

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MUTANTE DE
CIANOBACTÉRIA *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 COM
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS.

THAIS PRISCILA DE SOUSA E SILVA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
outubro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Silva, Thais Priscila de Sousa e

Obtenção e caracterização de um mutante de cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* utex 625 com alterações morfológicas e fisiológicas / Thais Priscila de Sousa e Silva. - Piracicaba, 1996.

105 p : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Cianobactéria 3. Metabolismo fotossintético
4. Mutação induzida I. Título

CDD 589.46

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MUTANTE DE
CIANOBACTÉRIA *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 COM
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS.

THAIS PRISCILA DE SOUSA E SILVA
Engenheiro Agrônomo

Aprovada em 13 de dezembro de 1996.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate


Prof.^a. Dr.^a. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Prof.^a. Dr.^a. Siu Mui Tsai

ESALQ/USP

ESALQ/USP

ESALQ/USP



Prof. Dr. Carlos Alberto Labate
orientador

Aos meus pais,

dois grandes amigos.

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Carlos Alberto Labate da ESALQ-USP pela orientação e paciência.
- Dra. Mônica T.V. Labate pela participação na obtenção dos resultados.
- Prof. Dr. Elliot W. Kitajima da ESALQ-USP e Silvânia Machado pelos ensinamentos e atenção no trabalho realizado no NAP - Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica.
- Maria Juliana Decico Real e Luciana Santos Rodrigues pela amizade e colaboração no trabalho.
- Fernanda de Albuquerque Martins Bacchi e Keila Maria Roncato Duarte pela amizade e apoio.
- Rubens Raymundo da Silva e Élbea Priscila de Sousa e Silva, meus pais; Tânia Beatriz de Sousa e Silva e Beatriz de Oliveira e Souza, pelo carinho e confiança.
- Luiz Humberto Gomes pela amizade e disposição em me ajudar sempre que foi preciso.
- Bibliotecária do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas Silvana Marchizelli Gregório pela atenção e dedicação.
- Professores, funcionários e amigos do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas.
- FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	01
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1.Características gerais.....	03
2.2.Classificação.....	04
2.3.Organização das membranas e inclusões citoplasmáticas.....	07
2.4. Fotossíntese.....	11
2.4.1.Transporte de elétrons nas membranas do tilacóide	12
2.4.2.Absorção e transferência de energia para os fotossistemas.....	17
2.4.3.Fixação do CO ₂ via Ciclo de Calvin.....	22
2.5.Respiração.....	25
2.6.Emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i>	29
2.7.Características do padrão de emissão da fluorescência.....	31
2.8.Mecanismo de concentração de carbono inorgânico.....	37
2.8.1.Transporte ativo de carbono inorgânico.....	37
2.8.2.O carboxissoma como sítio de concentração de CO ₂	41
2.9.Obtenção e seleção de mutantes em cianobactérias.....	43
2.10.Mutantes de cianobactérias, deficientes no metabolismo fotossintético...45	
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1.Material biológico.....	54
3.2.Condições de crescimento e manutenção das células.....	54
3.3.Determinação do teor de clorofila <i>a</i>	55

3.4.Obtenção do mutante.....	56
3.5.Seleção de mutantes que requerem alta concentração de CO ₂	57
3.6.Determinação da taxa de crescimento.....	58
3.7.Caracterização morfológica externa e estrutura fina.....	58
3.8.Fotossíntese e emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i>	60
3.8.1.Condições experimentais.....	60
3.8.2.Emissão de fluorescência da clorofila <i>a</i>	61
3.8.3.Taxa fotossintética e respiratória.....	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE.....	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Diagrama esquemático da ultraestrutura de uma cianobactéria. CM, membrana celular; TH, tilacóides; PB1 e PB2, ficobilissomas associados aos tilacóides; GG, grânulos de glicogênio; CY, grânulos de cianoficina; P, grânulos de polifosfato; C, carboxisoma; R, ribossomas. Reproduzido de STAINER & COHEN-BAZIRE (1977).....	07
2. Secção longitudinal de <i>Pseudanabaena</i> sp PCC 7408, mostrando algumas das estruturas esquematizadas na Figura 2, tais como membranas do tilacóide (th), ficobilissomas (pb), grânulos de polifosfato (p) e nucleoplasma (n). A barra indica 0,2 µm. Extraída de STANIER (1988).....	10
3. Fluxo linear de elétrons e translocação de prótons durante a reação que ocorre na membrana do tilacóide, em presença de luz. Quatro complexos de proteínas associadas à membrana participam da reação: o fotossistema II (PSII), o complexo citocromo <i>b/f</i> (cyt <i>b/f</i>), o fotossistema I (PSI) e ATP sintase. O citocromo <i>c₅₅₃</i> é substituído por plastocianina em algumas espécies, como <i>Synechococcus spp.</i> Esquema transcrito de NILSSON (1992).....	12
4. Modelo do mecanismo de transição de estado em membranas do tilacóide de cianobactérias, extraído de RÖGNER et al. (1996); (a) estado 1 (favorecendo o fluxo linear de elétrons, com os complexos PSII e citocromo <i>b₆/f</i> na forma dimérica e PSI monomérico) e (b) estado 2 (favorecendo o fluxo cíclico de elétrons, com os complexos citocromo <i>b₆/f</i> monomérico e PSI trimérico; o PSII monomérico não está envolvido). Os componentes destacados na figura são fotossistemas I (PSI) e II (PSII) em verde, citocromo <i>b₆/f</i> (laranja), plastoquinona (círculos pretos), plastocianina (azul marinho), ferredoxina (vermelho) e a ferredoxina-NADP ⁺ oxirredutase (amarelo). O sistema ficobilissoma coletor de luz (PBS) está em azul claro. Para maior simplicidade, outros componentes da membrana do tilacóide foram omitidos.....	21

5. Esquema mostrando as reações catalizadas pelas enzimas RuBisCO e PRK e o destino metabólico dos produtos das reações.....23
6. Esquema mostrando a interação entre os processos fotossíntese e respiração numa cianobactéria. Cit *b₆f*, complexo citocromo *b₆f*; Cit *c₅₅₃*, citocromo *c* solúvel, plastocianina em algumas espécies; DH, NADH desidrogenase; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP⁺ redutase, ativa na luz; FNR*, FNR ativa no escuro como NADPH desidrogenase; F₀F₁, ATP sintetase; PP, pentose fosfato; P₆₈₀ → Q_A, fotossistema II; P₇₀₀ → A₀, fotossistema I; PQ, plastoquinona. Modificado de SCHERER et al. (1988).....26
7. Cinética da fluorescência da clorofila e evolução de O₂ em células intactas de *A. nidculans* iluminadas na presença (A) ou ausência (B) de NaHCO₃ 10 mM. A fluorescência do escuro (F₀) foi monitorada em células adaptadas ao escuro e um pulso único de luz saturante (▲) foi aplicado. Durante iluminação actínica (700 μmol.m⁻².s⁻¹), pulsos repetitivos de luz saturante foram aplicados. As flechas indicam feixe de luz actínica ligado (↑) e desligado (↓). Figura extraída de ROMERO et al. (1992)33
8. Efeito da adição de NaHCO₃ (10 mM) e DCMU (10 μM) na cinética da fluorescência da clorofila *a* e curva de liberação de O₂ em células intactas de *A. nidculans*, adaptadas ao escuro. A flecha (↑) indica luz actínica ligada. Figura adaptada de ROMERO et al.(1992).....36
9. Células selvagens (direita) e do mutante 26 (esquerda) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, cultivadas em meio líquido BG-11 sem aeração64
10. Células do mutante 26 de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, apresentando a formação de grumos durante o desenvolvimento da cultura em meio BG-11 líquido. Microscopia de imersão. Aumento de 1000x.....64
11. Curva de crescimento de células selvagens (azul) e do mutante 26 (verde) de *Synechococcus* UTEX 625, expressa em concentração de clorofila. Condições: aeração de 300μl/min (quadrado) e sem aeração (círculo).....66

12. Células selvagens (direita) e mutantes (esquerda) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625. Microscopia de imersão. Aumento de 400x.....68
13. Ultraestrutura de células selvagens e do mutante 26 de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625. As setas indicam os carboxisomas. Notar a desorganização das membranas do tilacóide. As barras representam 0,6 μm69
14. Efeito da adição de NaCl (25 mM) e HCO_3^- (100 μM) na liberação de oxigênio e fluorescência da clorofila *a* em células selvagens (A) e mutantes (B) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, cultivadas em condições atmosféricas de CO_272
15. Taxa de evolução de oxigênio em função da concentração de carbono inorgânico (C_i). As células foram cultivadas em condições atmosféricas de CO_2 . Selvagem (o) e Mutante (●)78

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - adenosina tri-fosfato; **BTP** - 1,3-bis(tris[hidroximetilamino]-propano; **C_i** - carbono inorgânico; **CO₂** - gás carbônico; **DNA** - ácido desoxi-ribonucléico; **D.O._{730nm}** - densidade ótica no comprimento de onda de 730 nm; **DS** - dietil sulfato; **EMS** - etil-metil-sulfonato; **F₀** - fluorescência do escuro; **F_m** - fluorescência máxima; **F_s** - fluorescência na ausência de “quenching” fotoquímico; **F_v** - fluorescência variável; **F_{vi}** - fluorescência variável inicial; **H⁺** - próton hidrogênio; **HCl** - ácido clorídrico; **HCO₃⁻** - íon bicarbonato; **HCR** - que requer alta concentração de CO₂; **HEPES** - ácido *N*-2-hidroxietilpiperazine-*N'*-2-etanosulfônico; **H₂O** - água; **H₂S** - gás sulfídrico; **NAD⁺** - nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada; **NADH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida; **NADP⁺** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; **K_{CO2}** - constante de Michaelis para a carboxilase; **KHCO₃** - bicarbonato de potássio; **K_{O2}** - constante de Michaelis para a oxigenase; **M-26** - mutante 26; **Na⁺** - íon sódio; **NaCl** - cloreto de sódio; **Na₂CO₃** - carbonato de sódio; **NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida; **NAHCO₃** - bicarbonato de sódio; **NaOH** - hidróxido de sódio; **NDH** - NAD desidrogenase; **NTG** - *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitroguanidina; **O₂** - oxigênio; **3-PGA** - ácido 3-fosfoglicérico; **Pheo** - feofitina; **PSI** - fotossistema I; **PSII** - fotossistema II; **P₆₈₀** - centro de reação do PSII; **P₇₀₀** - centro de reação do PSI; **PRK** - fosforribuloquinase; **Q_A** - plastoquinona A; **Q_B** - plastoquinona B; **QBH₂** - plastoquinona B reduzida; **Ru-5-P** - ribulose 5-fosfato; **RuBP** - ribulose 1,5-bisfosfato; **RuBisCO** Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; **TP** - triose fosfato; **v_{CO2}** - velocidade máxima de carboxilação; **v_{O2}** - velocidade máxima de oxigenação.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MUTANTE DE
CIANOBACTÉRIA *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 COM
ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS.

Autora: THAÍS PRISCILA DE SOUSA E SILVA

Orientador: PROF. DR. CARLOS ALBERTO LABATE

RESUMO

Com a finalidade de se estudar aspectos do metabolismo fotossintético em cianobactérias, um mutante de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 (M-26) foi obtido após exposição a 0,2M do mutagênico químico etil-metil-sulfonato (EMS), e seleção em meio contendo níveis alto (1% CO₂ em ar) e baixo (condições atmosféricas), de carbono inorgânico durante 45 min., no escuro. Análises de microscopia ótica e de transmissão mostraram que o M-26 possui a morfologia alterada (células arredondadas) e desorganização das membranas internas. A afinidade fotossintética aparente

por carbono inorgânico (C_i) extracelular foi menor no M-26 que no selvagem, embora ambos tenham apresentado valores similares de taxa fotossintética máxima. A taxa de respiração no escuro foi significativamente maior no M-26 e a produção de fluorescência da clorofila a foi menor que no selvagem. Além disso, O M-26 não apresentou a típica redução da fluorescência quando C_i foi adicionado ao meio. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que o M-26 é um mutante que apresenta uma menor capacidade fotossintética em condições onde a concentração de C_i é reduzida. As alterações morfológicas e fisiológicas ocorridas sugerem que este mutante apresenta uma deficiência na cadeia de transporte de elétrons dos tilacóides ou na transferência de energia dos ficobilissomas para os centros de reação dos fotossistemas (mecanismo de transição de estado).

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MUTANT OF
CYANOBACTERIA *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 WITH
MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS.

Author: THAÍS PRISCILA DE SOUSA E SILVA
Adviser: PROF. DR. CARLOS ALBERTO LABATE

SUMMARY

A mutant of *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 (M-26) was isolated using 0,2 M EMS (ethyl methanesulfonate), during 45 min. in the dark, as a chemical mutagenic. Light microscopy showed that the mutant is morphologically different from the wild type; the cells are round shaped and observations from transmission microscopy indicated that the mutant has alterations in the internal membranes organization. The apparent photosynthetic affinity for the extracellular *Ci* was lower in the M-26 than in the wild type, but the values of maximum photosynthetic rate were similar for both strains. “Dark” respiration rate was much higher in the M-26 and

the chlorophyll *a* fluorescence yield was lower. In addition, M-26 didn't show the typical fluorescence quenching when *Ci* was added. The results lead us to concluded that M-26 is a mutant which has a lower photosynthetic ability when the *Ci* level is low. The morphological and physiological alterations observed in M-26 suggest that this mutant is deficient in the thylakoid electron transport chain or in the energy transference from the phycobilissomes to the photosystem reaction centers (state transition).

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são por definição procariotos capazes de realizar fotossíntese. Por se tratarem de organismos estruturalmente simples, os processos bioenergéticos ocorrem na mesma célula, muitas vezes, compartilhando os mesmos componentes. Este fato, torna as cianobactérias organismos únicos, e portanto, de grande interesse no estudo da relação existente entre estes processos. Além disso, as cianobactérias também apresentam muitas características comuns às plantas superiores, como por exemplo o aparato necessário para a realização da fotossíntese, possibilitando a sua utilização como organismo modelo para estudo.

A obtenção de mutantes deficientes em vários componentes do processo fotossintético tem sido utilizada para a compreensão de uma série de mecanismos regulatórios. Através da análise fisiológica e bioquímica comparativa entre mutantes e selvagem, muitos aspectos com relação ao comportamento deste organismo em diversas condições ambientais vêm

sendo relatados, permitindo, desta maneira, a formação de um quadro que poderá levar a um conhecimento mais profundo e completo do processo fotossintético não só em cianobactérias, mas também em algas e plantas superiores. A análise de mutantes deficientes no transporte de carbono inorgânico, por exemplo, forneceu evidências da participação da enzima NADH dehidrogenase neste mecanismo, quando sob condições de baixas concentrações de CO₂ (OGAWA, 1990; MARCO et al., 1993); e o mutante D4 (SCHWARZ et al., 1992), incapaz de uma rápida adaptação a condições de baixos níveis de carbono inorgânico trouxe o questionamento da existência de um sistema de transdução de sinal na ativação do mecanismo de concentração ativa de carbono inorgânico em cianobactérias.

Neste trabalho foi obtido e feita a caracterização estrutural e fisiológica de um mutante de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, com deficiência no funcionamento do aparato fotossintético, visando a proposição de questões relacionadas à eficiência de absorção, transferência e aproveitamento de energia e gás carbônico, principais mecanismos que interferem na capacidade fotossintética deste organismo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Características Gerais.

Cianobactérias, também conhecidas como cianofíceas ou algas azul-esverdeadas, são organismos de dimensões microscópicas, com diâmetros que variam entre 2 a 5 μm . Estes microrganismos podem ser encontrados em ambientes de água doce ou salgada como organismos de vida livre ou ainda em associações simbióticas com outros organismos. Apresentam-se como células isoladas de forma esférica, ovóide ou cilíndrica (cianobactérias unicelulares) ou como agrupamento de células interligadas, com forma relativamente regular (cianobactérias filamentosas).

A coloração das cianobactérias, que pode variar de verde, azul-esverdeado, ou verde oliva até várias tonalidades de vermelho a púrpura, ou mesmo preta, é principalmente determinada pela quantidade relativa de ficocianina e ficoeritrina, pigmentos da antena coletora de luz, e uma menor contribuição é devido à clorofila *a* e carotenóides (RIPKKA, 1988).

A reprodução das cianobactérias ocorre por divisão binária (a célula sofre uma fissão, dando origem a duas novas células), ou por fissão múltipla. Algumas cianobactérias apresentam variações no modo como se reproduzem, apresentando estruturas típicas como aquinetes e baeocites. Outras se reproduzem por “budding”, uma variação da reprodução por divisão binária, onde pequenas células filhas são liberadas sucessivamente do ápice terminal de uma célula mãe. Em algumas filamentosas, o tricoma, que é um conjunto de células interligadas por uma única bainha, sofre freqüentemente uma fissão, originando pequenos conjuntos de células denominados hormogônios, que dão origem a um novo tricoma através da divisão binária de suas células (RIPPKA, 1988).

2.2. Classificação.

De acordo com a proposta de Gibbons & Murray¹, citados por RIPKKA (1988), as cianobactérias pertencem ao reino Procaryotae e estão incluídas na divisão Gracilicutes (bactérias com parede celular Gram-negativa), na classe Photobacteria, subclasse Oxyphoto-bacteriae, ordem Cyanobacteriales. Como principais características destes organismos, temos:

¹Gibbons, N.E. & Murray, R.G.E. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, **28**: 1, 1978.

são organismos procariotos de propriedades estruturais diversas; possuem clorofila *a* e ficobiliproteínas; são capazes de realizar fotossíntese oxidativa (utilizando H₂O como doador de elétrons na presença de luz, sendo o oxigênio o produto da atividade fotossintética); algumas realizam fotossíntese não-oxidativa, utilizando H₂S como doador de elétrons; algumas são foto- ou quimioheterotróficas facultativas, porém o crescimento nestas condições é sempre muito menor do que quando realizam fotossíntese; algumas requerem uma fonte de vitamina B₁₂; muitas fixam o nitrogênio atmosférico (RIPKKA, 1988).

De acordo com RIPKKA et al. (1979), as cianobactérias foram classificadas em cinco secções. As secções I e II incluem as unicelulares, sendo que na primeira, a reprodução ocorre por fissão binária ou por “budding” e na segunda, ocorre por fissão múltipla. Na secção III temos as filamentosas que não possuem heterocistos e se dividem em um único plano. As filamentosas que apresentam heterocistos dividem-se em um único plano ou em mais de um, estando classificadas nas secções IV e V, respectivamente.

A cianobactéria utilizada neste trabalho, *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, pertence ao gênero *Synechococcus*, incluído na

secção I. A secção I é subdividida em seis gêneros: *Gloebacter*, *Gloethece*, *Gloecapsa*, *Synechococcus*, *Synechocystis* e *Chamaesiphon*, cujas características principais estão resumidas na chave sistemática apresentada abaixo. As cianobactérias do gênero *Synechococcus* são unicelulares, apresentam membranas do tilacóide, divisão binária em um único plano e ausência de cápsula envolvendo as células.

Secção 1: Cianobactérias unicelulares que se dividem por fissão binária ou “budding”.

- | | |
|---|----------------------|
| 1. Reprodução por “budding”..... | <i>Chamaesiphon</i> |
| Reprodução por fissão binária..... | 2 |
| 2. Ausência de membranas do tilacóide..... | <i>Gloebacter</i> |
| Presença de membranas do tilacóide..... | 3 |
| 3. Presença de cápsula envolvendo as células..... | 4 |
| Ausência de cápsula envolvendo as células..... | 5 |
| 4. Divisão num único plano..... | <i>Gloethece</i> |
| Divisão em dois ou três planos..... | <i>Gloecapsa</i> |
| 5. Divisão num único plano..... | <i>Synechococcus</i> |
| Divisão em dois ou três planos..... | <i>Synechocystis</i> |

2.3. Organização das membranas e inclusões citoplasmáticas.

A grande maioria das células vegetativas de cianobactérias possuem estrutura fina típica, representada esquematicamente na Figura 1.

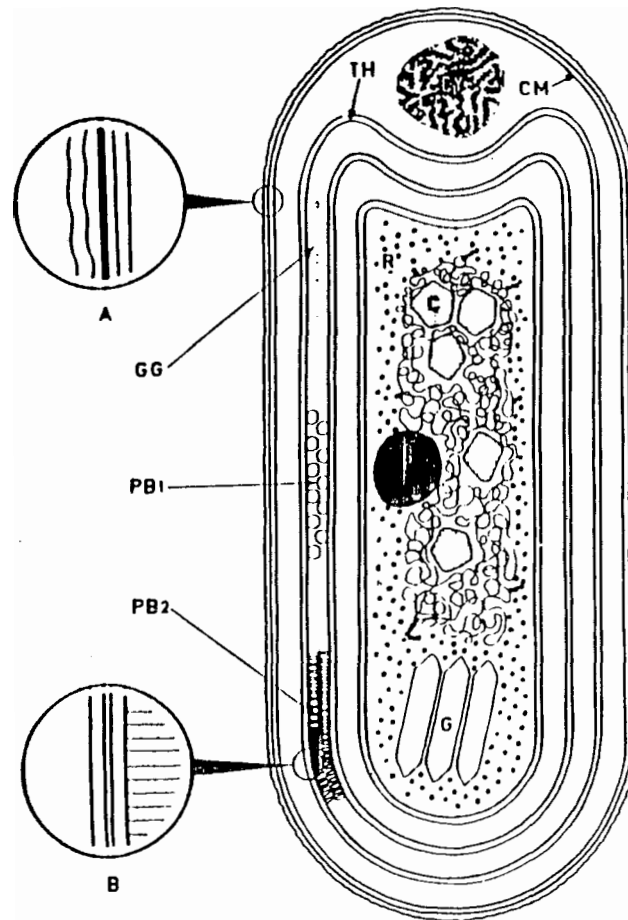


Figura 1. Diagrama esquemático da ultraestrutura de uma cianobactéria. CM, membrana celular; TH, tilacóides; PB1 e PB2, ficobilissomas associados aos tilacóides; GG, grânulos de glicogênio; CY, grânulos de cianoficina; P, grânulos de polifosfato; C, carboxissoma; R, ribossomas. Reproduzido de STAINER & COHEN-BAZIRE (1977).

As cianobactérias possuem três tipos de membranas: a membrana externa, localizada externamente às camadas de polipeptideoglicanos; a membrana plasmática e a membrana interna do tilacóide. A membrana externa, juntamente com as camadas de polipeptideoglicanos constituem o que é denominado parede celular. A membrana externa contém alguns polipeptídeos que parecem estar envolvidos na absorção de várias substâncias do meio externo; as camadas de polipeptideoglicanos, como em bactérias Gram-negativas, funcionam como proteção mecânica e pela sua rigidez também determinam a forma das células. Embora as camadas de polipeptideoglicanos sejam estruturalmente similares àquelas encontradas em bactérias Gram-negativas, a sua composição química apresenta uma maior proximidade às bactérias Gram-positivas. Na realidade, análises da composição das camadas externas de cianobactérias têm demonstrado uma organização da parede celular distinta que não é típica de bactérias Gram-positivas ou negativas (JÜRGENS & WECKESSER, 1985). Embora ainda não se tenha conseguido demonstrar conexões físicas entre a membrana externa e a membrana plasmática, presume-se que estas duas membranas estejam ligadas por um ponto funcional. Como em bactérias, a fosforilação oxidativa, o transporte de

elétrons, o bombeamento de prótons e geração de ATP são também interdependentes e envolvem a ATP sintase, enzimas respiratórias e vários tipos de transportadores. Possíveis conexões entre as membranas plasmática e dos tilacóides são indicadas através de análises em Microscópio Eletrônico; pontos de contato ligando estas duas membranas foram verificados por diversas vezes (KUNKEL, 1982; BALKWILL et al., 1984; STEVENS & NIERZWICKI-BAUER, 1991). A membrana plasmática e as membranas do tilacóide compartilham muitos complexos supramoleculares, no entanto os fotossistemas são restritos a estas últimas. Nas membranas do tilacóide podemos encontrar pigmentos fotossintéticos como clorofila *a*, beta-caroteno e zeaxantina e a estrutura básica para que a fotossíntese oxidativa ocorra. Nas cianobactérias, as membranas do tilacóide estão dispostas como camadas concêntricas de membranas achatadas, paralelas à membrana plasmática (Figura 2). Este tipo de organização é considerada simples pelo fato da membrana ser única e não apresentar a formação de regiões semelhantes aos grana, observados em cloroplastos de plantas. Na verdade, a formação destas regiões em cianobactérias não seria possível, uma vez que os ficobilissomas, complexos formados por proteínas e

pigmentos, estão localizados na superfície da membrana no lado citoplasmático (NILSSON, 1992).

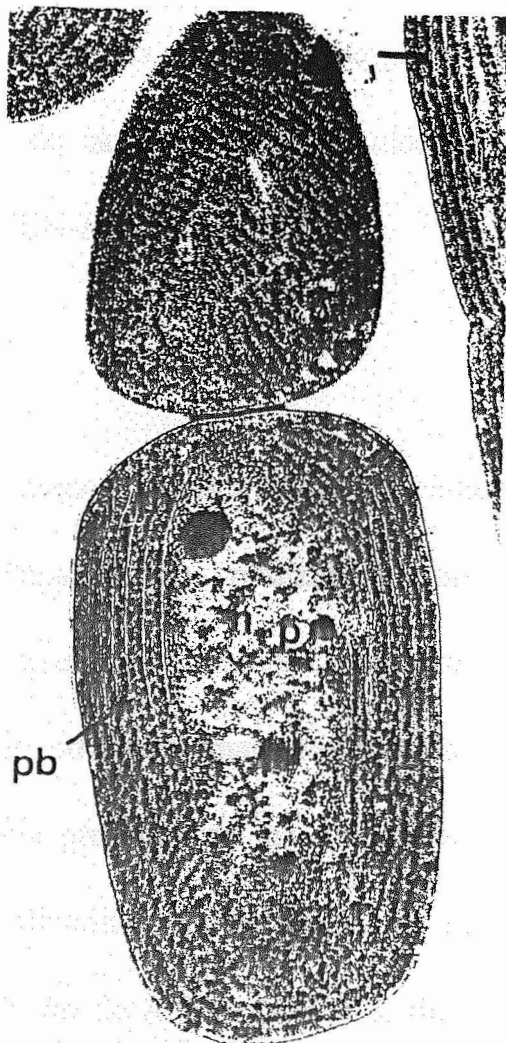


Figura 2. Secção longitudinal de *Pseudanabaena* sp PCC 7408, mostrando algumas das estruturas esquematizadas na Figura 1, tais como membranas do tilacóide (th), ficobilissomas (pb), grânulos de polifosfato (p) e nucleoplasma (n). A barra representa 0,2 μ m. Extraída de STANIER (1988).

No hialoplasma das cianobactérias encontram-se os carboxissomas onde está localizada a enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, responsável pela fixação de CO_2 na fotossíntese; grânulos de cianoficina (polipeptídeo composto pelos aminoácidos arginina e ácido aspártico) cuja função é o armazenamento de nitrogênio; grânulos de glicogênio (reserva de carboidratos); grânulos de polifosfato e ribossomas (STANIER & COHEN-BAZIRE, 1977).

2.4. Fotossíntese.

Assim como plantas e algas, as cianobactérias são organismos fotoautotróficos, capazes de realizar o processo conhecido como fotossíntese, onde a energia luminosa é convertida em energia química, sendo obtidos como produtos finais, compostos ricos em energia (açúcar, amido e lipídios). Na presença de luz, via cadeia de transporte de elétrons nas membranas do tilacóide, ocorre quebra da molécula de água, liberação de oxigênio e produção de ATP e NADPH, dois compostos intermediários ricos em energia. Estes compostos são utilizados como fonte de energia para a redução do *C_i* a açúcar via Ciclo de Calvin (CALVIN, 1954).

2.4.1. Transporte de elétrons nas membranas do tilacóide.

Em cianobactérias, assim como em algas e plantas superiores, os componentes que participam da reação que ocorre na presença de luz estão localizados e associados às membranas do tilacóide (Figura 3).

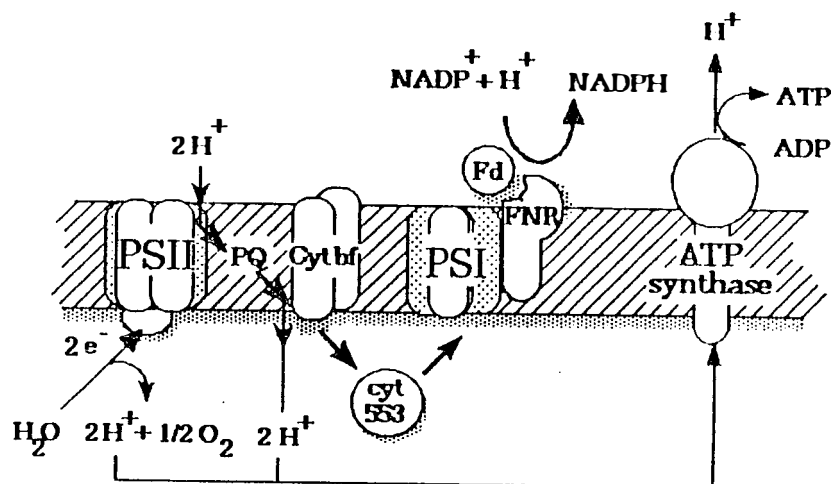


Figura 3. Fluxo linear de elétrons e translocação de prótons durante a reação que ocorre na membrana do tilacóide, em presença de luz. Quatro complexos de proteínas associadas à membrana participam da reação: o fotossistema II (PSII), o complexo citocromo b_6/f (cyt b/f), o fotossistema I (PSI) e a ATP sintase. O citocromo c_{553} é substituído por plastocianina em algumas espécies, como *Synechococcus spp.* Esquema transcrito de NILSSON (1992).

São quatro os complexos protéicos que estão envolvidos nesta reação: o fotossistema II (PSII); o fotossistema I (PS I); a ATP sintase e o citocromo *b₆/f*. PSII e PSI são complexos formados por pigmentos e proteínas, nos quais as fotorreações ocorrem, enquanto que o complexo citocromo *b₆/f* funciona como uma ligação entre os fotossistemas na cadeia linear de transporte de elétrons. A ATP sintase converte o gradiente de prótons, existente entre o lado interno e externo da membrana em energia química na forma de ATP.

A fotorreação mediada pelo PSII pode ser vista como uma redução da plastoquinona transportadora de elétrons e uma oxidação da água, uma reação de incorporação de energia, que é fornecida pelos fótons de luz captados. Os fótons são absorvidos pelos complexos proteína-pigmentos da antena coletora de luz, que consiste principalmente de moléculas de clorofila *a* e *b* em plantas e ficobilinas e clorofila *a* em cianobactérias. A absorção de um fóton permite a excitação de um elétron, sendo que um estado de excitação é formado. Este estado é transferido por energia de ressonância através da antena para os centros de reação (NILSSON, 1992).

No fotossistema II, a energia luminosa capturada é transferida para o doador primário de elétrons do centro de reação do PSII, o P_{680} . A foto-oxidação subsequente do P_{680} a P_{680}^+ parece envolver a oxidação de duas moléculas de clorofila *a* (MICHEL et al., 1986). Um elétron é, então, transferido ao receptor primário de elétrons, uma feofitina. Esta reação, chamada de separação de carga, é a fotorreação primária do PSII. O estado intermediário, $P_{680}^+/Pheo^-$, sendo muito instável, permitiria uma recombinação por troca. No entanto, o elétron é, rapidamente, transferido a um receptor secundário, uma plastoquinona associada (Q_A) (KLIMOV et al., 1980) e finalmente ao receptor de elétrons terminal do PSII, a plastoquinona B (Q_B). A Q_B requer dois elétrons para ser completamente reduzida a Q_B^{2-} . A plastoquinona semi-reduzida, Q_B^- , está fortemente associada ao sítio Q_B do polipeptídeo D1 (componente do complexo PSII). Após à redução da Q_B^- a Q_B^{2-} , esta última é então protonada a Q_BH_2 e liberada do seu sítio de associação. A plastoquinona duplamente reduzida se locomove até o complexo citocromo *b₆/f*, e então, os elétrons são transferidos para a plastocianina (ou citocromo *c₅₅₃*) que contém cobre (Andersson & Styring², citados por NILSSON, 1992).

²Andersson, B. & Styring, S. In: LEE, C.P., ed. San Diego, Academic Press, 1991, p.2-81.

O P_{680}^+ , que é um forte oxidante, é reduzido novamente por elétrons obtidos da água via sistema de evolução de oxigênio e um doador de elétrons intermediário denominado Z. Estudos em *Synechocystis* PCC 6803, envolvendo mutações sítio dirigidas, identificaram o Z como uma tirosina 161 no polipeptídeo D1 (DEBUS et al., 1988; METZ et al., 1989).

A energia luminosa absorvida pelo PSI é utilizada na redução da ferredoxina. Uma molécula de clorofila *a*, localizada no centro de reação P_{700} , é foto-oxidada e um elétron é transferido via uma série de receptores de elétrons até a ferredoxina, que realiza a redução do $NADP^+$ a NADPH. O centro de reação oxidado, P_{700}^+ , é então novamente reduzido por um elétron proveniente da plastocianina.

Resumidamente, a reação luminosa da fotossíntese pode ser dividida em cinco reações principais: i) Redução do “pool” de plastoquinonas pelo PSII, através dos elétrons fornecidos pela reação de quebra da molécula de água em oxigênio e prótons H^+ na presença de luz. Esta reação contribui para a geração de um gradiente de prótons transmembrana pela transferência de prótons H^+ do lado citoplasmático para o lúmen da membrana do tilacóide. ii) Reação de oxirredução da plastocianina-ferredoxina na presença de luz, na qual um elétron é

transferido da plastocianina (ou citocromo₅₅₃) para ferredoxina via PSI. iii) Transferência de elétrons da plastoquinona para a plastocianina via complexo citocromo *b₆f*. Esta reação contribui para a formação de um gradiente através da liberação de prótons no lúmen do tilacóide. iv) Redução do NADP⁺ a NADPH através da reação ferredoxina-NADP⁺ oxirredutase. v) Síntese de ATP pela ATP-sintase. Esta reação é acoplada ao transporte de elétrons através do gradiente de prótons, que é utilizado como energia para a reação (NILSSON, 1992).

Em torno do PSI também pode ocorrer o transporte cíclico de elétrons, que são transferidos da ferredoxina para a plastoquinona ou citocromo *b₆f*, não ocorrendo a produção de NADPH. No entanto, ocorre a geração do gradiente de prótons e a síntese de ATP. Estudos mais recentes (YU et al., 1993; MI et al., 1994) têm demonstrado o envolvimento da enzima NADH desidrogenase mediando esta transferência de elétrons a partir da ferredoxina. Embora o fluxo cíclico de elétrons em torno do PSI não apresente importância relevante para cianobactérias em condições ideais de crescimento, a sua ocorrência parece ser fundamental em condições de estresse, como baixa concentração de CO₂ atmosférico e baixa disponibilidade de nitrogênio (OGAWA, 1991; PELTIER & SCHMIDT,

1991; respectivamente). Embora a importância do transporte cíclico de elétrons em cianobactérias ainda não esteja bem definida, pode-se supor que a necessidade de uma produção extra de ATP em condições estressantes, poderia estar associada à ocorrência deste processo.

2.4.2. Absorção e transferência de energia para os fotossistemas.

A energia luminosa é absorvida em cianobactérias e algas vermelhas por uma antena externa ao PSII, constituída por complexos de pigmentos e proteínas de alto peso molecular (GANTT, 1979). Estes complexos, denominados ficobilissomas, estão associados ao lado citoplasmático da membrana do tilacóide. As ficobilinas, pigmentos acessórios destas proteínas cromatóforicas, absorvem luz de todo o espectro visível com um máximo de absorção em torno de 500-660 nm, fornecendo às células a sua cor característica azul-esverdeada. Os ficobilissomas são formados por hexâmeros de ficoeritrina e ficocianina, ligados ao centro do complexo. Este, por sua vez, está associado aos pigmentos aloficocianina e aloficocianina B e conectado à membrana do tilacóide por uma proteína de alto peso molecular (MARSAC & COHEN-BAZIRE, 1977).

Além de funcionar como antena coletora de luz, os ficobilissomas também constituem uma reserva endógena de nitrogênio, o que pode ser observado durante condições de deficiência de nitrogênio, quando os ficobilissomas são, preferencialmente, degradados (LAU et al., 1977).

Não há relatos de associação estrutural entre o PSI e os ficobilissomas, embora muitos trabalhos demonstrem que a energia de excitação pode ser transferida dos ficobilissomas para o PSI (BUTLER, 1978; LEY & BUTLER, 1980). Não está claro se a energia de excitação é transferida diretamente via um ficobilissoma emissor terminal ou via PSII (MANODORI & MELIS, 1984; LEY & BUTLER, 1980).

Em cianobactérias, a clorofila *a* está principalmente associada à antena coletora de luz do PSI. O tamanho desta antena tem sido relatado como 130-150 moléculas de clorofila *a* por partícula isolada de PSI (LUNDELL et al., 1985). O PSII possui uma antena menor, 35-50 moléculas de clorofila *a* por centro de reação (YAMAGISHI & KATOH, 1985; RÖGER et al., 1990; NILSSON, 1992).

A conversão da energia luminosa, ocorrida nas membranas do tilacóide, é acompanhada por interações cooperativas entre as fotorreações

do PSI e PSII. O balanço entre estas duas fotorreações determina a eficiência da conversão energética, que é garantida por pelo menos dois mecanismos regulatórios: adaptação lenta, relacionada com a proporção entre PSI e PSII (YOCUM & BLINKS, 1958; BRODY & EMERSON, 1959) e adaptação rápida, mecanismo regulatório que controla a distribuição da energia de excitação dos ficobilissomas para os dois fotossistemas (MURATA, 1969).

A transferência de energia dos ficobilissomas para a clorofila *a* do PSI ou PSII é regulada no ponto de transferência entre o ficobilissoma e os fotossistemas, ou em algum ponto entre os fotossistemas. Quando a maioria dos centros de reação do PSII estão fechados, a energia transferida do ficobilissoma para o PSI aumenta, e para o PSII diminui; o oposto ocorre em condições onde a maioria dos centros PSI estão fechados. Esta regulação ocorre em resposta ao estado de balanço entre as duas fotorreações através do monitoramento do estado de oxirredução do transporte de elétrons entre os dois fotossistemas ou do potencial eletroquímico da membrana ao redor dos dois fotossistemas e está relacionada às condições de luminosidade durante o crescimento. Este processo regulatório é chamado de mecanismo de transição de estado ou de “adaptação rápida”, pois pode ocorrer em alguns minutos ou menos (FUJITA et al., 1994).

O modelo recentemente proposto por Kruij et al.³, citados por RÖGNER et al. (1996), combina dados fisiológicos e estruturais na tentativa de explicar como ocorre o mecanismo de transição de estado (Figura 4). Sob condições luminosas que favorecem a reação fotoquímica do PSI (estado 1), os ficobilissomas se associam à forma dimérica do PSII, enquanto que sob condições em que a luz excita preferencialmente o PS2 (estado 2) os ficobilissomas se tornam funcionalmente conectados à forma trimérica do PSI. A redistribuição dos ficobilissomas poderia ser causada pela dissociação dos dímeros de PSII em monômeros e concomitante trimerização do complexo PSI. Alternativamente, no estado 2, os ficobilissomas poderiam ainda estar conectados a um monômero do PSII, antes da dimerização, enquanto o PSI na forma trimérica substituiria o outro monômero do PSII para a formação de uma associação próxima ao PSII.

NILSSON et al. (1992) demonstrou em *Synechocystis* PCC 6803 que a energia de excitação é transferida dos ficobilissomas para o PSI num mutante deficiente em determinadas proteínas do PSII (D1, D2 e CP-47), mas que manteve a proteína CP-43. Isto mostra que o PSII intacto não é necessário para a transferência de excitação para o PSI e sugere que esta

³Kruij, J.; Bald, D.; Boekema, E.; Rögner, M. *Photosynthesis Research*, Dordrecht, 40: 279-86, 1994.

transferência é mediada diretamente por um ficobilissoma terminal ou via CP-43.

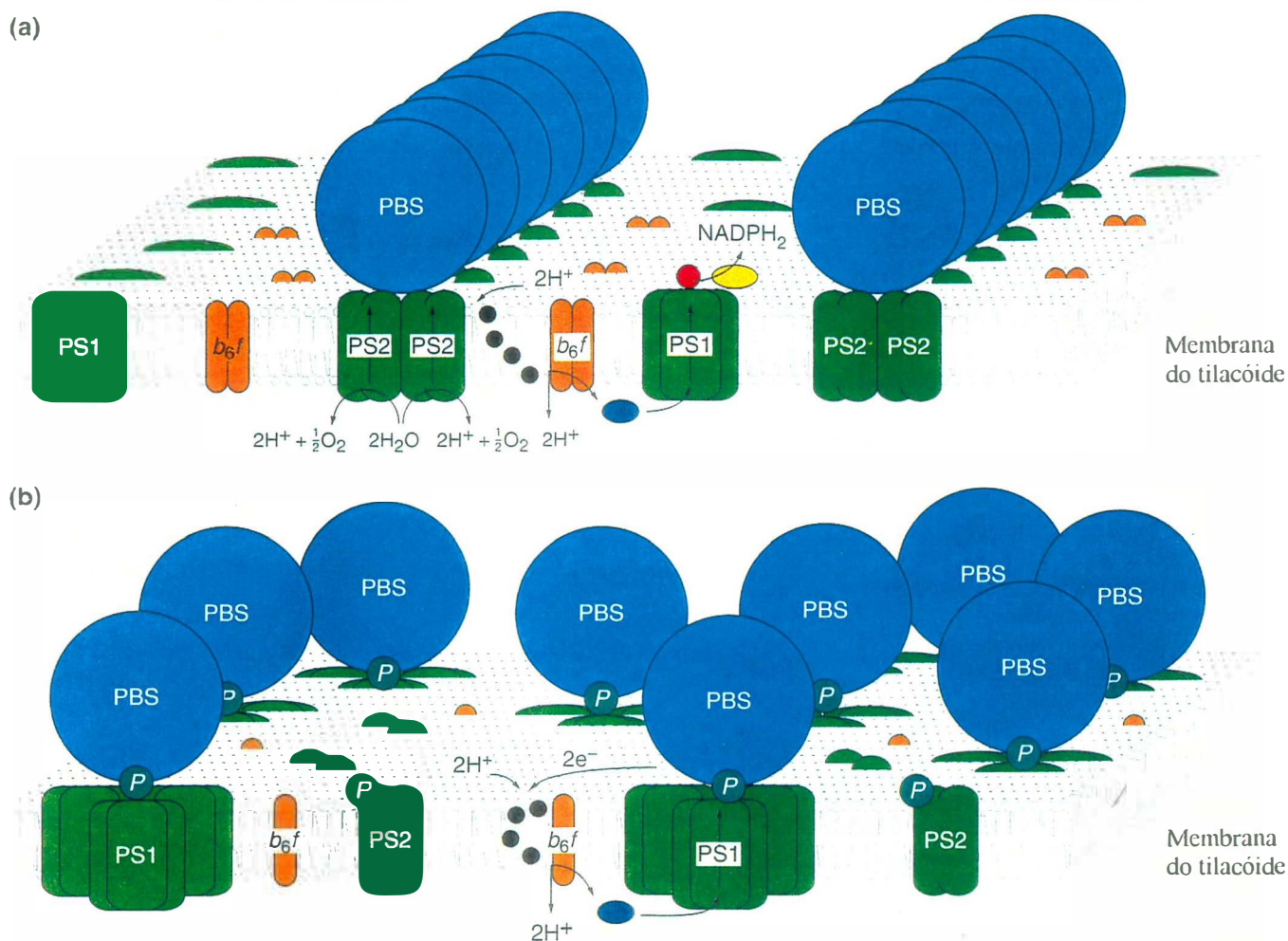


Figura 4. Modelo do mecanismo de transição de estado nas membranas do tilacóide de cianobactérias, extraído de RÖGNER et al. (1996); (a) estado 1 (favorecendo o fluxo linear de elétrons, com os complexos PSII e citocromo b_6/f na forma dimérica e PSI monomérico) e (b) estado 2 (favorecendo o fluxo cíclico de elétrons, com os complexos citocromo b_6/f monomérico e PSI trimérico; o PSII monomérico não está envolvido). Os componentes destacados na figura são fotossistemas I (PSI) e II (PSII) em verde, citocromo b_6/f (laranja), plastoquinona (círculos pretos), plastocianina (azul marinho), ferredoxina (vermelho) e a ferredoxina- $NADP^+$ oxirredutase (amarelo). O sistema ficobilissoma coletor de luz (PBS) está em azul claro. Para maior simplicidade, outros componentes da membrana do tilacóide foram omitidos.

2.4.3. Fixação do CO₂ via Ciclo de Calvin.

O dióxido de carbono (CO₂) é a fonte de carbono preferida pelas cianobactérias, mesmo quando são capazes de realizar metabolismo fotoheterotrófico ou de crescer sob condições quimioheterotróficas no escuro. A via redutiva das pentose-fosfato de Calvin é, sem exceção, o mecanismo primordial, através do qual as cianobactérias metabolizam e reduzem o CO₂. Para que a redução do dióxido de carbono a carbono inorgânico (C_i) ocorra, grande quantidade de força assimilatória (NADPH) e ATP são requeridos, o que torna aparente a existência de uma ligação entre as reações de redução de CO₂ e a produção efetiva de energia ocorrida no transporte de elétrons nas membranas do tilacóide.

As reações do ciclo de Calvin, relacionadas diretamente com a fixação do CO₂, são catalisadas pelas enzimas Fosforribulosequinase (PRK = ATP:D-ribulose 5-fosfato 1-fosfotransferase) e Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RubisCO = 3-fosfo-D-glicerato carboxilase). A RubisCO, localizada no carboxissoma, catalisa a primeira reação de fixação de CO₂, adicionando-o ao substrato ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) e produzindo duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA). O metabolismo subsequente dos produtos da reação carboxilase (3-PGA),

através de uma série de reações redutoras, permite a produção de uma molécula de triose fosfato (TP), e a formação de ribulose 5-fosfato (Ru-5-P). A atividade da enzima PRK é importante para a regeneração da RuBP, a partir da Ru-5-P (Figura 5).

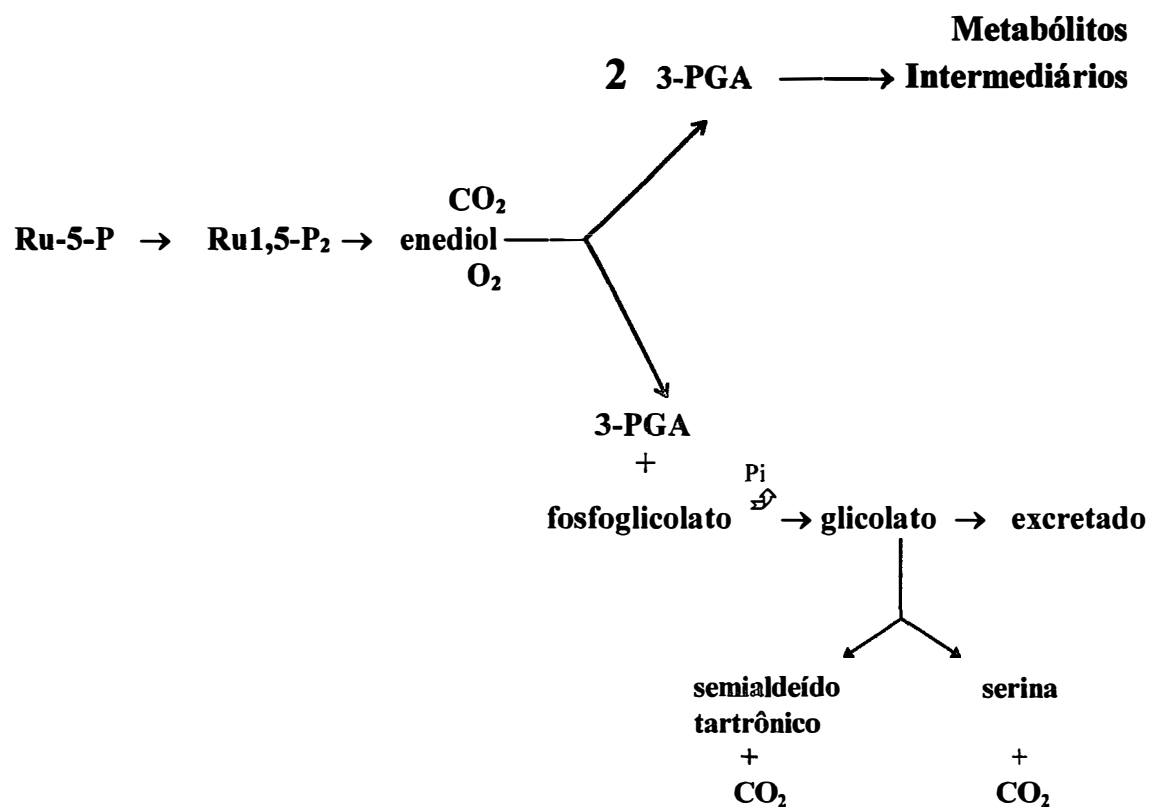


Figura 5. Esquema mostrando as reações catalisadas pelas enzimas RuBisCO e PRK e o destino metabólico dos produtos das reações.

Além de catalisar a carboxilação da RuBP para a produção de duas moléculas de 3-PGA, a mesma enzima RuBisCO também pode realizar a fixação de O₂ numa reação dependente de RuBP, uma vez que o enediol de RuBP é clivado como uma consequência da adição de O₂ para a produção de uma molécula de 3-fosfoglicerato e duas de ácido fosfoglicólico (Figura 6). Esta reação alternativa foi descoberta após a verificação de que o O₂ é um inibidor competitivo do CO₂ na fixação deste último (BOWES & OGREN, 1972). Desta forma, a RuBisCO possui uma função dupla na catálise de dois passos importantes no metabolismo fotossintético e fotorrespiratório, a fixação de CO₂ e a quebra de RuBP para produção de fosfoglicolato, dependente de O₂, respectivamente. A habilidade da enzima de discriminar entre CO₂ e O₂ é referida como um fator de especificidade (σ), $v_{CO_2}K_{O_2}/v_{O_2}K_{CO_2}$, onde v_{CO_2} e v_{O_2} são a velocidade máxima de carboxilação e oxigenação, respectivamente, e K_{CO_2} e K_{O_2} são as constantes de Michaelis para a carboxilase e oxigenase, respectivamente. Em cianobactérias, a afinidade da RuBisCO pelo CO₂ é muito baixa, quando comparamos estes organismos às plantas superiores, o que levaria a uma desvantagem na competição com o O₂ pela enzima. No entanto, o desenvolvimento de mecanismos ativos de concentração do carbono inorgânico em condições de

baixo CO_2 , permite a saturação da RuBisCO por este substrato, compensando o seu alto K_{CO_2} (TABITA, 1994).

2.5. Respiração.

A respiração em cianobactérias é única em vários aspectos. A fotossíntese oxidativa e a respiração aeróbica não estão separadas em organelas como ocorre em plantas, mas estão ativas no mesmo compartimento. Além disso, pelo menos algumas cianobactérias contêm duas cadeias respiratórias completas e distintas, sendo uma localizada na membrana plasmática e outra nas membranas do tilacóide. Em cianobactérias, componentes que não estão envolvidos no processo respiratório de outros organismos fazem parte da cadeia respiratória de transporte de elétrons, tais como NADPH, plastoquinona e um complexo citocromo *b₆f* semelhante àquele encontrado em cloroplastos. É muito provável que plastoquinona e citocromo *b₆f* sejam compartilhados pelas cadeias fotossintética e respiratória de transporte de elétrons, indicando que os dois processos estão intimamente relacionados (AOKI & KATOH, 1982; PESCHEK & SCHMETTERER, 1982; SANDMANN & MALKIN, 1984, MINAMI et al., 1992; FORK & HERBERT, 1993) (Figura 6).

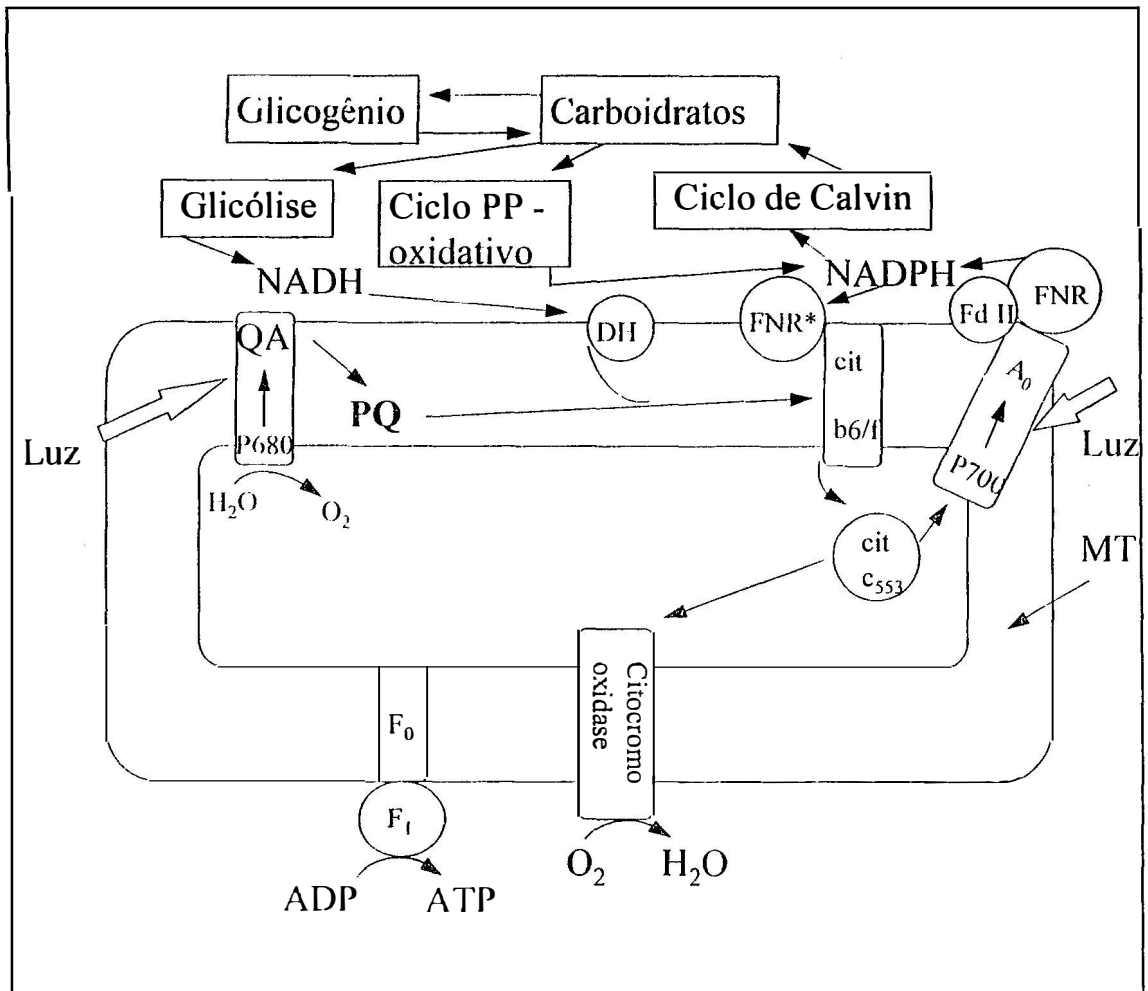
MP
↙

Figura 6. Esquema mostrando a interação entre os processos fotossíntese e respiração numa cianobactéria. Cit *b₆f*, complexo citocromo *b₆f*; Cit *c₅₅₃*, citocromo *c* solúvel, plastocianina em algumas espécies; DH, NADH desidrogenase; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP⁺ redutase, ativa na luz; FNR*, FNR ativa no escuro como NADPH desidrogenase; F₀F₁, ATP sintetase; PP, pentose fosfato; P₆₈₀ → Q_A, fotossistema II; P₇₀₀ → A₀, fotossistema I; PQ, plastoquinona. Modificado de SCHERER et al. (1988).

A relação entre os processos fotossintético e respiratório foi, inicialmente verificada nos experimentos de JONES & MYERS (1963), que estudando a absorção de oxigênio por *Anacystis nidulans*, observaram a inibição da respiração, sob luz com comprimentos de onda absorvidos preferencialmente pelo PSI. SANDMANN & MALKIN (1983) também verificaram a inibição da respiração pela luz em esferoplastos de *Aphanocapsa*, e constataram a ocorrência da doação de elétrons de NADPH e NADH para os sistemas de transporte de elétrons fotossintético e respiratório. Embora, pouco se saiba a respeito das enzimas envolvidas na mediação de elétrons para a cadeia respiratória, assim como sobre o sistema enzimático envolvido no fluxo cíclico de elétrons ao redor do PSI, pode-se imaginar que o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, localizada nas membranas do tilacóide, tem início na plastoquinona, que pode receber elétrons via uma desidrogenase (respiração) ou via PSII (fotossíntese). Estudos mais recentes, utilizando mutantes deficientes na enzima NAD desidrogenase (NDH), têm mostrado evidências de que esta enzima é a desidrogenase doadora de elétrons para a plastoquinona no fluxo respiratório e que também está envolvida no transporte cíclico de elétrons ao redor do PSI (MI et al, 1992 ab; MI et al., 1992b; MI et al., 1994). A partir da

plastoquinona, os elétrons são provavelmente, doados para o complexo citocromo *b₆/f*, que por sua vez, fornece elétrons para o citocromo *c₅₅₃* ou plastocianina, dependendo da espécie. A oxidação do citocromo *b₆/f* pelo O₂ no escuro e pelo PSI na luz foi demonstrada em *Synechococcus* PCC 6301 por PESCHEK (1984). Em membranas de *Synechocystis* PCC 6714, SANDMANN & MALKIN (1984) verificaram, na presença de NADH, um aumento na oxidação do citocromo *c₅₅₃* quando cianeto foi adicionado, mostrando que o citocromo *c₅₅₃* doa elétrons para o PSI e para a oxidase respiratória terminal, provocando uma competição por elétrons entre estes dois complexos. Embora não haja dados *in vivo*, o citocromo *c₅₅₃* é considerado um possível doador para o PSI e citocromo oxidase.

FUJITA et al. (1987) e ADHIKARY et al. (1990) estudaram a atividade respiratória em *Synechocystis* PCC 6714, através da absorção de O₂ por células intactas em função do regime de luz fornecido. Estes autores verificaram uma maior atividade respiratória sob luz preferencialmente excitando o ficobilissoma, desta forma, o PSII e menor sob luz excitando a clorofila *a*, o PSI. Uma vez que a taxa respiratória é limitada no passo terminal do sistema de transporte de elétrons, a alteração na atividade respiratória levou os autores a sugerirem que a atividade da enzima

citocromo oxidase é influenciada pelo regime de luz fornecido para a fotossíntese, responsável pelas alterações na abundância dos complexos PSI. GU et al. (1994) observaram uma maior atividade desta enzima sob luz absorvida preferencialmente pelo PSII (maior abundância de PSI) do que sob luz absorvida pelo PSI (redução na abundância de PSI). Os autores sugerem que nesta espécie, a capacidade de “turnover” dos componentes terminais do sistema de transporte de elétrons nas membranas do tilacóide (citocromo oxidase e PSI) sofrem alterações paralelas em resposta ao estado do sistema.

2.6. Emissão de fluorescência da clorofila *a*.

A cinética de fluorescência da clorofila *a* pode ser um bom indicador de alterações no funcionamento do aparato fotossintético (SIVAK & WALKER, 1985, BRIANTAIS et al., 1986, SCHREIBER et al., 1986). Quando células, cloroplastos intactos, ou folhas são iluminados depois de um período de escuro, a indução da fluorescência segue um padrão típico que é conhecido como o efeito Kautsky (LAVOREL & ETIENNE, 1977; SIVAK & WALKER, 1985, FORK & SATOH, 1986). Avanços na metodologia e na compreensão dos fatores que afetam a emissão da fluorescência tornaram possível a interpretação deste efeito como uma reflexão de alterações

específicas da transdução de energia no aparato fotossintético relacionado à indução do período de fixação de CO₂ (GOVINDJEE et al, 1986, SCHREIBER et al., 1986), permitindo o seu uso no diagnóstico de estresse e modificações químicas e genéticas.

Em cianobactérias o padrão de fluorescência da clorofila *a* é um pouco diferente daquele observado em plantas, não sendo constatado o efeito Kautsky. A fluorescência máxima só é atingida após alguns minutos a partir do início da iluminação das células com luz actínica e esgotamento do *Ci* do meio. Ainda não se sabe exatamente o que leva as cianobactérias a apresentarem um padrão da emissão de fluorescência diferente daquele apresentado por algas e plantas superiores. Em cianobactérias, as ficobiliproteínas constituem os principais pigmentos da antena coletora de luz, transferindo a energia de excitação para o fotossistema II, enquanto que em algas e plantas superiores, esta função é desempenhada pelos complexos clorofila *a/b*-proteína, ausentes em cianobactérias. Além disso, nestes organismos, as cadeias de transporte de elétrons fotossintética e respiratória compartilham intermediários comuns, tais como o “pool” de plastoquinona e o complexo citocromo *b₆f* (SANDMANN & MALKIN, 1984; SCHERER et al., 1988), cujo estado de oxirredução depende das atividades respiratória

e fotossintética relativas das células, podendo determinar os estados de transição (FORK & SATOH, 1986).

2.7. Características do padrão de emissão da fluorescência.

A cinética da fluorescência da clorofila em células de *Anacystis nidulans* adaptadas ao escuro, obtida através do uso de um sistema modulado e procedimento experimental geral previamente empregado em folhas (SCHREIBER et al., 1986) e cianobactérias (SIVAK & VONSHAK, 1988) está ilustrado na Figura 6. A fluorescência inicial ou fluorescência do escuro, F_0 , é monitorada a partir do fornecimento de um feixe de luz extremamente fraco às células. A exposição a um pulso único de luz saturante, que em folhas permite a determinação da produção de fluorescência máxima, F_m , somente produz um pequeno aumento na emissão de fluorescência. Em cianobactérias, a fluorescência só sofre um grande aumento depois que a luz actínica é ligada, normalmente, chamado de fluorescência variável inicial (F_{vi}). Pulsos saturantes e repetitivos aumentam a produção de fluorescência para F_s , sendo este aumento atribuído à abolição do “quenching” fotoquímico (SCHREIBER et al., 1986). O “quenching” (redução da emissão de fluorescência) fotoquímico se origina da conversão

da energia fotoquímica nos centros de reação do PSII. Quando o acceptor primário de elétrons Q_A está oxidado, é capaz de receber elétrons, provocando uma diminuição da emissão de fluorescência. Por outro lado, se a plastoquinona Q_A está reduzida, parte da energia de excitação é dissipada na forma de fluorescência. Quando os pulsos e a luz actínica são desligados (com o feixe de luz fraca ainda ligado), a fluorescência vagorosamente declina ao nível F_0 . O padrão da cinética da fluorescência é similar na presença ou ausência de bicarbonato; o efeito Kautsky não é aparente em nenhum caso. No entanto, quando concentrações saturantes de $NAHCO_3$ estão presentes (Figura 7A) uma taxa estável de evolução de O_2 é alcançada após o período de indução e ambos, F_v e F_s diminuem vagorosamente, à medida que a evolução de O_2 procede, indicando que a energia luminosa está sendo usada na fixação de CO_2 . O grau de $F_s - F_v$, que depende do estado de oxirredução da cadeia transportadora de elétrons, aumenta, à medida que F_v decresce. Isto indica que o principal componente do “quenching” da fluorescência sob estas condições representa o “quenching” fotoquímico. Na ausência de $NAHCO_3$ (Figura 7B), a taxa de evolução de O_2 é muito baixa, correspondendo à assimilação do CO_2 dissolvido no meio, e não é observado um decréscimo significativo de F_v . Sob estas condições, o valor de $F_s - F_v$ é

pequeno (cerca de um terço daquele obtido na presença de NaHCO_3) e não se altera durante o experimento (ROMERO et al., 1992).

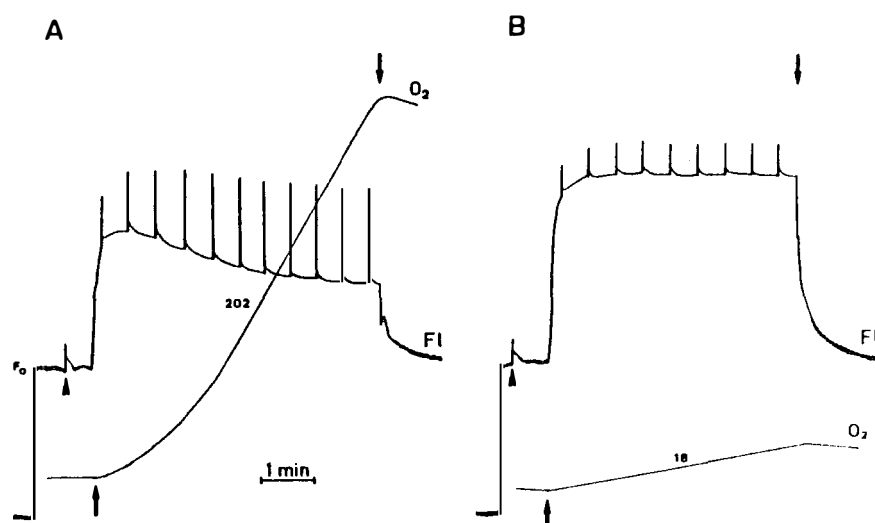


Figura 7. Cinética da fluorescência da clorofila e evolução de O_2 em células intactas de *A. niculans* iluminadas na presença (A) ou ausência (B) de NaHCO_3 10 mM. A fluorescência do escuro F_0 foi monitorada em células adaptadas ao escuro e um pulso único de luz saturante (Δ) foi aplicado. Durante iluminação actínica ($700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), Pulsos repetitivos de luz saturante foram aplicados. As flechas indicam feixe de luz actínica ligado (\uparrow) e desligado (\downarrow). Figura extraída de ROMERO et al. (1992).

Os dados obtidos a partir do procedimento descrito acima não podem ser convertidos em coeficientes de “quenching” fotoquímico e não-fotoquímico da mesma maneira que são calculados para plantas superiores (SCHREIBER et al, 1986) porque a produção de fluorescência ultrapassa os limites dos valores teóricos $F_m - F_0$. Neste caso, não se tem indicação do valor real de F_m , quando se aplica o pulso de luz saturante, sendo que apenas a fluorescência variável inicial pode ser tomada como um ponto de referência. Esta variação com respeito ao comportamento observado em plantas superiores pode ser devida a uma rápida transição do estado II para o estado I nas células de *Anacystis*. Sob as condições experimentais de comprimentos de onda de excitação e detecção, normalmente utilizadas para a detecção da fluorescência em temperatura ambiente, a fluorescência se origina quase que exclusivamente do fotossistema II (FORK & MOHANTY, 1986; FORK & SATOH, 1986; MULLINEAUX & ALLEN, 1986; WILLIAMS & DOMINY, 1990). Em *Anacystis*, o estado do escuro tem sido identificado como o estado II, o estado de baixa fluorescência, uma vez que o “pool” de plastoquinona e o complexo citocromo *b₆/f* estão parcialmente reduzidos pela respiração ocorrida no escuro (MULLINEAUX & ALLEN, 1986; DOMINY & WILLIAMS, 1987; WILLIAMS &

DOMINY, 1990). A iluminação com luz absorvida pelo fotossistema I (700nm) produz uma transição para o estado I, o estado de alta fluorescência (FORK & SATOH, 1983; MULLINEAUX & ALLEN, 1986; WILLIAMS & DOMINY, 1990). Quando células adaptadas ao escuro são iluminadas com um pulso de luz saturante, a emissão de fluorescência observada corresponderia ao estado de baixa fluorescência (estado II), porém após a iluminação com luz actínica, uma transição para o estado I ocorreria. Estes estados de transição podem mascarar o efeito Kautsky (FORK & SATOH, 1986), conferindo um padrão de indução de fluorescência diferente daquele observado em plantas.

Em cianobactérias, a fluorescência da clorofila *a* é utilizada no estudo do sistema de bombeamento ativo de C_i , relacionando-se a diminuição da fluorescência da clorofila *a* com a concentração interna de carbono inorgânico (MILLER et al., 1991). ESPIE et al. (1991), através da análise simultânea de fluorescência e de transporte, verificou que a redução da taxa inicial de fluorescência da clorofila *a* está correlacionada linearmente com a taxa inicial de acumulação de carbono inorgânico, mediada pelo sistema de transporte ativo de carbono inorgânico. Embora o mecanismo através do qual ocorre a diminuição da fluorescência ainda não esteja bem

definido, este parâmetro vem sendo largamente utilizado como monitor do transporte ativo de carbono inorgânico (ESPIE et al, 1991; ESPIE & KANDASAMY, 1992; McKAY et al, 1993; CROTTY et al., 1994).

A adição de NaHCO_3 às células de *Anacystis nidulans* durante iluminação produz um declínio na fluorescência (Figura 8). F_v diminui por volta da metade de F_{vi} ; F_s também diminui, porém em menor extensão. A diferença entre os dois reflete o “quenching” fotoquímico produzido pela fixação de CO_2 . A alta taxa de evolução de O_2 apresentada pelas células nestas condições vem corroborar com os dados de fluorescência (ROMERO et al., 1992).

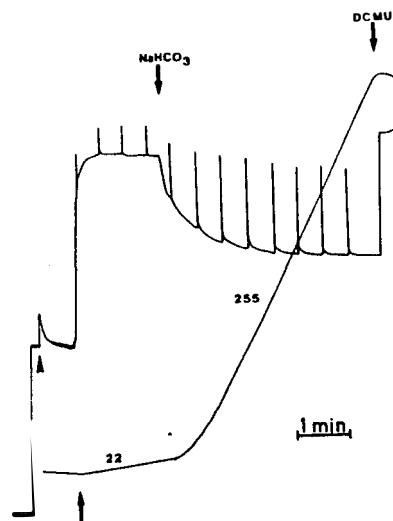


Figura 8. Efeito da adição de NaHCO_3 (10 mM) e DCMU (10 μM) na cinética da fluorescência da clorofila *a* e curva de liberação de O_2 em células intactas de *A. nidulans*, adaptadas ao escuro. A flecha (\uparrow) indica luz actínica ligada. Figura adaptada de ROMERO et al. (1992).

2.8. Mecanismo de concentração de carbono inorgânico.

2.8.1. Transporte ativo de carbono inorgânico.

O sistema de transporte de carbono inorgânico (*C_i*) é de central importância no funcionamento do mecanismo de concentração de carbono (CCM) e permite que a cianobactéria adquira e concentre ativamente *C_i* do meio externo. Quando este processo de transporte é completamente induzido, as células adquirem a capacidade de utilizar tanto CO₂ como HCO₃⁻ (BADGER & ANDREWS, 1982; MILLER et al., 1990). O mecanismo, através do qual o transporte ocorre não está bem estabelecido, havendo dúvidas a respeito de se tratar de um único mecanismo para o transporte de ambas as formas de *C_i* (CO₂ e HCO₃⁻) ou se existem mecanismos independentes de transporte. Dois modelos para um mecanismo de transporte único foram propostos, um deles envolvendo um transportador central de HCO₃⁻ (VOLOKITA et al., 1984) e o outro um transportador comum de CO₂ (PRICE & BADGER, 1989a). A existência de dois mecanismos é defendida por MILLER et al. (1990) e KATOH et al. (1995).

O modelo de transporte único, no qual o bombeamento de *C_i* utiliza tanto CO₂ como HCO₃⁻ como substrato é sustentado através de

evidências que incluem: (1) o transporte de ambos ser inibido por ethoxizolamida, inibidor da anidrase carbônica (PRICE & BADGER, 1989a); (2) a atividade de transporte de ambos ser inibida por COS, um análogo do CO_2 (BADGER & PRICE, 1990); (3) evidências de que o HCO_3^- é a única espécie de *Ci* que entra no interior da célula (PRICE & BADGER, 1989a); (4) resultados que indicam a competição entre CO_2 e HCO_3^- durante o processo de transporte (VOLOKITA et al., 1984); (5) dois mutantes de *Synechocystis* PCC 6803, que requerem alta concentração de CO_2 , e que são deficientes no transporte de *Ci*, mostram inativação do transporte de ambos, CO_2 e HCO_3^- (OGAWA, 1990).

Um possível modelo para a operação do transportador único de *Ci*, localizado na membrana plasmática, é descrito em BADGER & PRICE (1992). Os autores propõem que o transportador central tenha propriedades de anidrase carbônica, o que permitiria a conversão do CO_2 , na superfície externa, para HCO_3^- , que seria liberado para o interior da célula. Este transportador também poderia aceitar o HCO_3^- no estado protonado e liberá-lo, da mesma forma para o interior da célula. Isto ocorreria via uma reação catalisada por uma base, podendo ser mediada pela presença de um metal

como o zinco, no sítio ativo. Além disso, este sítio ativo poderia também aceitar HCO_3^- se este estivesse no estado protonado. A absorção de HCO_3^- seria energizada pela geração de espécies de metais hidroxilados e estaria conectada à cadeia de transporte de elétrons nas membranas do tilacóide, assim como à cadeia de transporte de elétrons na membrana plasmática. A absorção de HCO_3^- seria facilitada pela geração de uma forma protonada do metal, e este poderia estar conectado a uma ATPase que faria o bombeamento de H^+ na membrana plasmática.

Argumentos para a existência de mecanismos de transporte múltiplos provém de estudos de efeitos diferenciais do Na^+ no transporte de CO_2 e HCO_3^- (MILLER et al., 1990). O transporte de HCO_3^- em algumas culturas requer níveis mM de Na^+ para sua atividade, enquanto a absorção de CO_2 requer somente concentrações μM . Além disso, para células crescidas a concentrações de C_i muito baixas, onde o HCO_3^- tem maior importância no total de C_i absorvido, a absorção deste íon parece ser insensível ao Na^+ . Mais recentemente, KATOH et al. (1995) obtiveram mutantes que apresentam deficiência no transporte de CO_2 , mas que possuem fenótipo igual ao selvagem quando HCO_3^- é adicionado ao meio,

sugerindo mecanismos de transporte independentes para CO_2 e HCO_3^- . O gene que por complementação devolve o fenótipo normal aos mutantes foi identificado e denominado *cotA*. Os autores sugerem que a proteína codificada pelo gene *cotA* pode ser um transportador de CO_2 , ou então, uma proteína envolvida no sistema de transporte de CO_2 .

Pouco tem sido feito para a compreensão dos mecanismos relacionados à energização do transporte de *Ci*. Claramente, o transporte de *Ci* é conectado ao transporte fotossintético de elétrons e geração de ATP, (BADGER, 1987). Trabalhos recentes têm demonstrado que há um estímulo da fotorredução do oxigênio durante períodos de transporte de *Ci*, diferente da fixação fotossintética de carbono, sugerindo que o fluxo pseudo-cíclico de elétrons poderia ser importante na energização do mecanismo de absorção de *Ci* (MILLER et al., 1988; 1991; MARCO et al., 1993). Além disso, a produção de fluorescência *a* é também fortemente diminuída pela acumulação interna de carbono inorgânico em células de cianobactéria (MILLER & CANVIN, 1987; MILLER et al., 1988a; MILLER et al., 1988b; MILLER et al., 1988c; MILLER et al., 1991).

2.8.2. O carboxissoma como sítio de concentração de CO₂.

Carboxissomas são estruturas pequenas poliédricas, formadas por proteínas, que estão presentes em ambos tipos de células: células crescidas em alta e baixa concentrações de CO₂. No entanto, em células crescidas em altas concentrações de CO₂, o número de carboxissomas por células é consideravelmente menor, ocorrendo o aparecimento de carboxissomas com estruturas deformadas (McKAY et al., 1993).

REINHOLD et al. (1989) propuseram um modelo teórico para explicar o funcionamento do mecanismo de concentração de C_i , onde o carboxissoma é um importante componente desse sistema. Os carboxissomas contém praticamente toda a RuBisCO presente nas células, criando um microambiente ideal para o seu funcionamento. Segundo o modelo proposto, a estrutura protéica que compõe o carboxissoma possui uma característica particular que impediria a difusão de gases como CO₂ e O₂, mas seria permeável aos íons HCO₃⁻ e RuBP⁴⁻. Ao centro do carboxissoma estaria localizada a enzima Anidrase Carbônica, responsável pela transformação do HCO₃⁻ em CO₂ em torno da Rubisco. O HCO₃⁻ que se difunde através do citosol até o carboxissoma seria rapidamente transformado em CO₂ pela anidrase carbônica, saturando a enzima.

Vários trabalhos apresentam evidências circunstanciais que corroboram o modelo acima descrito. PIERCE et al. (1989) produziram um mutante através da troca dos genes da RuBisCO nativa (L8S8) por aqueles da *Rhodospirillum rubrum* (L2), cujo fenótipo é caracterizado pelo requerimento de alta concentração de CO₂. Este mutante (PCC 6803 cyanorubrum) possui a RuBisCO de *R. rubrum* solúvel e ausência de carboxissomas, proporcionando uma das primeiras indicações de que os carboxissomas deveriam ter uma importância central na operação do mecanismo de concentração de carbono. PRICE & BADGER (1989b) expressaram o gene da anidrase carbônica humana (HCA II) no citosol de células de *Synechococcus* PCC 7942, obtendo um fenótipo que perdeu a capacidade de acumular C_i internamente, sendo dependente de alta concentração de CO₂ no meio externo para o seu desenvolvimento. Esses resultados indicaram que a presença da anidrase carbônica no citosol resulta num aumento na conversão de HCO₃⁻ em CO₂ e conseqüente difusão para o meio externo através da membrana plasmática. Dessa forma, o único local onde a anidrase carbônica poderia estar localizada era dentro do carboxissoma, próxima à RuBisCO para que a perda de CO₂ por difusão

fosse mínima. Este mutante proporcionou a confirmação direta de vários aspectos do modelo baseado na função centralizadora do carboxissoma.

2.9. Obtenção e seleção de mutantes em cianobactérias.

Os métodos clássicos para indução de mutação são largamente aplicados para cianobactérias unicelulares e também para as espécies filamentosas. HERDMAN & CARR (1972), utilizando luz ultravioleta e *N*-metil-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) para a obtenção de mutantes em *Synechococcus* UTEX 625, verificaram que o tratamento químico (NTG) produziu uma maior frequência de mutação. Os mutagênicos químicos proporcionam meios para produção de uma variedade de lesões gênicas ao acaso. CHAPMAN & MEEKS (1987) estudando os parâmetros que afetam a frequência de mutação induzida por NTG em *Anabaena* ATCC 29413, concluíram que a concentração do agente mutagênico e o tempo de exposição não são variáveis importantes, quando estudadas separadamente. No entanto, a combinação destas duas variáveis é que produz 99% de letalidade para a obtenção da maior frequência de mutantes. O pH da incubação também apresentou forte influência na frequência de mutação.

Os mutagênicos químicos utilizados na indução de mutação pontual (alteração de uma única base do DNA) são divididos em quatro grupos: análogos de bases nitrogenadas, ácido nitroso, hidroxilamina e agentes alquilantes. Os primeiros atuam substituindo uma base do DNA e causando um pareamento errado na duplicação. O ácido nitroso pode provocar desaminações nas bases citosina e guanina, ocasionando mutação por substituição de pares de bases. A hidroxilamina atua sobre a citosina, que passa a se comportar como uma timina no pareamento das fitas de DNA. Os alquilantes, por sua vez, etilam ou metilam uma base, normalmente a guanina, provocando uma depurinização no DNA. Ou seja, a guanina alquilada sai da molécula do DNA, permitindo que qualquer base preencha este espaço no momento da duplicação. Os mutagênicos químicos que têm mostrado uma maior eficiência na obtenção de mutantes em cianobactérias são aqueles pertencentes ao grupo dos alquilantes, como dietil sulfato (DS), NTG, EMS (etil-metil-sulfonato), nitrogênio-mostarda e outros (GOLDEN, 1988).

Os procedimentos para a obtenção de mutantes em cianobactérias, que vem sendo largamente empregados foram adaptados de procedimentos mutagênicos desenvolvidos para cianobactéria (HERDMAN

& CARR, 1972) associados à seleção de mutantes em meio permissivo e não permissivo. A seleção de mutantes que crescem em condições de elevada concentração de CO₂, mas que apresentam menor ou nenhum crescimento em condições atmosféricas, foi primeiramente utilizada em organismos fotossintéticos por Sommerville e colaboradores (SOMMERVILLE & OGREN, 1982) para a seleção de mutantes fotorrespiratórios. Em seguida, adaptados para a alga *Chlamydomonas reinhardtii* por SPALDING et al. (1983) para o isolamento de mutantes deficientes no mecanismo de concentração de carbono inorgânico. Kaplan e colaboradores (MARCUS et al., 1986) foram os primeiros a aplicar às cianobactérias técnicas para o isolamento de mutantes que apresentam crescimento diferenciado em condições de baixa concentração de CO₂.

2.10. Mutantes de cianobactérias, deficientes no metabolismo fotossintético.

Muitos mutantes deficientes no metabolismo fotossintético vêm sendo obtidos, tanto por mutagênese química como também por mutação sítio-dirigida. Nestes últimos estão incluídos os mutantes deficientes em proteínas, componentes dos complexos fotossistema I e II, sendo que a

maioria deles perdem a capacidade de realizar a fotossíntese. Nesta revisão, um maior enfoque é dado aos mutantes deficientes no metabolismo fotossintético, mas que são capazes de crescimento fotoautotrófico.

Como foi mencionado anteriormente, a mutação sítio-dirigida proporciona uma maior facilidade na obtenção de mutantes deficientes em polipeptídeos, componentes dos principais complexos envolvidos no processo da fotossíntese. Os fotossistemas I e II são complexos formados pela associação de proteínas e pigmentos; a ausência de proteínas principais levam a inabilidade de formação do complexo, e portanto, a obtenção de um mutante incapaz de crescimento fotoautotrófico. No entanto, mutações em proteínas menores, os chamados cofatores, proporcionam o aparecimento de mutantes que, embora apresentem menor taxa de crescimento, possuem atividade fotossintética. DEBUS et al. (1988), através de mutação sítio-dirigida em *Synechocystis* 6803, obtiveram um mutante deficiente no aminoácido D do polipeptídeo D₂ do complexo PSII. Embora o polipeptídeo D₂ seja de fundamental importância para a formação do complexo PSII e sua ausência leve à não formação deste complexo, a alteração no aminoácido D (Tyr-160) proporcionou o aparecimento de um mutante que cresce sob condições fotossintéticas, porém a uma taxa menor que as células selvagens.

A mutação não teve efeito na taxa de evolução de O₂, sugerindo que o componente D não é essencial para a função do PSII, pelo menos nas condições ambientais (sob iluminação contínua, a 33°C) em que foi realizado este estudo.

Mutantes da cianobactéria *Synechocystis* 6803 que especificamente perderam o polipeptídeo de 33 kDa, denominado de polipeptídeo estabilizador do manganês (MSP) do complexo de evolução de O₂ do PSII, foram construídos por PHILBRICK et al. (1991), através da inativação e deleção do gene *psbO*. Estes mutantes não apresentaram o MSP, porém acumularam em nível semelhante ao selvagem, os polipeptídeos intrínsecos ao PSII (D₁ e D₂) e a proteína associada CP-43. Medidas de fluorescência da clorofila *a* induzida por pulsos de luz actínica indicaram que, embora a concentração dos centros de reação nas células mutantes seja comparável às selvagens, aproximadamente 40% destes centros apresentam redução de fluorescência diferente daquela proveniente do P₆₈₀⁺. Os mutantes são capazes de crescimento fotoautotrófico a uma taxa menor que o selvagem, evoluem oxigênio a uma taxa de aproximadamente 70% do selvagem, porém são completamente fotoinativados por alta intensidade luminosa. Os resultados destes autores indicaram que o MSP não é essencial para a

formação e função do PSII em cianobactéria, mas que sua ausência permite um aumento na sensibilidade à fotoinibição. BURNAP & SHERMAN (1991) obtiveram resultados semelhantes na análise de outro mutante construído através da deleção do gene responsável pela codificação do MSP. Dados de emissão de fluorescência a 77K indicaram a formação estável do PSII no mutante, porém mostraram que a associação do MSP é requerida para as características normais de fluorescência do complexo, e sugeriram uma interação específica entre o MSP e a proteína CP-47. Medidas da indução de fluorescência indicaram uma taxa reduzida do transporte de elétrons para o doador primário de elétrons, o P₆₈₀, no mutante. O mutante construído evolui O₂ a uma taxa três vezes menor do que o selvagem.

Um mutante de *Synechocystis* 6803, deficiente no gene *psbK*, que codifica para um menor componente do PSII (PSII-K), foi construído por IKEUCHI et al. (1991). Este mutante apresentou a capacidade de crescimento fotoautotrófico, porém a uma menor taxa que o selvagem. O número de centros de reação do PSII tomando-se por base o teor de clorofila, mostrou-se reduzido pela metade no mutante. Baseando-se nestes dados, os autores concluíram que a proteína PSII-K não é essencial para a formação ou atividade do PSII, mas é necessária para a sua ótima função.

Resultados similares foram observados por LIND et al. (1993), que obtiveram um mutante deficiente no gene *psbJ*, um outro pequeno polipeptídeo associado ao PSII. Este mutante também apresentou menor proporção de PSII/clorofila, menor taxa de crescimento fotoautotrófico e de evolução de O₂, mostrando que este polipeptídeo, embora não seja essencial para a atividade fotoquímica, controla a quantidade de complexos PSII funcionalmente formados na membrana do tilacóide.

Mutações na quinona secundária receptora de elétrons (Q_B) da proteína D₁, conferindo uma modificação no lado doador do PSII foram caracterizadas por clonagem e seqüenciamento de genes em dois mutantes espontâneos de *Synechocystis* 6714, resistentes ao herbicida metribuzine. Estes mutantes apresentaram modificações na transferência de elétrons entre o receptor primário (Q_A) e o secundário (Q_B). A mutação também conferiu ao PSII um aumento na sensibilidade à luz. Os autores concluíram que mutações específicas na Q_B modificam o comportamento das células sob estresse por alta intensidade luminosa, tendo um efeito na estrutura da proteína D₁ no outro lado da membrana.

Através de mutagenese por radiação UV, um mutante de *Synechocystis* 6803, que apresenta menor taxa de crescimento

fotoautotrófico, foi isolado por SU et al. (1992). Neste mutante, de coloração esverdeada, a aloficocianina, componente central da antena coletora de luz, está ausente, assim como, outras proteínas centrais específicas do ficobilissoma. Ficocianina (PC) e proteínas ligadas aos ficobilissomas estão presentes, e mesmo com a ausência dos componentes centrais, pelo menos 35% da PC está associada às proteínas que formam os ficobilissomas. A 77K, a luz absorvida pela PC no mutante emite fluorescência do PSI comparável ao selvagem, mas produz fluorescência do PSII drasticamente diminuída. Os resultados obtidos, indicam que a energia luminosa pode ser transferida principalmente e diretamente para o PSI. Como a emissão de fluorescência detectada a 77K em cianobactéria varia com a iluminação e condições de crescimento, os autores sugerem que a transferência de elétrons da PC para o PSI pode, desta forma, funcionar para manter um balanço de energia entre o PSII e o PSI pelo direcionamento da energia de excitação sob condições naturais de crescimento.

A obtenção de mutantes deficientes em componentes do fotossistema I tem apresentado maiores problemas, uma vez que, a maioria das mutações resultam em organismos inviáveis, incapazes de crescimento fotoautotrófico ou fotoheterotrófico. Os mutantes viáveis obtidos pela

deleção de genes, que codificam proteínas menores, componentes do PSI, não apresentam diferenças com relação ao selvagem, impedindo a determinação da função destes polipeptídeos. No entanto, um mutante fotoautotrófico que apresenta menor crescimento em condições estressantes quando comparado ao selvagem foi obtido, através da inativação do gene *psaO* (ZHAO et al., 1993). Este gene codifica para a proteína Psa-O, associada ao complexo PSI, que parece estar relacionada ao transporte cíclico de elétrons ao redor do PSI, tendo importância apenas em situações de estresse, onde existe a necessidade de uma produção extra de ATP, como alta temperatura, baixa concentração de *Ci* na atmosfera, baixa luminosidade, etc. Outros genes, envolvidos no mecanismo de transporte cíclico de elétrons, têm sido identificados. Estes genes codificam para subunidades da enzima NADH desidrogenase, também envolvida na transferência de elétrons neste mecanismo. Os mutantes obtidos, deficientes nestes genes, apresentam menor taxa fotossintética sob condições de estresse e também, menor taxa respiratória, demonstrando a participação desta enzima na mediação da transferência de elétrons na cadeia respiratória (SCHLUCHTER et al., 1993).

Uma série de mutantes deficientes no mecanismo de concentração de carbono inorgânico vêm sendo obtidos, tanto por mutagênese química, como também, mais recentemente, por mutação sítio-dirigida. Estes mutantes, chamados de mutantes-HCR apresentam uma menor taxa de crescimento em condições em que ocorre limitação de C_i , porém crescem a taxas semelhantes ao selvagem quando há disponibilidade de CO_2 ou HCO_3^- no meio. Os mutantes que não são capazes de acumular C_i internamente, podem ser deficientes no transporte de C_i para o interior da célula, como aqueles obtidos por OGAWA (1990) e MARCO et al. (1993). Neste caso, a deficiência pode estar relacionada às proteínas envolvidas no transporte ou na sua energização. Estes mutantes apresentam uma diminuição da redução da fluorescência da clorofila a , quando C_i é adicionado ao meio. O mutante N5, obtido por MARCO et al. (1993) em *Synechococcus* PCC 7942, apresentou inativação de um gene altamente homólogo ao gene *ndhB*, que codifica para a subunidade 2 da NADH dehidrogenase em *Synechocystis* PCC 6803 (OGAWA, 1991). Análises obtidas através de medidas de fluorescência e termoluminescência, mostraram uma inabilidade deste mutante na transferência fotossintética de elétrons. Estes resultados fornecem evidências de que a enzima NADH

dehidrogenase pode ser essencial na operação funcional do transporte fotossintético de elétrons, sob baixas concentrações de CO₂.

Os mutantes-HCR, obtidos por PRICE & BADGER (1989c) e OGAWA et al. (1994), são capazes de acumularem *Ci* internamente, porém não são capazes de utilizá-lo eficientemente. Este tipo de mutante pode apresentar deficiência na estrutura dos carboxissomas. Neste caso, um número de possibilidades para alterações nas funções podem ocorrer: aumento na perda de CO₂ dos carboxissomas para o citosol; alteração na atividade da enzima anidrase carbônica (mutante obtido por PRICE et. al, 1994), ou sua presença no citosol; uma completa ausência da estrutura do carboxissoma; e presença da RuBisCO no citosol.

SCHWARZ et al. (1992) obtiveram através de inativação gênica, o mutante D4, que representa um novo tipo de mutante-HCR, apresentando características normais, quando há disponibilidade de *Ci* no meio, mas sendo incapaz de induzir um fenótipo semelhante ao selvagem quando a concentração de *Ci* é alterada. Este mutante pode ser deficiente em algum componente do transporte de *Ci*, no entanto é mais provável que apresente deficiência no sistema de transdução de sinal, que permite o acionamento do CCM pelas células.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico.

A cianobactéria unicelular *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 (antes classificada como *Anacystis nidulans* Tx20 e *Synechococcus* sp PCC 6301) foi cedida pelo Dr. David T. Canvin, Departamento de Biologia, Universidade Queen's, Kingston, Ontario, Canadá.

3.2. Condições de crescimento e manutenção das células.

A cultura de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 foi mantida em meio sólido BG-11 (ALLEN, 1968), tamponado a pH 8,0 com 20 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'-2-etanosulfônico), a 30°C, sob luminosidade de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para a realização dos experimentos, foi feita inoculação em meio líquido (BG-11 não tamponado), sob mesma temperatura e intensidade de luz. A aeração forçada utilizada em alguns experimentos foi obtida por borbulhamento com fluxo de 300 μl de

ar/min ou ainda, utilizando-se ar enriquecido com 1% CO₂. O crescimento em meio sólido, sob condições de 1% de CO₂ em ar, foi obtido através do uso de bandejas vedadas, contendo dois pequenos orifícios, por onde entrava e saía a mistura de gases.

3.3. Determinação do teor de clorofila *a*.

A determinação do teor de clorofila *a* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por AGUIAR (1992). Amostras de 1,0 ml de células em meio BG-11 foram centrifugadas (2000g, por 5 min) e ressuspendidas em mesmo volume de metanol (100%). Após 5 min, as amostras foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes, contendo toda a clorofila extraída pelo metanol, foram submetidos a leitura em espectrofotômetro, comprimento de onda 665 nm. A determinação da quantidade de clorofila presente nas amostras foi obtida através da fórmula:

$$\mu\text{g de Clorofila.ml}^{-1} = \text{Absorbância a 665 nm} \times 12,5$$

3.4. Obtenção do mutante.

Para a obtenção e seleção de mutantes foi utilizada a metodologia descrita por PRICE & BADGER (1989c). A linhagem *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625 foi inoculada em meio BG-11 e crescida com baixo borbulhamento de 1% de CO₂ em ar, sob luminosidade de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a 30°C até uma densidade de 10⁸ células.ml⁻¹ (D.O._{730nm} 1.0-1.1). Estas células foram, então, centrifugadas (4000g por 5 min), concentradas a 10⁹ células.ml⁻¹ e ressuspensas em 1ml de tampão fosfato 30 mM (pH 7,0). Um tubo de ensaio contendo 1 ml desta suspensão de células e 1 ml do mutagênico etilmetilsulfonato (EMS) 0,2 M foi incubado no escuro, a 37°C por 45 min. Após este período, o mutagênico EMS foi inativado adicionando-se 10 ml de tiosulfato de sódio 5% (pH 8,0). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes em meio BG-11, ressuspensas em 1 ml do mesmo meio e diluídas a 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶. Uma alíquota de 100 μl de cada diluição foi adicionada a 3,0 ml de meio BG-11, tamponado (pH 8,0), contendo 0,6% de agarose LGP e 5 mM de tiosulfato de sódio. Esta suspensão de células foi vertida em placa de Petri, contendo 20 ml de meio sólido BG-11 tamponado. Após a solidificação do meio, mais 3,0 ml do

mesmo foram vertidos sobre a placa, que foi incubada por 18 h a 30°C, sob baixa luminosidade ($10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e 1% de CO_2 em ar .

3.5. Seleção de mutantes que requerem alta concentração de CO_2 .

Após a mutagênese, descrita no item 3.4., as placas foram transferidas para condição de ar, sob luminosidade de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por 72 horas, até o esgotamento das reservas de carbono dos possíveis mutantes que requerem alta concentração de CO_2 para o crescimento. Após este período, foi feito um tratamento de enriquecimento nas placas, utilizando-se 0,5 ml de ampicilina, concentração final de $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$, sob luminosidade de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em ar, por mais 18 horas, eliminando-se com isso um grande número de células selvagens. A inativação do antibiótico foi feita através da adição de 1,8 unidades de penicilinase (Sigma) por placa. Após 7 dias, as colônias selvagens que sobreviveram ao tratamento foram marcadas e as placas foram transferidas para condições de 1% de CO_2 em ar. Após 8 dias, as colônias de possíveis mutantes que requerem alta concentração de C_i foram isoladas, utilizando-se pipeta de Pasteur de vidro. Em seguida, foram ressuspensas em 100 μl de meio BG-11 tamponado, contendo 12 mM de KHCO_3 e 0,2 mM de Na_2CO_3 . Estas colônias foram testadas em placas de

Petri (2 a 3 repetições) em 1% de CO₂ (condição permissiva) e em ar (condição não permissiva), a 30°C, sob luminosidade de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ quanto à capacidade de crescimento.

3.6. Determinação da taxa de crescimento.

Células selvagens e mutantes foram inoculadas em meio BG-11 não tamponado, a 30°C e luminosidade de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sob dois tratamentos: aeração forçada utilizando borbulhamento com fluxo de 300ml de ar/min e sem qualquer tipo de aeração. Amostras da suspensão de células de cada cultura foram retiradas em intervalos de 8 a 10 horas, durante 6 dias e a taxa de crescimento foi obtida, através da determinação do teor de clorofila *a* presente nas amostras.

3.7. Caracterização morfológica externa e estrutura fina.

A caracterização morfológica das células foi feita através da observação de lâminas, contendo o material, em Microscopia de Imersão. A estrutura fina das células foi obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão. A preparação do material para inclusão, cortes e coloração foi realizada seguindo a metodologia descrita por BOZZOLA & RUSSELL

(1992a; 1992b). Células selvagens e mutantes com 7 dias de crescimento sem aeração foram fixadas utilizando-se Solução de Karnovski modificado, durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, o material foi lavado 3 vezes com tampão cacodilato 0,05 M e deixado por 2 horas em tetróxido de ósmio 1%. Então, o material sofreu mais 3 lavagens em água destilada, seguidas de centrifugação e foi deixado em acetato de uranila 0,5% durante uma noite. Após este tratamento, o material foi novamente centrifugado e fez-se a desidratação em etapas utilizando-se acetona 30-50-70-90-100%. Para inclusão do material, utilizou-se primeiramente resina Spurr : acetona na proporção de 1 : 1, durante 3 horas e em seguida, resina Spurr pura durante a noite. O emblocamento foi feito em tubo de plástico, apropriado para material em suspensão, utilizando-se resina pura. Estes tubos foram, então, incubados a 37°C para permitir a solidificação da resina. Uma vez obtidos os blocos de resina contendo o material, cortes ultrafinos foram feitos, utilizando-se navalha de vidro no ultramicrótomo Ultracut e Reichert. Estes cortes foram colocados sobre tela, contendo uma película plástica com espessura de 5 nm, obtida a partir de solução de clorofórmio, contendo formvar. Em seguida, fez-se a contrastação do espécime sobre a tela utilizando-se acetato de uranila 3% por 10 min e citrato de chumbo por mais

10 min. As telas foram lavadas em água destilada e observadas no Microscópio Eletrônico Zeiss 900.

3.8. Fotossíntese e emissão de fluorescência da clorofila *a*.

3.8.1. Condições experimentais.

Após 6 dias de crescimento, a 30°C, sob luminosidade de 90 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e aeração forçada utilizando borbulhamento com fluxo de 300ml de ar/min, as suspensões de células mutantes e selvagens foram centrifugadas, lavadas 3 vezes com tampão BTP/HCl 25 mM (1,3-bis (tris[hyfroxyethylamino)-propano/HCl), pH 8,0 e ressuspensas no mesmo tampão a uma concentração de aproximadamente 10 μg de clorofila. ml^{-1} . As determinações de evolução de oxigênio e emissão de fluorescência de clorofila *a* foram realizadas simultaneamente numa câmara de acrílico (2 ml) a 30°C, sob luz actínica de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, provida por uma lâmpada de tungstênio-halogênio. As suspensões de células foram agitadas vigorosamente para fornecer homogeneidade durante os experimentos.

3.8.2. Emissão de fluorescência da clorofila *a*.

Para a determinação da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorímetro PAM-101 (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). O pulso de luz modulada ($\lambda=650$ nm a 100kHz) foi de $1 \mu\text{mol}$ (fótons) $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Após um período de 5 min de escuro para adaptação das células, o pulso modulado de luz vermelha foi ligado, fornecendo o parâmetro F_o (fluorescência mínima). Então, pulsos de luz branca com intensidade de $11000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e duração de 1s foram fornecidos à suspensão de células a intervalos de 30s até o final do experimento. Após 2 a 3 picos de luz saturante, a suspensão de células foi iluminada com luz branca actínica de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e depois de atingir emissão de fluorescência máxima (F_m), foram a ela adicionados $50 \mu\text{l}$ da solução NaCl 1 M (concentração final de 25 mM) e $20 \mu\text{l}$ da solução KHCO_3 10 mM (concentração final de 100 μM).

3.8.3. Taxa fotossintética e respiratória.

A taxa fotossintética das células foi determinada em função dos parâmetros $K_{0,5}(\text{HCO}_3^-)$ e v_{max} , obtidos a partir dos dados de evolução de oxigênio, medida através de um eletrodo de oxigênio acoplado à câmara de acrílico, descrita no item 3.8.1. A determinação do parâmetro $K_{0,5}(\text{HCO}_3^-)$ e v_{max} foi feita através do método de Lineweaver-Burk (LENINGHER, 1975), no qual mede-se a velocidade de uma reação, (velocidade da enzima responsável pela ocorrência da reação) em função da concentração do substrato. Foram adicionadas soluções de KHCO_3 10mM e 100 mM à suspensão de células, de modo a se obter concentrações finais crescentes de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 μM de HCO_3^- e a taxa fotossintética foi expressa em taxa de evolução de O_2 . A partir do gráfico obtido, relacionando-se concentração de HCO_3^- e velocidade de evolução de O_2 , foram determinados os parâmetros v_{max} (velocidade máxima de evolução de O_2) e $K_{0,5}$ (concentração de HCO_3^- que permite às células atingir a metade da velocidade máxima de evolução de O_2). A taxa respiratória foi determinada durante o período de adaptação das células ao escuro, através do consumo de oxigênio presente no meio, medido pelo eletrodo de oxigênio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 121 colônias de possíveis mutantes, através da metodologia descrita no ítem 3.4. Estas colônias foram testadas com relação à capacidade de crescimento em concentrações atmosféricas de CO₂ e apenas uma foi selecionada. O mutante obtido, denominado mutante 26 (M-26), cresceu mais lentamente que o selvagem em condições atmosféricas de CO₂ (0,035%). Em meio líquido, apresentou a formação de grumos que se depositam no fundo do frasco, contrastando com as células selvagens, cujo crescimento nas mesmas condições é homogêneo (Figura 9). Estes grumos são formados por grupamentos de células (Figura 10), o que pode indicar a ocorrência de alteração em algum componente da parede celular das células do M-26, permitindo este tipo de arranjo.

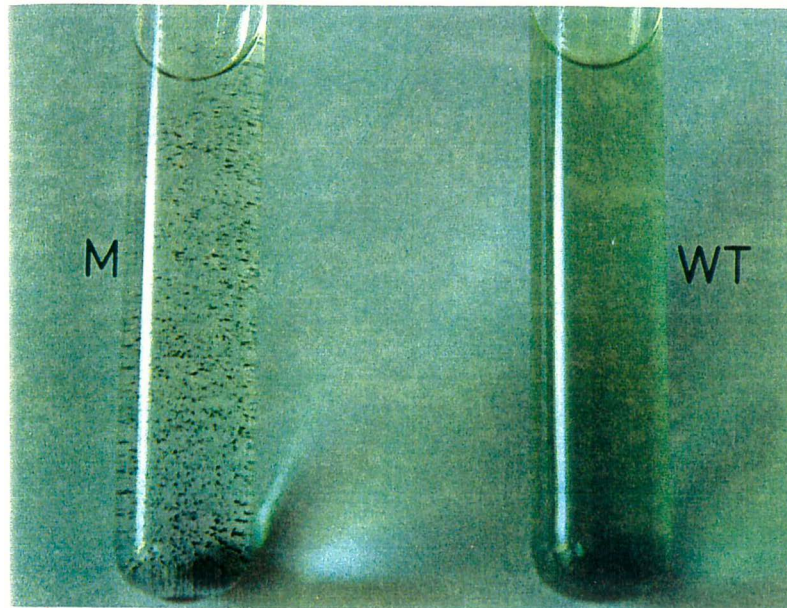


Figura 9. Células selvagens (direita) e do mutante 26 (esquerda) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, cultivadas em meio líquido BG-11 sem aeração.

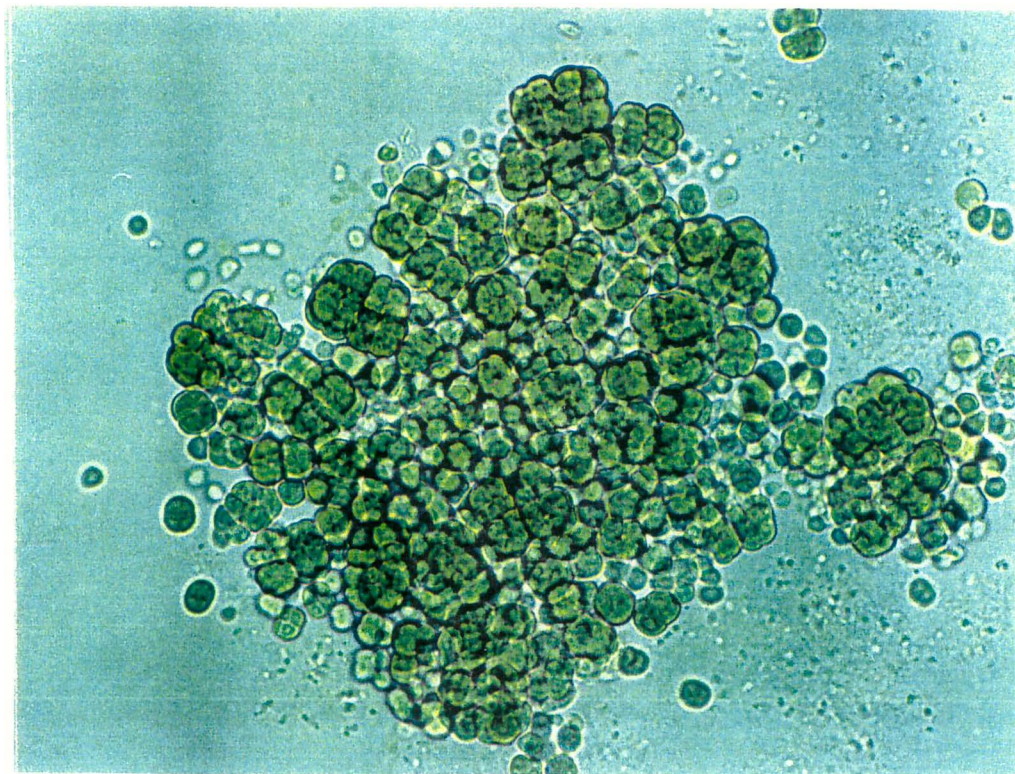


Figura 10. Células do mutante 26 de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, apresentando a formação de grumos durante o desenvolvimento da cultura em meio BG-11 líquido. Microscopia de imersão. Aumento de 1000x.

As taxas de crescimento das células selvagens e do M-26 foram comparadas em duas condições de disponibilidade de CO₂: sem qualquer tipo de aeração e utilizando borbulhamento com fluxo de 300 ml de ar /min (Figura 11). Nas primeiras 48 horas, as taxas de crescimento do M-26 e do selvagem foram pequenas e similares nos dois tratamentos. Isto ocorreu porque as células estavam em fase lag, situação na qual o crescimento é limitado e não sofre alteração significativa em função da concentração do CO₂ no meio. Após este período, as células entraram em fase log, apresentando maior crescimento. Como já era esperado, as taxas de crescimento dos dois tipos de células foram maiores no tratamento com borbulhamento de ar do que sem aeração, devido à maior disponibilidade de CO₂ proporcionar um aumento da atividade fotossintética. O M-26 apresentou menor taxa de crescimento que o selvagem em ambas as condições de aeração, sendo que a redução no crescimento foi mais significativa no tratamento sem aeração (cerca de 37%) do que com borbulhamento de ar (cerca de 18%). Isto sugere que o M-26 possui menor atividade fotossintética, quando comparado ao selvagem e que esta deficiência se torna mais evidente em condições de limitação do CO₂ no meio.

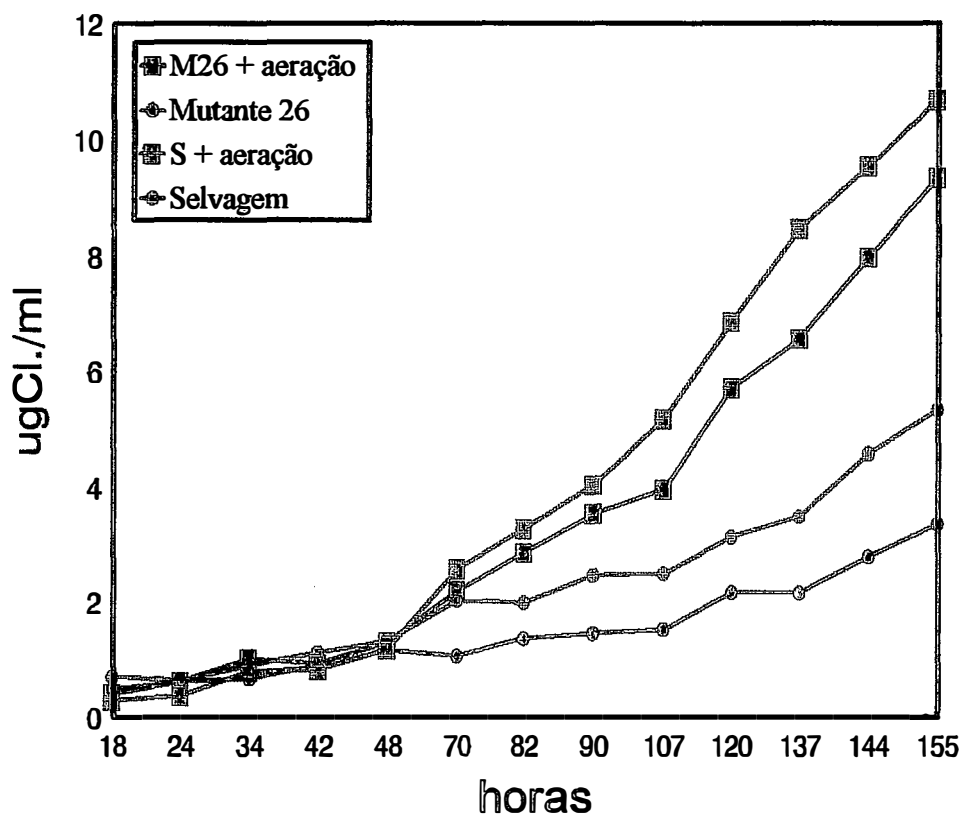


Figura 11. Curva de crescimento de células selvagens (azul) e do mutante 26 (verde) de *Synechococcus* UTEX 625, expressa em concentração de clorofila. Condições: aeração de 300 μ l/min (quadrado) e sem aeração (círculo).

Morfologicamente, as células do mutante 26 são muito diferentes das células selvagens (Figura 12). A linhagem selvagem apresenta células alongadas, em forma de pequenos bastonetes bem definidos, enquanto que as células mutantes são arredondadas e possuem um diâmetro maior. Muitas das células do M-26 não se separam após várias divisões, permanecendo unidas mesmo após a divisão celular. Em função da forma, apresentam número diferente de planos de divisão celular, sendo que as selvagens se dividem num único plano e as mutantes em mais de um. Não se encontra na literatura a descrição de mutantes que tenham sofrido alteração morfológica semelhante àquela ocorrida no M-26. No entanto, uma vez que a forma das células, após a divisão, é conferida pela maior ou menor resistência oferecida pela parede celular (RIPKKA, 1988), pode-se supor que as células do M-26 tenham sofrido uma alteração na sua composição, tornando-a menos resistente. A menor resistência da parede celular permitiria à célula uma forma mais próxima a de esferoplastos, células que apresentam parede celular bastante reduzida por tratamento com enzimas (lisozima).

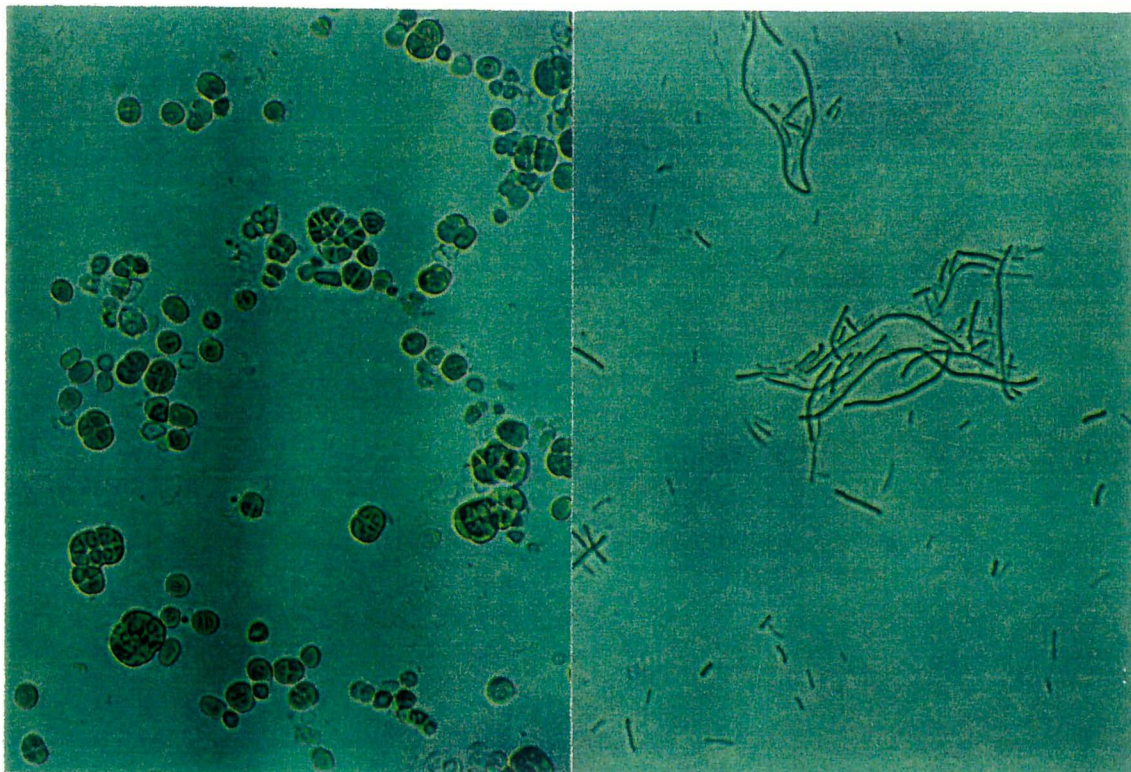


Figura 12. Células selvagens (direita) e mutantes (esquerda) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625. Aumento de 400x.

O estudo da estrutura fina das células selvagens e mutantes mostrou que o M-26 apresenta uma desorganização nas membranas do tilacóide (Figura 13). Nas células selvagens, estas membranas estão dispostas paralelamente à membrana plasmática e parede celular, enquanto que nas mutantes encontram-se em desarranjo, ocorrendo a formação de pequenas dobras. Esta alteração pode ter sido causada pela deficiência de

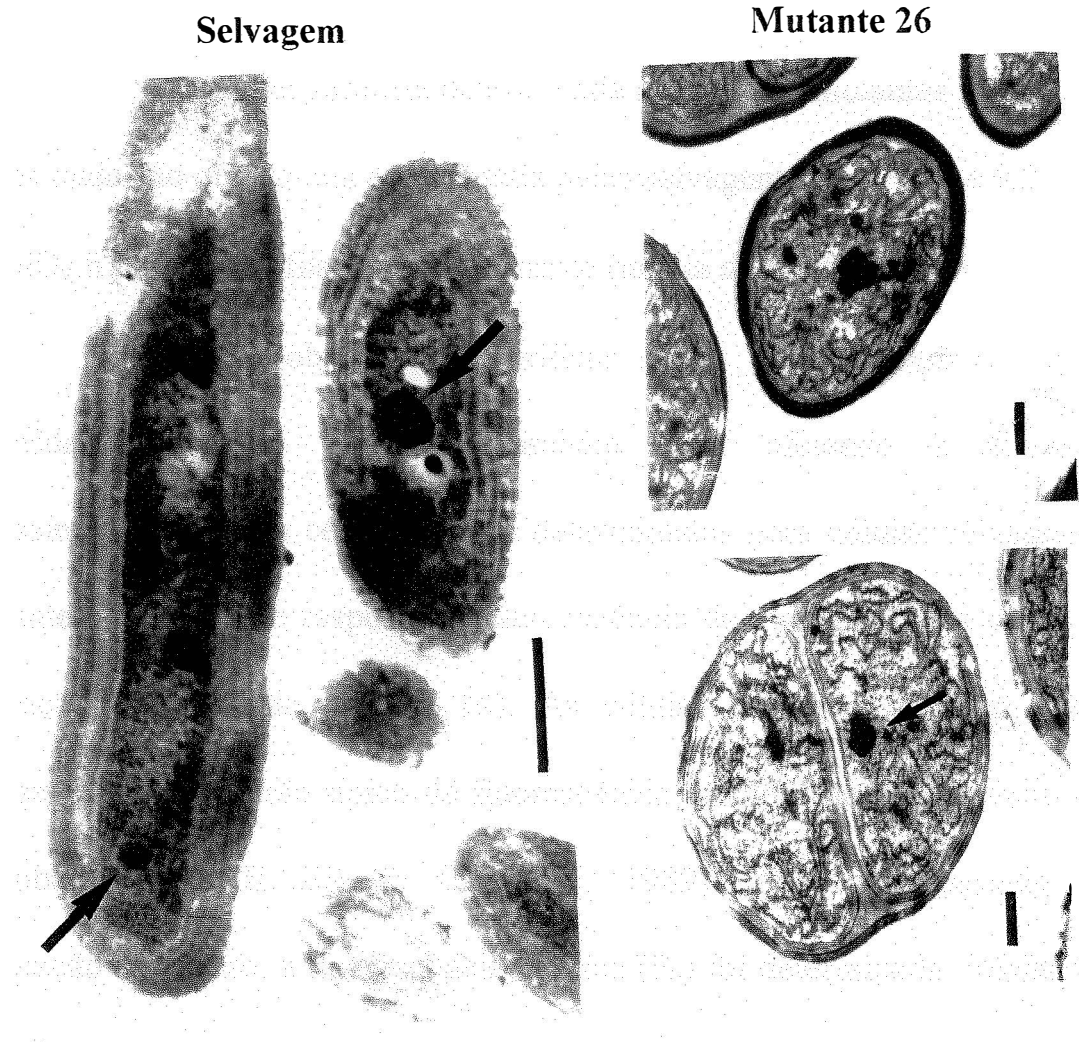


Figura 13. Ultraestrutura de células selvagens e do mutante 26 de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625. As setas indicam os carboxisomas. Notar a desorganização das membranas do tilacóide. As barras representam 0,6 μm .

algum componente nas membranas do tilacóide no M-26, ou ainda, ser uma consequência da modificação ocorrida na forma da célula, ou seja, na parede celular. A disposição alterada das membranas do tilacóide pode influenciar diretamente o transporte de elétrons que ocorre nestas membranas, modificando a regulação dos processos fotossintético e respiratório.

A taxa respiratória determinada nas células mutantes foi quase 5 vezes maior do que aquela apresentada pelas selvagens: $43,8 \pm 4,3$ e $9,2 \pm 2,4$ $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Clorofila, respectivamente (média de 6 experimentos).

Com o objetivo de verificar se as alterações morfológicas ocorridas no M-26 poderiam também estar afetando a atividade fotossintética e destas células, foram determinados para células selvagens e mutantes o padrão de resposta da fluorescência da clorofila *a* e a curva de liberação de oxigênio (Figura 14). As células selvagens (Figura 14A), apresentaram o padrão típico de fluorescência da clorofila *a* observado em cianobactérias (MILLER & CANVIN, 1989). Após um período de adaptação ao escuro, a fluorescência mínima (F_0) foi determinada. Iniciando-se a iluminação da suspensão de células a fluorescência aumentou, porém não atingiu o máximo devido à presença de C_i no meio, produzido pela respiração das células durante o período de escuro. A curva de liberação de

O₂ tornou-se mais inclinada, significando um aumento na liberação de O₂, como consequência da fixação de CO₂. Com a adição de NaCl (25 mM) ocorreu uma rápida diminuição da fluorescência variável (F_v) em resposta ao aumento no bombeamento do HCO₃⁻ pela presença do sódio. A atividade fotossintética aumentou paralelamente. Após a absorção ativa de todo o C_i disponível no meio, realizada pelas células, a fluorescência variável alcançou a máxima intensidade, atingindo a mesma amplitude da fluorescência máxima, com a altura dos picos de luz saturante muito pequenos. Quando foram adicionados 100 μM de HCO₃⁻ ocorreu uma rápida diminuição na fluorescência da clorofila *a* e conseqüente aumento na liberação de O₂, até que todo o bicarbonato foi absorvido pelas células. Neste ponto, a fluorescência variável atingiu, novamente, o seu máximo e a liberação de O₂ estabilizou.

Nas células mutantes (Figura 14B), cultivadas em condições atmosféricas de CO₂, observou-se uma resposta bastante diversa. Após o início da iluminação, a fluorescência variável aumentou muito pouco em relação às células selvagens. A liberação de O₂ aumentou até atingir o equilíbrio, porém a fluorescência variável não sofreu alteração. A diferença entre F_m e F_v nestas condições (Figura 14B) indica a ocorrência de um

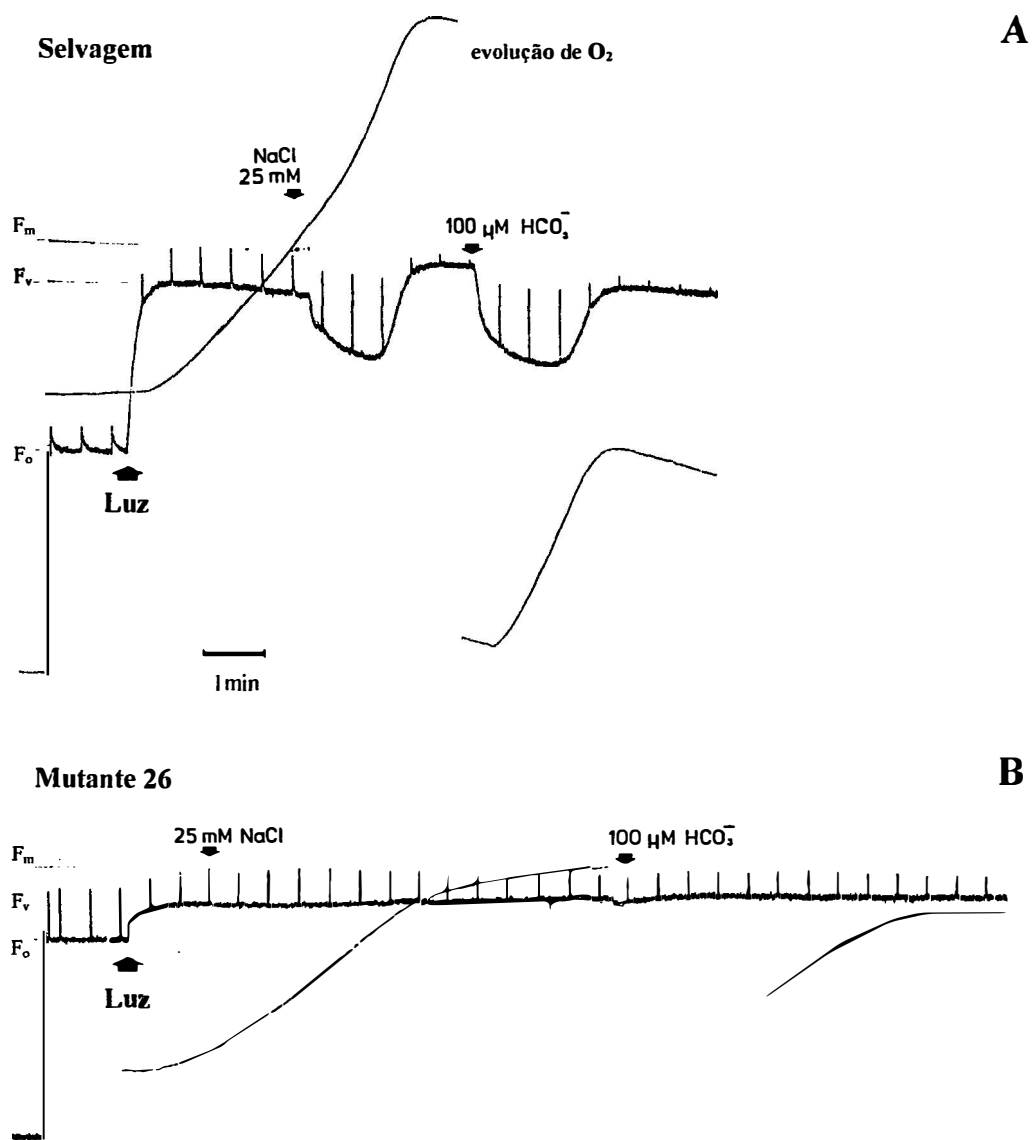


Figura 14. Efeito da adição de NaCl (25 mM) e HCO₃⁻ (100 μM) na liberação de oxigênio e fluorescência da clorofila *a* em células selvagens (A) e mutantes (B) de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, cultivadas em condições atmosféricas de CO₂.

“quenching” não fotoquímico, não observado no padrão de emissão de fluorescência apresentado pelas células selvagens. A adição de sódio e HCO_3^- não mudou o padrão de resposta da fluorescência da clorofila a . No entanto, a adição de HCO_3^- resultou numa alteração da inclinação da curva de liberação de O_2 , indicando atividade fotossintética. Nas células selvagens, sob mesmas condições, a inclinação da curva de liberação de O_2 foi mais pronunciada, mostrando que estas células são mais eficientes no processo. A adição de NaCl à suspensão de células do M-26 não provocou semelhante alteração, sugerindo que no M-26, o mecanismo de concentração ativa de C_i -dependente de sódio não estava ocorrendo. O padrão de emissão de fluorescência da clorofila a continuou inalterado mesmo após a estabilização da liberação de O_2 , indicando que este parâmetro não pode ser utilizado no estudo do transporte de C_i para o interior das células no M-26.

O padrão de emissão de fluorescência da clorofila a apresentado pelo mutante 26 indica que este mutante possui uma capacidade reduzida na transferência de elétrons na cadeia fotossintética. A fluorescência máxima emitida pelas células do mutante 26 atinge apenas 60% daquela emitida pelas selvagens, indicando uma menor redução do “pool” de quinonas-A (Q_A^-)

pelo fotossistema II. Isto poderia estar ocorrendo em função de uma menor eficiência dos complexos PSII na transferência de elétrons para o “pool” de Q_A^- . Muitos mutantes deficientes em componentes do fotossistema II vêm sendo obtidos, sendo que a maioria deles perdem sua capacidade de crescimento fotoautotrófico (VERMAAS et al, 1986; JANSSON et al, 1987). Mutações que afetam proteínas menores do complexo fotossistema II, normalmente, resultam em mutantes fotoautotróficos, que apresentam menor crescimento, menor taxa de liberação de O_2 e maior tendência à fotoinibição, quando comparados a células selvagens. (BURNAP & SHERMAN, 1991; LIND et al., 1993).

Outra possibilidade para a menor eficiência no transporte de elétrons estaria relacionada ao mecanismo de transição de estado, também chamado de adaptação rápida à luz. Uma deficiência neste mecanismo acarretaria numa inabilidade parcial de transferência de energia da antena coletora de luz, ficobilissomas, para os complexos PSII. A disposição alterada das membranas do tilacóide no M-26 favorece esta segunda possibilidade, uma vez que neste mecanismo, o ficobilissoma se locomove na região entre as membranas.

Um grande número de mutações bem definidas afetando os componentes do ficobilissoma, fotossistema I, fotossistema II e componentes do sistema de transporte de elétrons foram obtidas nos últimos anos, e algumas destas mutações afetam o mecanismo de transição de estado. As mutações mais interessantes identificadas afetando este mecanismo são mutações que ocorrem em componentes centrais do ficobilissoma. Os principais mutantes obtidos são deficientes em subunidades da ficobiliproteína aloficocianina. ZHAO et al. (1992) verificaram em *Synechococcus* sp. PCC 7002, que uma mutação no gene *apcD*, provoca a incapacidade de realização do mecanismo de transição de estado, sendo que, as células permanecem no estado 1 sob todos os regimes de luz. Estes autores também estudaram uma mutação no gene *apcF*, e verificaram uma baixa emissão de fluorescência a 695 nm (fluorescência preferencialmente emitida pelo PSII) em células adaptadas ao estado 2. O mutante UV6P, deficiente no gene *apcA*, obtido por SU et al. (1992) apresenta uma incapacidade na formação do complexo ficobilissoma, ocorrendo transferência de energia diretamente da ficocianina (componente do PBS) para os fotossistemas. Esta transferência de energia é menos eficiente e provoca uma redução na emissão de fluorescência relativa ao PSII.

Mutações em componentes do sistema de transporte de elétrons e nos complexos PSI e PSII, alterando o mecanismo de transição de estado, recentemente, têm sido identificadas. Mutações que afetam o transporte cíclico de elétrons (*psaE*⁻; ZAO et al., 1993), o complexo NADH desidrogenase (*ndhF*⁻; SCHLUCHTER et al. 1993), ou ambos (*psaE*⁻ *ndhF*⁻; YU et al., 1993), também afetam a cinética de trocas do mecanismo de transição de estado, provavelmente através de efeitos destas mutações no comportamento de oxirredução destes componentes no sistema de transporte de elétrons entre os dois fotossistemas.

ALLEN et al. (1989) verificaram que células de *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, crescidas em luz preferencialmente absorvida pelo PSII (estado II), apresentaram um padrão de emissão de fluorescência da clorofila *a* alterado, sendo que a fluorescência variável (F_v) foi bastante reduzida, ficando muito próxima da fluorescência inicial (F_0). Este comportamento é bastante similar ao do M-26, o que leva à suposição de que apresente uma mutação afetando o mecanismo de transição de estado, tornando-o menos eficiente na transição do estado II (estado do escuro) para o estado I (estado de alta fluorescência). A alta taxa respiratória apresentada pelo M-26 vem corroborar com esta hipótese, uma vez que esta

característica também foi observada em *Synechocystis* PCC 6714, adaptada à luz preferencialmente absorvida pelo PSII (FUJITA et al., 1987; ADHIKARY et al., 1990). Este aumento na atividade respiratória ocorre em função de um aumento na atividade da enzima citocromo oxidase (GU et al., 1994). A maior taxa respiratória apresentada pelo mutante 26 também pode ser atribuída à desorganização das membranas do tilacóide, se considerarmos que isto tenha promovido alguma alteração na disposição dos transportadores de elétrons em relação à citocromo oxidase, favorecendo o metabolismo respiratório.

Curvas de resposta da taxa de liberação de O₂ em função do aumento na concentração de C_i foram determinadas para células selvagens e mutantes (Figura 15). Em condições limitantes de C_i (5-25 μM C_i) as células selvagens apresentaram uma maior taxa fotossintética. À medida que aumentou-se a concentração de C_i, a capacidade fotossintética das células mutantes atingiu valores semelhantes às selvagens. Com este resultado, pode-se constatar que, embora o mutante apresente as membranas do tilacóide desorganizadas e ocorra algum problema na transferência de elétrons na cadeia fotossintética, a capacidade de síntese de ATP para a fixação fotossintética do CO₂ não foi alterada. A afinidade fotossintética

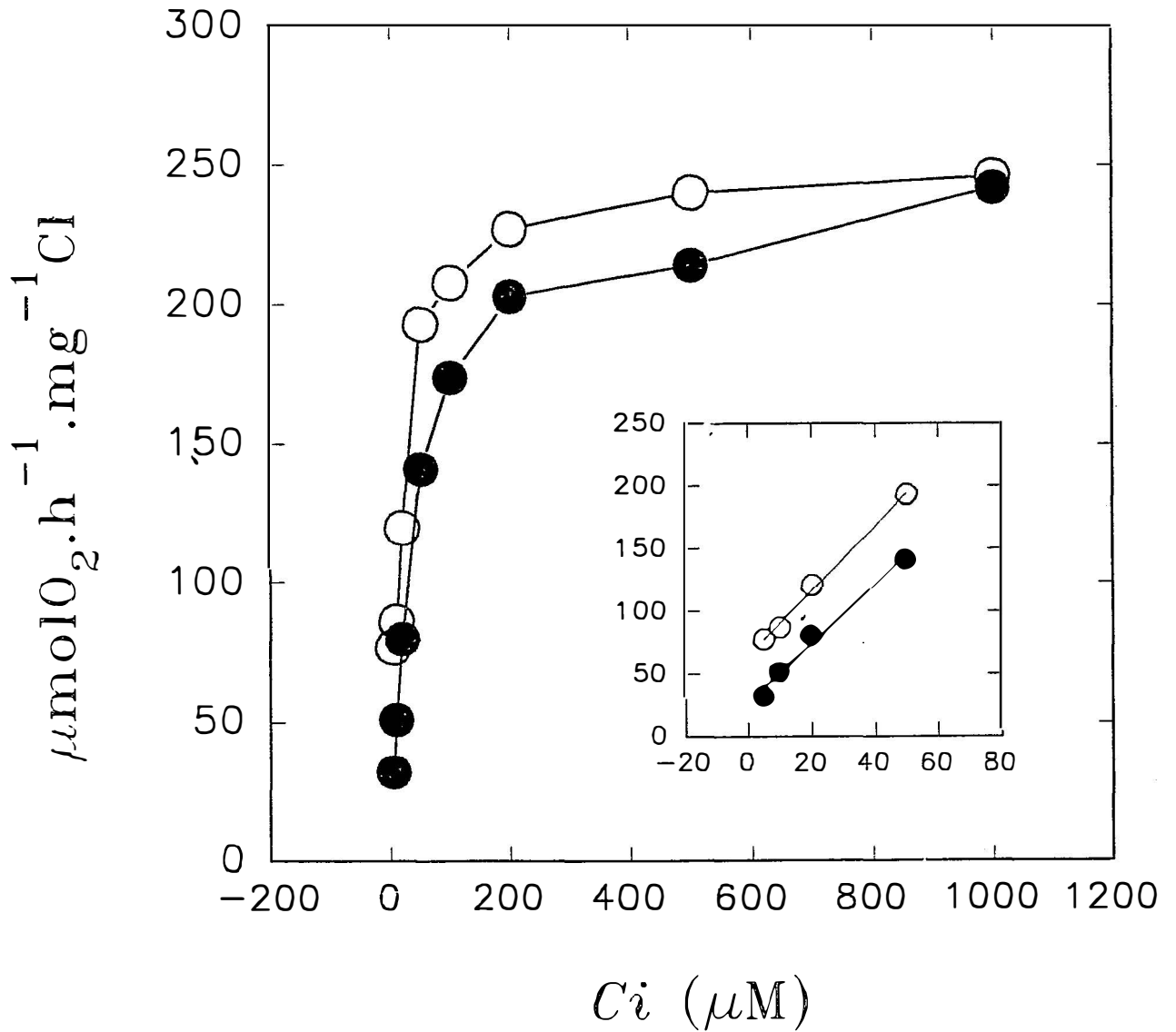


Figura 15. Taxa de liberação de oxigênio em função da concentração de carbono inorgânico (C_i). As células foram cultivadas em condições atmosféricas de CO_2 . Selvagem (o) e Mutante (●).

aparente pelo C_i extracelular ($K_{0,5}$) foi de 10,6 μM e 30,2 μM para o selvagem e M-26, respectivamente. A menor afinidade do M-26 por C_i (cerca de 3 vezes) em condições limitantes (10 μM) representa uma desvantagem para o crescimento das células em condições atmosféricas de CO_2 . Os valores de v_{max} calculados para ambos foram semelhantes, 218 e 219 $\mu\text{molO}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Clorofila}$ para o selvagem e M-26, respectivamente, indicando que não ocorreu alteração na atividade da enzima RuBisCO. Uma alternativa para explicar a menor taxa de liberação de O_2 apresentada pelo M-26 em condições de baixa concentração de CO_2 , seria a suposição de que as células mutantes tivessem menor capacidade de acúmulo de C_i . Isto poderia estar ocorrendo em função das alterações nos sistemas de membranas (tilacóide, membrana plasmática e parede celular), que permitiria, desta forma, um aumento no vazamento de C_i do interior para o exterior das células. Por outro lado, a alteração do formato das células pode ter provocado uma modificação na arquitetura da membrana plasmática, de forma que as proteínas envolvidas no bombeamento ativo de C_i se tornassem menos eficientes, diminuindo a afinidade do mutante por C_i .

Uma outra possibilidade para explicar a inabilidade na acumulação ativa de C_i seria a ocorrência de uma deficiência na energização do sistema de transporte de C_i , uma vez que o mutante 26 apresenta alterações no sistema de transporte de elétrons. O fato do M-26 não liberar O_2 quando NaCl foi adicionado ao meio (Figura 15B), vem corroborar com a possibilidade da não ocorrência do transporte ativo de C_i -dependente de sódio para o interior da célula. Mutantes, deficientes em componentes do transporte cíclico de elétrons, mostraram-se incapazes de crescerem em condições de baixa concentração de C_i . Os mutantes que apresentam deficiência em subunidades da enzima NADH-desidrogenase (*ndhF*⁻, SCHLUCHTER et al., 1993, por exemplo) apresentam bloqueio total do transporte de elétrons fotossintético e respiratório sob limitação de CO_2 (MARCO et al., 1993). No M-26 isto não ocorre, havendo apenas uma redução parcial, que não impede o crescimento sob condições atmosféricas. A taxa respiratória do M-26 não sofre redução como no *ndhF*⁻, ao contrário, é quase 5 vezes maior do que aquela apresentada pelo selvagem. Isto exclui a possibilidade do M-26 ter alguma relação com os mutantes deficientes na enzima NADH-desidrogenase. O *psaE*⁻, deficiente numa proteína associada

ao PSI (ZHAO et al., 1993) apresenta características semelhantes ao M-26, embora também não seja capaz de crescer em condição atmosférica de CO₂. O fato destas mutações ocorridas no transporte cíclico de elétrons também podem afetar o mecanismo de estado de transição, favorece a possibilidade do mutante 26 apresentar uma deficiência neste mecanismo.

5. CONCLUSÕES

O M-26 é um mutante que apresenta alterações morfológicas, tanto externa como interna, via microscopia ótica e de transmissão, respectivamente. A célula do M-26 é arredondada, tendo perdido sua forma filamentosa característica e as membranas do tilacóide apresentam-se desorganizadas, ocorrendo o aparecimento de dobras, em contraposição às membranas do tilacóide do selvagem, que são paralelas. Estas modificações, provavelmente, foram responsáveis pelas alterações fisiológicas ocorridas no mutante. A redução na capacidade fotossintética em condições de baixos níveis de carbono inorgânico e o aumento de cerca de 5% na taxa respiratória observados no mutante, sugerem uma deficiência no sistema de transferência de energia dos ficobilissomas (antenas coletoras de luz) para os centros de reação dos fotossistemas ou em algum componente da cadeia de transporte de elétrons.

Um estudo mais detalhado dos componentes envolvidos nos sistemas de transferência de energia e de transporte de elétrons nas membranas do tilacóide, bem como a identificação do(s) gene(s) mutado(s) no M-26, poderiam trazer melhores evidências da relação entre as alterações morfológicas e fisiológicas apresentadas, possibilitando, com isso, uma melhor compreensão do funcionamento do processo fotossintético neste organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARY, S.P.; MURAKAMI, A.; OHKI, K.; FUJITA, Y. Photoregulation of respiratory activity in the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714: The possibility of the simultaneous regulation of the amount of PSI complex and the activity of respiratory terminal oxidase in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, **31**: 527-32.
- AGUIAR, R.M. Estudo de fatores que interferem no crescimento de cianobactérias de vida livre, fixadoras de nitrogênio, e o isolamento de mutantes espontâneos. Piracicaba, 1992. 122p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ALLEN, J.F. & HOLMES, N.G. A general mode for regulation of photosynthetic unit function by protein phosphorylation. **FEBS Letters**, Amsterdam, **202**: 175-81, 1986.
- ALLEN, J.F.; MULLINEAUX, C.W.; SANDERS, C.E.; MELIS, A. State transitions, photosystem stoichiometry adjustment and non-photochemical quenching in cyanobacterial cells acclimated to light absorbed by photosystem I or photosystem II. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, **22**: 157-66, 1989.

- ALLEN, J.F.; SANDERS, C.E.; HOLMES, N.G. Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Synechococcus*. **FEBS Letters**, Amsterdam, **193**: 271-5, 1985.
- ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, **4**: 1-4, 1968.
- AOKI, M & KATOH, S. Oxidation and reduction of plastoquinone by photosynthetic and respiratory electron transport in a cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, **682**: 307-14, 1982.
- BADGER, M.R. The CO₂ concentrating mechanism in aquatic phototrophs. In: HATCH, M.D. & BOARDMAN, N.K., ed. **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York, Academic Press, 1987. v.10, p.219-74.
- BADGER, M.R. & ANDREWS, T.J. Photosynthetic and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Plant Physiology**, Rockville, **70**: 517-23, 1982.
- BADGER, M.R. & PRICE, G.D. Carbon disulphide is an inhibitor of both CO₂ and HCO₃⁻ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. **Plant Physiology**, Rockville, **94**: 35-9, 1990.
- BADGER, M.R. & PRICE, G.D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, København, **84**: 606-15, 1992.

- BALKWILL, D.L.; STEVENS, S.E.; NIERZWICKI-BAUER, S.A. Use of computer-aided reconstructions and high-voltage electron microscopy to examine microbial three-dimensional architecture. **Biotechniques**, Natick, **2**: 242, 1984.
- BOWES, G. & OGREN, W.L. Oxygen inhibition and other properties of soybean ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, **247**: 2171-6, 1972.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. Specimen preparation for transmission electron microscopy. In: _____. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Boston, JONES & BARTLETT, 1992. p.14-37.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. In: _____. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Boston, JONES & BARTLETT, 1992. p.108-32.
- BRIANTAIS, J.M.; BERNOTTE, C.; KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants: chloroplast and leaves. In: GOVINDJEE; AMESZ, J.; FORK, D.C., ed. **Light emission by plants and bacteria**. Orlando, Academic Press, 1986, p.539-83.
- BRODY, M. & EMERSON, R. The quantum yield of photosynthesis in *Porphyridium cruentum*, and the role of chlorophyll *a* in the photosynthesis of red algae. **Journal of General Physiology**, Baltimore, **43**: 251-64, 1959.

- BURNAP, R.L. & SHERMAN, L.A. Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 indicates the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O₂-evolution. **Biochemistry**, Washington, **30**: 440-6, 1991.
- CALVIN, M. Chemical and photochemical reaction of thiolic acid and related disulfides. **Federation Proceedings Biol.**, , **13**: 697-702, 1954.
- CHAPMAN, J.S. & MEEKS, J.C. Conditions for mutagenesis of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **The Journal of General Microbiology**, Baltimore, **133**: 111-8, 1987.
- CROTTY, C.M.; TYRRELL, P.N.; ESPIE, G.S. Quenching of chlorophyll *a* fluorescence in response to Na⁺-dependent HCO₃⁻ transport-mediated accumulation of inorganic carbon in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiology**, Rockville, **104**: 785-91, 1994.
- DEBUS, R.J.; BARRY, B.A.; BABCOCK, G.T.; McINTOSH, L. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. **Proceedings of the National of Academy Sciences USA**, Washington, **85**: 427-30, 1988.
- DOMINY, P.J. & WILLIAMS, W.P. The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **892**: 264-74, 1987.

- ESPIE, G.S. & KANDASAMY, R.A. Na^+ -independent HCO_3^- transport and accumulation in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiology**, Rockville, **98**: 560-8, 1992.
- ESPIE, G.S.; MILLER, A.G.; CANVIN, D.T. High affinity transport of CO_2 in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiology**, Rockville, **97**: 943-53, 1991.
- FORK, D.C. & HERBERT, S.K. Electron transport and photophosphorylation by photosystem I in vivo in plants and cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, **36**: 149-68, 1993.
- FORK, D.C. & MOHANTY, P. Fluorescence and other characteristics of blue-green algae (cyanobacteria), red algae, and cryptomonads. In: GOVINDJEE; AMESZ, J.; FORK, D.C., ed. **Light emission by plants and bacteria**. Orlando, Academic Press, 1986, p.451-96.
- FORK, D.C. & SATOH, K. State I-state II transitions in the thermophylic blue-green alga (cyanobacterium) *Synechococcus lividus*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, **37**: 421-27, 1983.
- FORK, D.C. & SATOH, K. The control by state transitions of the distribution of excitation energy in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, **37**: 335-61, 1986.

- FUJITA, Y.; MURAKAMI, A.; OHKI, K. Regulation of photosystem composition in the cyanobacterial photosynthetic system: the regulation occurs in response to the redox state of the electron pool located between the two photosystems. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, **28**: 283-92, 1987.
- GANTT, E. Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. **International Review of Cytology**, New York, **66**: 45-80, 1979.
- GIBBONS, N.E. & MURRAY, R.G.E. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, **28**: 1, 1978.
- GOLDEN, S. Mutagenesis of cyanobacteria by classical and gene transfer based methods. **Methods and Enzymology**, New York, **167**: 714-27, 1988.
- GOVINDJEE, AMESZ, J.; FORK, D.C. **Light emission by plants and bacteria**. Orlando, Academic Press, 1986, p.638.
- GU, T.; IWAMA, Y.; MURAKAMI, A.; ADHIKARY, S.P.; FUJITA, Y. Changes in the cytochrome *c* oxidase activity in response to light regime for photosynthesis observed with the cyanophyte *Synechocystis* PCC 6714. **Plant and Cell Physiology**, Tokio, **35**: 1135-40, 1994.
- HERDMAN, M. & CARR, N.G. The isolation and characterization of mutant strains of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, **70**: 213-20, 1972.

JONES, L.W. & MYERS, J. A common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga. **Nature**, London, **199**: 670-2, 1963.

JÜRGENS, U.J. & WECKESSER, J. The fine structure and chemical composition of the cell wall and sheath layers of cyanobacteria. **Annual Institute Pasteur of Microbiology**, **136A**: 41-4, 1985.

KATOH, A.; LEE, K.S.; FUKUZAWA, H.; OHYAMA, K.; OGAWA, T. A putative CO₂ transport in *Synechocystis* PCC 6803 driven by NADPH dehydrogenase-mediated photosystem-I cyclic electron flow. In: INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, 10, Montpellier, 1995. Proceedings.

KLIMOV, V.V.; DOLAN, E.; SHAW, E.R.; KE, B. Interaction between the intermediary electron acceptor (pheophytin) and a possible plastoquinone-iron complex in photosystem II reaction centers. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, **77**: 7227-31, 1980.

KUNKEL, D.D. Thylakoid centers: structures associated with the cyanobacterial photosynthetic membrane system. **Archives of Microbiology**, Berlin, **133**: 97-9, 1982.

LAINING, W.A.; OGREN, W.L.; HAGEMAN, R.H. Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. **Plant Physiology**, Rockville, **54**: 678-85, 1974.

- LAU, R.H.; MACKENZIE, M.M.; DOOLITTLE, W.F. Phycocianin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **132**: 771-8, 1977.
- LAVOREL, J. & ETIENNE, A.L. In vivo chlorophyll fluorescence. In: BARBER, J., ed. **Primary Processes in Photosynthesis**, Amsterdam, Elsevier, 1977, p.203-68.
- LIND, L.K.; SHUKLA, V.K.; NYHUS, K.J.; PAKRASI, H.B. Genetic and immunological analyses of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 show that the protein encoded by the *psbJ* gene regulates the number of photosystem II centers in thylaloid membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, **268**: 1575-9, 1993.
- LUNDELL, D.J.; YAMANAKA, G.; GLAZER, A.N. A terminal energy acceptor of the phycobilisome: the 75,000-dalton polypeptide of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes - a new biliprotein. **The Journal of Cell Biology**, New York, **91**: 315-19, 1981.
- MANODORI, A. & MELIS, A. Photochemical apparatus organization in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). Effect of CO₂ concentration during cell growth. **Plant Physiology**, Rockville, **74**: 67-71, 1984.
- MARCO, E.; OHAD, N.; SCHWARZ, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; GABAY, C.; KAPLAN, A. High CO₂ concentration alleviates the block in photosynthetic eletron transport in an *ndhB*-inactivated mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Plant Physiology**, Rockville, **101**: 1047-53.

- MARCUS, Y.; SCHATZ, R.; FRIEDBERG, D.; KAPLAN, A. High CO₂-requiring mutant of *Anacystis nidulans* R2. **Plant Physiology**, Rockville, **82**: 610-2, 1986.
- MARSAC, T. & COHEN-BAZIRE, G. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, **74**: 1635-39, 1977.
- McKAY, R.M.L.; GIBBS, S.P.; ESPIE, G.S. Effect of dissolved inorganic carbon on the expression of carboxysomes, localization of Rubisco and mode of inorganic carbon transport in cells of the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Archives of Microbiology**, Berlin, **159**: 21-9, 1993.
- METZ, J.G.; NIXON, P.J.; ROGNER, M.; BRUDVIG, G.W.; DINER, B.A. Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: evidence that tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P₆₈₀. **Biochemistry**, Washington, **28**: 6960-69, 1989.
- MI, H.; ENDO, T.; SCHREIBER, U.; ASADA, K. Donation of electrons from the cytosolic components to the intersystem chain in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002, as determined by reduction of P700⁺. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, **33**: 1099-105, 1992a.
- MI, H.; ENDO, T.; SCHREIBER, U.; OGAWA, T.; ASADA, K. Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, **33**: 1233-7, 1992b.

- MI, H.; ENDO, T.; SCHREIBER, U.; OGAWA, T.; ASADA, K. NAD(P)H dehydrogenase-dependent cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a study of dark-starved cells and spheroplasts. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, **35**: 163-73, 1994.
- MICHEL, H.; WEYER, K.A.; GRUENBERG, H.; DUNGER, I.; OESTERHELT, D.; LOTTSPREICH, F. The "light" and "medium" subunits of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequence. **EMBO Journal**, **5**: 1149-58, 1986.
- MILLER, A.G. & CANVIN, D.T. The quenching of chlorophyll *a* fluorescence as a consequence of the transport of inorganic carbon by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **894**: 407-13, 1987.
- MILLER, A.G. & CANVIN, D.T. Glycoaldehyde inhibits CO₂ fixation in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 without inhibiting the accumulation of inorganic carbon or the associated quenching of Chlorophyll *a* fluorescence. **Plant Physiology**, Rockville, **91**: 1044-9, 1989.
- MILLER, A.G.; ESPIE, G.S.; CANVIN, D.T. Active transport of CO₂ by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625: measurement by mass spectrometry. **Plant Physiology**, Rockville, **86**: 677-83, 1988a.
- MILLER, A.G.; ESPIE, G.S.; CANVIN, D.T. Active transport of inorganic carbon increases the rate of O₂ photoreduction by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiology**, Rockville, **88**: 6-9, 1988b.

- MILLER, A.G.; ESPIE, G.S.; CANVIN, D.T. Chlorophyll *a* fluorescence yield as a monitor of both active CO₂ and HCO₃⁻ transport by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Plant Physiology**, Rockville, **86**: 655-8, 1988c.
- MILLER, A.G.; ESPIE, G.S.; CANVIN, D.T. Physiological aspects of CO₂ and HCO₃⁻ transport by cyanobacterium: a review. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **68**: 1291-302, 1990.
- MILLER, A.G.; ESPIE, G.S.; CANVIN, D.T. The effects of inorganic carbon and oxygen upon fluorescence in the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **69**: 1151-60, 1991.
- MINAMI, Y.; WADA, K.; MATSUBARA, H. Kinetic studies on cytochrome *c* oxidase of membrane preparation from *Synechocystis* PCC 6714 and its partial purification. **Biochemistry**, Washington, **11**: 157-68, 1992.
- MULLINEAUX, C. & ALLEN, J.F. The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. **FEBS Letters**, Amsterdam, **205**: 155-60, 1986.
- MULLINEAUX, C. & ALLEN, J.F. Fluorescence induction transients indicate dissociation of photosystem II from the phycobilisome during the state-2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **934**: 96-107, 1988.

- MURATA, N. Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll *a* fluorescence in *Porphyridium cruentum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **172**: 242-51, 1969.
- NILSSON, F. Cyanobacteria as a model system for studies of oxygenic photosynthesis and respiration. Estocolmo, 1992. 43p. (Doctorial Dissertation - Department of Biochemistry Arrhenius Laboratories of Natural Sciences).
- OGAWA, T. Mutants of *Synechocystis* PCC 6803 defective in inorganic carbon transport. **Plant Physiology**, Rockville, **94**: 760-5, 1990.
- OGAWA, T. A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* PCC 6803. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, **88**: 4275-9, 1991.
- PELTIER, G. & SCHMIDT, G.W. Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Clamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, **88**: 4791-5, 1991.
- PESCHEK, G. & SCHNETTERER, G. Evidence for plastoquinol-cytochrome *f/b*-563 reductase as a common electron donor to P700 and cytochrome oxidase in cyanobacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, New York, **108**: 1188-95, 1982.

- PIERCE, J.; CARLSON, T.J.; WILLIAMS, J.G.K. A cyanobacterial mutant requiring the expression of ribulose biphosphate carboxylase from a photosynthetic anaerobe. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, **86**: 5753-7, 1989.
- PRICE, G.D. & BADGER, M.R. Ethoxzolamide inhibition of CO₂ uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. **Plant Physiology**, Rockville, **89**: 37-43, 1989a.
- PRICE, G.D. & BADGER, M.R. Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 creates a high-CO₂-requiring phenotype. **Plant Physiology**, Rockville, **91**: 505-13, 1989b.
- PRICE, G.D. & BADGER, M.R. Isolation and characterization of high CO₂-requiring-mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. **Plant Physiology**, Rockville, **91**: 514-25, 1989c.
- REINHOLD, L.; ZVIMAN, M.; KAPLAN, A. A quantitative model for inorganic carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, **27**: 945-54, 1989.
- RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, New York, **167**: 28-67, 1988.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Baltimore, **111**: 1-61, 1979.

SANDBMANN, G. & MALKIN, R. NADH and NADPH as electron donors to respiratory and photosynthetic electron transport in the blue-green alga *Aphanocapsa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, **725**: 221-4, 1983.

SANDBMANN, G. & MALKIN, R. Light inhibition of respiration is due to dual function of the cytochrome *b₆-f* complex and the plastocyanin/cytochrome *c-553* pool in *Aphanocapsa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, **234**: 105-11, 1984.

SANDBMANN, G. & MALKIN, R. Light inhibition of respiration is due to a dual function of the cytochrome *b₆-f* complex and the plastocyanin/cytochrome *c-553* pool in *Aphanocapsa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, **234**: 105-11, 1984.

SCHERER, S.; ALMON, H.; BÖGER, P. Interaction of photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, **15**: 95-114, 1988.

SCHLUCHTER, W.M.; ZHAO, J.; BRYANT, D.A. Isolation and characterization of the *ndhF* gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and initial characterization of an interposon mutant. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **175**: 3343-52, 1993.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, **10**: 51-60, 1986.

SÉTIF, P.; IKEGAMI, I.; BIGGINS, J. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **894**: 146-56, 1987.

- SIVAK, M.N. & VONSHAK, A. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* on solid support. Chlorophyll fluorescence kinetics. **New Phytology**, **110**: 241-47, 1988.
- SIVAK, M.N. & WALKER, D.A. Chlorophyll *a* fluorescence: can it shed light on fundamental questions in photosynthetic carbon dioxide fixation. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, **8**: 439-48, 1985.
- SOMMERVILLE, C.R. & OGREN, W.L. Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: EDELMAN, M.; HALLICK, R.; CHUA, N.H., ed. **Methods in chloroplast molecular biology**. New York, 1982, p.129-138.
- SPALDING, M.H.; SPREITZER, R.J.; OGREN, W.L. Carbonic anhydrase-deficient mutant of *Chlamydomonas* requires elevated carbon dioxide concentration for photoautotrophic growth. **Plant Physiology**, Rockville, **73**: 268-72, 1983.
- STANIER, G. Fine structure of cyanobacteria. **Methods and Enzymology**, New York, **176**: 714-27, 1988.
- STANIER, R.Y. & COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, **31**: 225-74, 1977.
- STEVENS, S.E.Jr & NIERZWICKI-BAUER, S. The cyanobacteria. In: STOLZ, J.F., ed.. **Structure of Phototrophic Prokaryotes**. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.15-47.

- SU, X.; FRAENKEL, P.G.; BOGORAD, L. Excitation energy transfer from phycocyanin to chlorophyll in an *apcA*-defective mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, **267**: 22944-50, 1992.
- SÜLTEMEYER, D.; BIEHLER, K.; FOCK, H.P. Evidence for the contribution of pseudocyclic photophosphorylation to the energy requirement of the mechanism for concentrating inorganic carbon in *Chlamydomonas*. **Planta**, Berlin, **189**: 235-42, 1993.
- TABITA, F.R. The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. In: BRYANT, D.A., ed. **The molecular biology of cyanobacteria**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1994, p.437-67.
- VOLOKITA, M.; ZENVIRTH, D.; KAPLAN, A.; REINHOLD, L. Nature of the inorganic carbon species actively taken up by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Plant Physiology**, Rockville, **76**: 599-602, 1984.
- WILLIAMS, W.P. & DOMINY, P.J. Control of excitation energy distribution in cyanobacteria: sensitivity to uncouplers and ATP synthase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, **1015**: 121-30, 1990.
- YOCUM, C.S. & BLINKS, L.R. Light-induced efficiency and pigment alterations in red algae. **Journal of General Physiology**, Baltimore, **41**: 1113-7, 1958.

YU, L.; ZAO, J.; MÜHLENHOFF, U.; BRYANT, D.A.; GOLBECK, J.H. PsaE is required for in vivo cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Plant Physiology**, Rockville, **103**: 171-80, 1993.

ZHAO, J.; SNYDER, W.B.; MÜHLENHOFF, U.; RHIEL, E.; WARREN, P.V.; GOLBECK, J.H.; BRYANT, D.A. Cloning and characterization of the *psaE* gene of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: characterization of a *psaE* mutant and overproduction of the protein in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Oxford, **9**: 183-94, 1993.

ZHAO, J.; ZHOU, J.; BRYANT, D.A. Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutants of *Synechococcus* sp. PCC 7002. In: MURATA, N., ed. **Research in photosynthesis**. Dordrecht, Kluwer, 1992. v.1, p.25-32.

APÊNDICE

Meios de cultura para cianobactérias.

- MEIO BG-11 (ALLEN, 1968).

Componentes	Soluções estoque (g/l)
Solução 1:	2x concentrada
NaNO ₃	3,0
MgSO ₄ .H ₂ O	0,084
Na ₂ CO ₃	0,04
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,071
Solução 2:	100x concentrada
EDTA (anidro)	0,10
Ác. cítrico.H ₂ O	1,32
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,60
Solução 3:	100x concentrada
K ₂ HPO ₄	3,9
Solução 4:	1000x concentrada
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,05

Preparo de 1 litro de meio:

Solução 1 500ml

Solução 2 10ml

Solução 3 10ml

Solução 4 1ml

Completar com água deionizada.

A solução 1 e a água deionizada são combinadas e autoclavadas; as demais soluções são autoclavadas individualmente e só então adicionadas à solução 1 e água deionizada.

- MEIO BG-11 TAMPONADO.

2,38 g de HEPES/ litro de meio BG-11

Adição do tampão à solução 1 + água deionizada, ajuste do pH a 8,0, utilizando NaOH 2N, autoclavagem, seguida da adição das soluções 2, 3 e 4, previamente autoclavadas.

- MEIO BG-11 contendo 5 mM de tiosulfato de sódio.

1,241 g de tiosulfato de sódio

Completar a 10 ml com água deionizada.

Esterilização por filtração, diretamente, em 1 litro de meio BG-11 tamponado, previamente autoclavado.

- MEIO BG-11 contendo 0,6% de LGP agarose.

0,6 g de LGP-agarose/100 ml de meio BG-11 tamponado.

Adição da agarose à solução 1 + água deionizada (pH 8,0), autoclavagem e adição das demais soluções, previamente autoclavadas.

- MEIO BG-11 contendo 12 mM KHCO_3 e 0,2 mM Na_2CO_3 .

KHCO_3	0,120 g
Na_2CO_3	0,002 g

Completar a 10 ml com água deionizada e esterilizar por filtração, diretamente em 90 ml de meio BG-11 tamponado, previamente autoclavado. Esta solução deve ser preparada a fresco.

Soluções utilizadas na obtenção e seleção de mutantes.

- Solução de tampão fosfato 30 mM (pH 7,0).

	g/l
KH ₂ PO ₄	5,22

Ajuste do pH, se necessário com NaOH 0,1 N. Esterilização por autoclavagem.

- Solução etilmetilsulfonato (EMS) 0,2 M.

Adição de 25 µl de EMS (PM = 124,2; d = 1,17 / Sigma-M 0880) em 1,25 ml de tampão fosfato 30 mM (pH 7,0). Esterilização por filtração.

- Solução tiosulfato de sódio 5% (pH 8,0).

Adição de 0,79 g de tiosulfato de sódio (PM = 248,18) em 10 ml de água deionizada. Ajuste do pH a 8,0 com NaOH 0,1 N. Esterilização por filtração ou autoclavagem.

- Solução de ampicilina (concentração final de 40 µg.ml⁻¹/placa).

Para a obtenção de uma concentração final de 40 µg.ml⁻¹/placa, adicionar 0,5 ml/placa da solução estoque: 1,0 mg de ampicilina em 25 ml de água deionizada. Esterilização por filtração.

- Solução de penicilinase (Sigma).

Para a obtenção de 1,8 unidades/ placa, ou seja, 0,74 µg de proteína/placa, adicionar 0,5 ml/ placa da solução estoque: 37 µg de penicilinase em 25 ml de água deionizada. Esterilização por filtração.

Soluções utilizadas no estudo da estrutura fina das células.

- Tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2)

Diluição 1:3 a partir da solução estoque de tampão cacodilato 0,2M (pH 7,2) utilizando-se água destilada.

-Solução estoque tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2.

42,8 g cacodilato de sódio trihidratado $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ / 1 água destilada

Acertar pH a 7,2, utilizando-se HCl 1 N.

- Karnovski modificado

glutaraldeído 2%

(1 ampola de glutaraldeído 25% em 10 ml de água destilada)

paraformaldeído 2%

(20 ml da solução estoque de paraformaldeído 10%)

tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2)

(25 ml da solução estoque de tampão cacodilato 0,2 m, pH 7,2)

cloreto de cálcio 0,001M

(1 ml da solução estoque de CaCl 0,1 M)

Completar com 44 ml de água destilada.

- Solução de tetróxido de ósmio 1%.

Soluções estoque

Preparo de 10 ml

OsO₄ 2%

5 ml

tampão cacodilato 0,1 M

5 ml

-Acetato de uranila 0,5%

Diluição 1:5 a partir da solução estoque de acetato de uranila 3%, utilizando-se água destilada.

-Acetato de uranila 3%

1 g de acetato de uranila em 30 ml de água destilada

Soluções utilizadas nos experimentos de fotossíntese.'

- Solução de tampão BTP 25 mM (pH 8,0).

BTP 7,06 g/l

Ajuste do pH a 8,0, utilizando-se HCl 3 N.

Deixar por 1 h sob borbulhamento com N_2 , para que a solução perca os gases presentes. Vedar o frasco com rolha de borracha e parafilme.

- Solução de $KHCO_3$ 100 mM.

0,1g de $KHCO_3$.

Completar a 10 ml com tampão BTP 25 mM (pH 8,0).

- Solução de $KHCO_3$ 10 mM.

1 ml de solução $KHCO_3$ 100 mM.

9 ml de tampão BTP 25 mM (pH 8,0).

- Solução de NaCl 1 M.

0,58 g de NaCl.

Completar a 10 ml com tampão BTP 25 mM (pH 8,0).