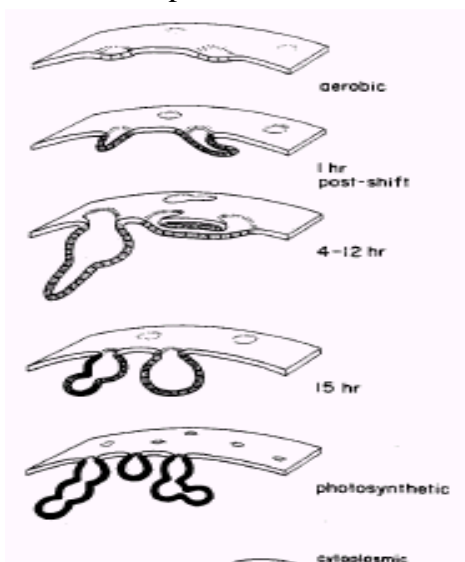


Trabajo Práctico Nro. 2

Regulación metabólica: fotosíntesis

Los nichos ecológicos en los cuales las bacterias fotosintéticas compiten exitosamente con otros microorganismos se caracterizan por dos aspectos fundamentales: la presencia de luz y la degradación microbiana de materia orgánica bajo condiciones de limitación de oxígeno (semiaerobiosis) o anaerobiosis. La membrana citoplasmática (MC), además de fosfolípidos, contiene proteínas intrínsecas y extrínsecas que cumplen funciones claves para la supervivencia celular, tales como las permeasas, las enzimas biosintéticas, los componentes de la maquinaria de síntesis de ATP, los transportadores de electrones, etc. Todas las bacterias púrpuras y las cianobacterias, excepto *Gloeobacter*, *Rhodospirillum tenue*, *Heliobacterium chlorum*, contienen membrana intracitoplasmática (MIC) en la cual se encuentra localizado el aparato fotosintético (AF). Las MIC's se forman por invaginación de las MC y permanecen conectadas a la misma. La composición y síntesis de las MIC ha sido estudiada en algunas bacterias fotosintéticas en las cuales la síntesis de MIC y del AF está estrechamente correlacionada. Ambos procesos pueden ser modulados por la concentración de oxígeno en el medio de cultivo y por la intensidad de luz.



Representación esquemática del crecimiento de las ICM.

(Chory et al., 1984, J Bacteriol. 159: 540-554).

Cuando se transfieren células aeróbicas de bacterias púrpuras a condiciones fototróficas (anaerobiosis-luz) o a semiaerobiosis (baja tensión de oxígeno y en oscuridad), se induce la formación de la MIC. En los primeros estadios de la diferenciación (1 a 4 h después de la transferencia a condiciones fototróficas) la MIC recientemente formada tiene el aspecto de lamelas planas o anchos túbulos con una alta relación lípido-proteína debido a su bajo número por área de membrana. Más tarde, durante la adaptación, las lamelas planas o los anchos túbulos se redondean y disminuyen en tamaño. Al final del período de adaptación, la MIC está formada por las pequeñas vesículas características de las células crecidas fotosintéticamente.

La cantidad de MIC producida bajo condiciones fotosintéticas depende de la intensidad de luz. Bajo condiciones de alta luz se detectan pocas vesículas en la periferia del protoplasto. Bajo condiciones de baja luz, en cambio, la bacteria contiene un alto número de vesículas llenando la mayor parte del espacio citoplásmico.

PARTE EXPERIMENTAL

En el laboratorio realizaremos experimentos que nos permitirán vislumbrar aspectos fundamentales de la fisiología de las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (fam. Rhodospirillaceae)

Objetivos

Comparar la velocidad de crecimiento en diferentes condiciones (químico y fototróficas)

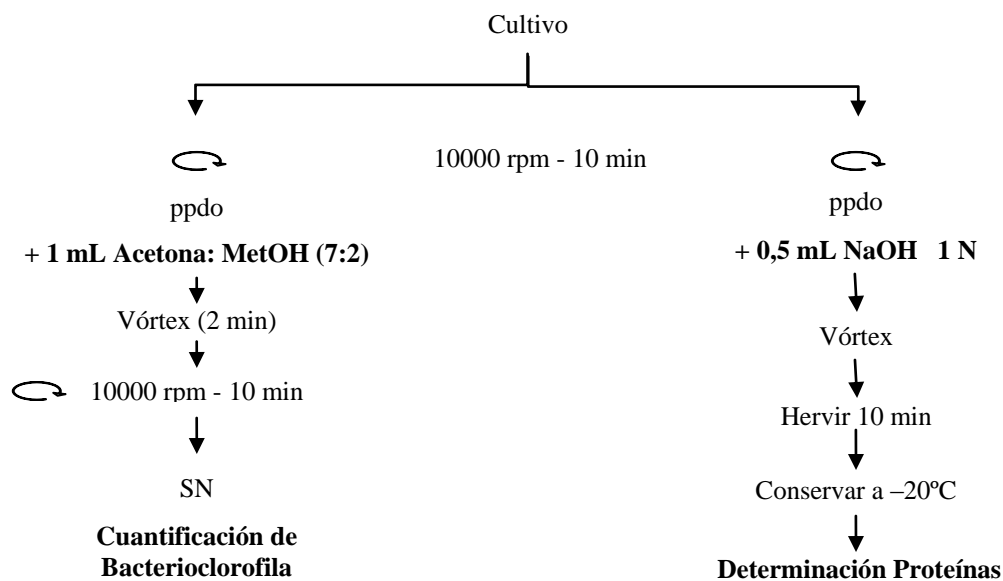
Analizar el efecto de la luz y el oxígeno sobre el metabolismo de dos bacterias de la familia Rhodospirillaceae

Cepas y medio

Se utilizará la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. El medio de Weaver será utilizado para los ensayos.

Condiciones de cultivo, cosecha de células, preparación de muestras

A partir de un precultivo se inocularán 130 ml de medio Weaver estéril con un $DO_{600} = 0,02$. Agitar bien (a mano) y retirar 70 ml para procesar, los cuales se dividirán en dos partes de 35 ml. Centrifugar y guardar los pellets celulares (T_0), para procesar con las demás muestras al final del cultivo. El resto del cultivo original se divide en partes iguales y se incuba en dos condiciones: a) anaerobiosis en presencia de luz (estático con agregado de vaselina estéril), y b) aerobiosis en oscuridad (con agitación tapados con papel de diario). La temperatura de incubación será aproximadamente 25 °C. En T_1 (24 hs) y T_2 (48 hs) tomar 20 y 2 ml respectivamente de cada condición, separar cada fracción en dos partes iguales y centrifugar. Tener en cuenta que se debe medir DO_{600nm} al tomar cada muestra, para determinar el crecimiento celular.



Determinación de la concentración de bacterioclorofila

Resuspender el pellet celular con 1.0 ml de acetona-metanol 7:2 (proteger los tubos de la luz), mezclar inmediatamente en vórtex, centrifugar 3 minutos a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a tubos limpios y leer A_{772} . Determinar la concentración de bacterioclorofila considerando un $\epsilon_{mM}^{-1} = 75$ y $PM\ Bchl = 1000\ d$.

Determinación de la concentración de proteína

Se usará el método descrito por Lowry modificado para proteínas totales bacterianas.

Reactivos

Solución patrón: Albúmina bovina (SAB) 1 mg/ml en 1N NaOH

Solución A: 2% Carbonato de sodio

Solución B: disolver 0.5 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ en 100 ml de 1% tartrato de sodio y potasio

Solución C: 50 partes de A + 1 parte de B (preparada en el momento)

Reactivo de Folin: 1N (Diluir 1:2,5 el reactivo del frasco).

Volumen de final de muestra: 200 μL

Curva patrón: utilizar 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μg SAB.

Tubo N°	SAB (μl)	1N NaOH (μl)	Lowry C (ml)	T.amb (min)	Folin (ml)	T.amb (min)	DO _{500nm}
B1		200	1.0	10	0.1	30	
1			1.0	10	0.1	30	
2			1.0	10	0.1	30	
3			1.0	10	0.1	30	
4			1.0	10	0.1	30	
5			1.0	10	0.1	30	
6			1.0	10	0.1	30	

Nota: agitar vigorosamente al agregar el Folin.

Resultados

**Graficar: crecimiento (DO₆₀₀) vs tiempo. Determinar el tiempo de generación (g)
mg Bchl / mg proteínas totales vs tiempo**

Medio de cultivo

Medio de Weaver para la familia Rhodospirillaceae (bacterias fotosintéticas purpúreas no sulfurosas)

Soluciones stock

	Volumen (ml)
Acido DL málico, 20% pH 6.8 (ajustar con OHK)	7
EDTA disódico 1%	2
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O 20%	1*
Trazas 10X	0,1
Cloruro de calcio 2 H ₂ O 7.5%	1
Sulfato ferroso 7 H ₂ O 0.5%	2,4
Vitaminas 20X	0,051
Buffer fosfato de potasio pH 6.8	15
Sulfato de amonio 1 M	10
Extracto de levadura 10%	5
Llevar a 1 litro con H ₂ O destilada	

Ajustar, si fuera necesario, a pH 6.8.

*Esterilizar por autoclave (excepto el sulfato de Mg que se autoclave aparte y se agrega después).

Preparación de soluciones de:**Trazas 10X:**

Sulfato de manganeso	397.5 mg
Acido bórico	700.0 mg
Nitrato cúprico 3 H ₂ O	10.0 mg
Sulfato de zinc 7 H ₂ O	60.0 mg
Molibdato de sodio 2 H ₂ O	187.5 mg
Llevar a 25 ml con agua destilada	

Vitaminas 20X

colina	550 mg
tiamina	165 mg
ácido nicotínico	580 mg
pantotenato de sodio	100 mg
biotina	0.6 mg
ácido <i>p</i> -amino benzoico	160 mg
mesoinositol	600 mg
cianocobalamina (B12)	40 mg
riboflavina	100 mg
Llevar a 50 ml con agua destilada	

Buffer fosfato de potasio pH 6.8

Fosfato monobásico de potasio	20 g
Fosfato dibásico de potasio 3 H ₂ O	30 g
Llevar a 500 ml con agua destilada	