pfenning N (1979) en "The Photosynthetic Bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR, eds.) pp. 19-26, Plenum Press, Nueva York.
- 69-Tiraboschi BH (1981) Seminario de licenciatura. Fac. Cs. Exactas y Naturales. UBA.
- 70-Saunders VA (1978) Microbiol Rev 42:357-384.
- 71-Nissen H, Dundas ID (1984) Arch Microbiol 138:251-256.
- 72-Imhoff JF, Trüper HG, Pfenning N (1984) Int J Syst Bacteriol 34:340-343.
- 73-Rich PR (1984) Biochim Biophys Acta 768:53-79.

- 74-Clayton RK (1963) en "Bacterial Photosynthesis" (Gest H, San Pietro A, Vernon LP, eds.) pp. 495 Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- 75-Scholz B, Ballschmiter K (1982) J Chromatogr 252:269-282.
- 76-Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ (1951) J Biol Chem 193:265.
- 77-Luft H (1961) J Biophys Biochem Cytol 9:409.
- 78-Sabatini RC (1962) J Histochem Cytochem 10:652.
- 79-Reynolds P (1963) J Cell Biol 17:208.
- 80-Nicolls DG (1982) "Bioenergetics. An introduction in the chemiosmotic theory" Academic Press, London-New York.
- 81-Taussky H, Shorr E (1953) J Biol Chem 202:675.
- 82-Sugino Y, Miyoshi Y (1964) J Biol Chem 239:2360-2364.
- 83-Gould JM, Cather R, Winget GD (1972) Annal Biochem 50:540-548.
- 84-Mc Carty RE (1985) Biosci 35:27-33.
- 85-Welte W, Kreutz W (1985) Structure of thylakoids in cells of *Rhodospseudomonas viridis* as influenced by growth conditions. Arch Microbiol 141:325-329.
- 86-Cogell RJ, Thornberg JP (1980) FEBS Lett 122:1-8.
- 87-Welte W, Kreutz W (1982) Biochim Biophys Acta 692:479-488.
- 88-Matsuura K, O'Keefe DP, Dutton PL (1983) Biochim Biophys Acta 722:12-22.
- 89-Brock TD (1978) "Biología de los microorganismos" 2º ed. pp. 774. Omega, Barcelona.
- 90-Kaufmann N, Hüdig H, Drews G (1984) Mol Gen Genet 198:153-158.
- 91-Pfenning N (1979) en "The Photosynthetic Bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR, eds.) pp. 3-14, Plenum Press, Nueva York.

- 92- Jackson JB, Venturoli G, Baccarini-Melandri A, Melandri BA (1981) *Biochim Biophys Acta* 636:1-8
- 93- Van Grondelle R, Hunter CN, Bakker JGC, Kramer HJM (1983) *Biochim Biophys Acta* 723:30-36.
- 94- Kramer HJM, Van Grondelle R, Westerhus WHJ, Amesz J (1984) *Biochim Biophys Acta* 765:156-165.
- 95- Duysens LNM (1956) Energy transformation in photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol* 7:25-50.
- 96- Vredenberg J, Duysens LNM (1963) *Nature* 26:355-357.
- 97- Clayton RK (1966) *Photochem Photobiol* 5:669-677.
- 98- Clayton RK (1966) *Photochem Photobiol* 5:807-821.
- 99- Clayton RK (1966) *J Bioenerg Biomem* 15:167-177.
- 100- Sauer K (1975) pp.115-181, en "Bioenergetics in Photosynthesis" (Govindjee, ed.) Academic Press, New York.
- 101- Monger TG, Parson WW (1977) *Biochim Biophys Acta* 460:393-407.
- 102- Knox RS (1975) pp.183-222, en "Bioenergetics in Photosynthesis" (Govindjee, ed.) Academic Press, New York.
- 103- Knox RS (1977) pp.56-97 en "Primary processes in photosynthesis" (Barber, ed.) 2 Elsevier, Amsterdam.
- 104- Pradel J, Lavergne J, Moya I (1978) *Biochim Biophys Acta* 502:169-182.
- 105- Thornberg JP, Trospen TL, Strouse CE (1978) pp.133-160 en "The Photosynthetic Bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR, eds.) Plenum Press, Nueva York.
- 106- Packham NK, Berriman JA, Jackson JB (1978) *FEBS Lett* 89:205-210.
- 107- Petty KM, Jackson JB (1979) *FEBS Lett* 97:367-372.
- 108- Clayton RK (1963) *Biochim Biophys Acta* 75:312-323.
- 109- Bowyer JR, Tierney GV, Crofts AR (1979) *FEBS Lett* 101:201-206.

- 110- Bowyer JR, Tierney GV, Crofts AR (1979) FEBS Lett 101:207-212.
- 111- Bowyer JR, Crofts AR (1981) Biochim Biophys Acta 636:218-233.
- 112- Bowyer JR, Crofts AR (1981) Arch Biochem Biophys 207:416-426.
- 113- Boxer SG (1983) Biochim Biophys Acta 726:265-292.
- 114- Takamiya K, Dutton PL (1979) Biochim Biophys Acta 546:1-16.
- 115- Petty KM, Jackson JB, Dutton PL (1977) FEBS Lett 84:299-303.
- 116- Meinhardt SW, Crofts AR (1982) FEBS Lett 149:223-227.
- 117- Westerhoff HV, Melandri BA, Venturoli G, Azzone GF, Kell DB (1984) Biochim Biophys Acta 768:257-292.
- 118- Racker E, Proctor H (1970) Biochem Biophys Res Commun 39:1120.
- 119- Reidl H, Golecki JR, Drews G (1983) Biochim Biophys Acta 725:455-463
- 120- Orlich G, Hauska G (1980) Eur J Biochem 111: 525.
- 121- Hofstee BHJ (1949) J Biol Chem 179:633.
- 122- Hofstee BHJ (1959) Nature 184:1296.
- 123- Dixon M, Webb EC (1979) en "Enzymes", 3<sup>o</sup> ed. Academic Press, Nueva York.
- 124- Kaiser I, Oelze J (1980) Arch Microbiol 126:195-198.
- 125- Good NE (1977) "Uncoupling of electron transport from phosphorylation in chloroplast" pp. 429 en Photosynthesis I (Trebst A, Avron M, eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- 126- Baltscheffsky M (1978) "Photosynthetic photophosphorylation" pp. 595 en "The Photosynthetic Bacteria" (Clayton RK, Sistrom WR, eds.) Plenum Press, Nueva York.

