



R. 4352

REGULACION DE LOS NIVELES CELULARES DE LOS ENZIMAS
DEL SISTEMA DE REDUCCION DEL NITRATO EN CIANOBACTERIAS

T. D. - 76

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Licenciada Antonia Herrero Moreno.

A. Herrero

Sevilla, Marzo de 1983

DIRECTOR:

Dr. Miguel García Guerrero
Profesor Agregado de Bioquímica
Colaborador Científico del CSIC

PONENTE:

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

25-3-83

166

T.D. 76



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD
76

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral REGULACIÓN DE LOS NIVELES CELULARES
DE LOS ENZIMAS DEL SISTEMA DE REDUCCIÓN DEL NITRATO
EN C. INNOBACULUM

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

A. Revilla

ANITA RAMIREZ MORA

Sevilla, a 15 de Mayo de 1995

A Enrique y a Marina,

el descubrimiento y la conclusión
más interesantes de esta tesis
respectivamente

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y del CSIC de la Universidad de Sevilla que dirige el Profesor Manuel Losada Villasante, a quien quiero expresar mi reconocimiento por su continua labor en pro del desarrollo de la investigación en el mismo.

Agradezco a Enrique Flores el haber actuado como un excepcional compañero de trabajo durante todo el tiempo de mi estancia en este Departamento, y a Miguel García Guerrero su ayuda en la realización de esta tesis y en la resolución de las dificultades surgidas durante la misma.

Finalmente agradezco a la Fundación Ramón Areces su ayuda económica para la financiación de esta investigación.

INDICE

Abreviaturas y símbolos	1
1. <u>INTRODUCCION</u>	3
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	4
1.2. EL NITROGENO COMO CONSTITUYENTE DE LA MATERIA VIVA	5
1.3. LA ASIMILACION DEL NITRATO EN CIANOBACTERIAS	6
1.3.1. <u>Entrada del nitrato y del nitrito al interior de la célula</u>	6
1.3.2. <u>Reducción del nitrato</u>	8
1.3.3. <u>Asimilación del amonio</u>	10
1.4. REGULACION DE LA ASIMILACION DEL NITRATO EN MICROORGANISMOS.	12
1.4.1. <u>Regulación por amonio del transporte de nitrato</u>	12
1.4.2. <u>Regulación por nitrato y amonio de los niveles celulares de nitrato reductasa y nitrito reductasa</u>	13
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	16
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	17
2.2. ESTIMACION DE NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS .	21
2.2.1. <u>Permeabilización de las membranas celulares</u>	21
2.2.2. <u>Nitrato reductasa</u>	22
2.2.3. <u>Nitrito reductasa</u>	23
2.2.4. <u>Glutamina sintetasa (actividad transferasa)</u>	24
2.3. ESTIMACION DEL CONSUMO DE IONES NITROGENADOS INORGANICOS ...	26
2.3.1. <u>Consumo de nitrato y de amonio</u>	26
2.3.2. <u>Consumo de nitrito por células de <i>Anacystis nidulans</i></u> ..	26
2.4. METODOS ANALITICOS	28
2.4.1. <u>Determinación de nitrato</u>	28
2.4.2. <u>Determinación de nitrito</u>	28
2.4.3. <u>Determinación de amonio</u>	28
2.4.4. <u>Determinación de γ-glutamil hidroxamato</u>	29

2.4.5.	<u>Determinación del volumen de células empaquetadas de <i>A. nidulans</i></u>	29
2.4.6.	<u>Determinación de clorofila a</u>	30
2.4.7.	<u>Determinación de proteína</u>	30
2.4.8.	<u>Determinaciones espectrofotométricas</u>	31
2.4.9.	<u>Medidas del pH</u>	31
2.4.10.	<u>Medidas de intensidades de iluminación</u>	31
2.4.11.	<u>Medidas de flujos gaseosos</u>	31
2.5.	REACTIVOS	32
3.	RESULTADOS	33
3.1.	INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN VARIAS CIANOBACTERIAS	34
3.1.1.	<u>Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en <i>Anacystis nidulans</i></u>	34
3.1.2.	<u>Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en <i>Synechocystis</i> sp. 6714</u> ..	40
3.1.3.	<u>Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en <i>Anabaena variabilis</i></u>	42
3.1.4.	<u>Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en <i>Nostoc</i> sp. 6719</u>	48
3.1.5.	<u>Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en <i>Anabaena</i> sp. 7119</u>	52
3.2.	REGULACION DE LA SINTESIS DE NITRATO REDUCTASA EN VARIAS CIANOBACTERIAS	55
3.2.1.	<u>Efecto de inhibidores de la síntesis de ARNm y de proteínas sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa</u>	55
3.2.2.	<u>Liberación por MSX del efecto negativo del amonio sobre la síntesis de nitrato reductasa</u>	61
3.2.3.	<u>Efecto de aminoácidos sobre la síntesis de nitrato reductasa en <i>Anacystis nidulans</i></u>	73
3.3.	REGULACION DE LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN CELULAS DE <i>Anacystis nidulans</i>	95
3.3.1.	<u>Inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de <i>A. nidulans</i> en respuesta a la ausencia de fuente de nitrógeno</u>	96
3.3.1.1.	Inactivación en ausencia y presencia de inhibidores de síntesis de proteínas	96

3.3.1.2. Estabilidad de la inactivación en células permeabilizadas	99
3.3.2. <u>Prevención por nitrato, nitrito o amonio de la inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de <i>A. nidulans</i>.</u>	101
3.3.3. <u>Caracterización de la inactivación de la nitrato reductasa de <i>A. nidulans</i></u>	107
3.3.3.1. Efecto de la oscuridad y del DCMU	107
3.3.3.2. Efecto de la limitación en oxígeno	107
3.3.3.3. Efecto del metil viológeno	109
3.3.3.4. Efecto del DTE, la cisteína y el peróxido de hidrógeno	112
3.3.4. <u>Reversibilidad de la inactivación de la nitrato reductasa de <i>A. nidulans</i></u>	121
3.3.4.1. Reversión por nitrato o amonio	121
3.3.4.2. Reversión en la oscuridad	121
3.4. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA SINTESIS DE LA NITRITO REDUCTASA DE <i>Anacystis nidulans</i>	126
3.4.1. <u>Puesta a punto de un ensayo "in situ" de actividad nitrito reductasa</u>	127
3.4.2. <u>Puesta a punto de un ensayo "in vivo" de actividad nitrito reductasa</u>	131
3.4.3. <u>Regulación de la síntesis de la nitrito reductasa en función del nutriente nitrogenado</u>	135
3.4.3.1. Niveles celulares de nitrito reductasa determinados por diferentes nutrientes nitrogenados	137
3.4.3.2. Efecto de la rifampicina y el cloranfenicol sobre el desarrollo de actividad nitrito reductasa	146
3.4.3.3. Liberación por MSX del efecto represor del amonio sobre la síntesis de nitrito reductasa	146
3.4.3.4. Evidencia de que el efecto positivo del nitrato no requiere su previa transformación en nitrito	151
3.4.3.5. Síntesis simultánea de los enzimas del sistema reductor del nitrato en <i>A. nidulans</i>	155
4. <u>DISCUSION</u>	158
5. <u>CONCLUSIONES</u>	179
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	182

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín 5'-difosfato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosín 5'-trifosfato
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
DCMU	N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetil urea
DTE	ditioeritritol
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$	coeficiente de extinción milimolar para un paso de luz de 1 cm
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$	coeficiente de extinción mg/ml para un paso de luz de 1 cm
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
g	aceleración de la gravedad
GS	glutamina sintetasa
HEPES	N-2-hidroxietyl piperacina-N'-2-etanosulfonato
K_m	constante de Michaelis
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
MV	metil viológeno
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	nicotinamida adenín dinucleótido reducido o nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen

Tricina N-Tris (hidroximetil) metilglicina
Tris trihidroximetilaminometano
U unidad de actividad enzimática
v/v volumen/volumen
 λ longitud de onda

1. INTRODUCCION

1.1. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos cuya presencia sobre la Tierra data de unos 2 a 3×10^9 años (8). Estos organismos tienen la peculiaridad de que, a la vez que presentan una estructura celular procariótica, poseen un aparato fotosintético capaz de utilizar el agua como donador de electrones, funcionalmente similar al de las algas eucarióticas y plantas superiores (91, 108, 109).

Desde el punto de vista nutricional, las cianobacterias son organismos fundamentalmente fotolitoautótrofos (107), y aunque algunas son facultativas y pueden crecer heterotróficamente en la oscuridad, la mayoría de las estirpes presentan carácter de fotoautotrofia estricta (80, 91, 108).

Cuando las cianobacterias se cultivan autotróficamente, la fijación del anhídrido carbónico tiene lugar fundamentalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (41, 68), con una posible contribución de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (15, 18, 42, 70).

Dos aspectos a resaltar en el metabolismo intermediario de las cianobacterias son el papel prioritario del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato en el catabolismo de azúcares (69) y la existencia de un ciclo del ácido cítrico incompleto, debido a la ausencia de actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa (87).

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos tipos fundamentales de cianobacterias: unicelulares y filamentosas. En estas últimas, las células se presentan agrupadas formando tricomas (80). De las estirpes utilizadas en este trabajo, *Anacystis nidulans* y *Synechocystis* sp. 6714 son cianobacterias unicelulares típicas, mientras que *Anabaena*, *Nostoc* sp. 6719 y *Anabaena* sp. 7119 pertenecen al grupo de las filamentosas.

1.2. EL NITROGENO COMO CONSTITUYENTE DE LA MATERIA VIVA

El nitrógeno es uno de los elementos cualitativa y cuantitativamente más importantes de la materia viva, en la que se encuentra como componente de algunas de las biomoléculas más características, como son las proteínas y los ácidos nucleicos. Se ha calculado que la biomasa total almacenada sobre la Tierra es de alrededor de 2×10^{12} Tm, de las cuales el nitrógeno representa aproximadamente el 5% (10^{11} Tm). Cada año se incorporan a material orgánico alrededor de 10^{10} Tm de nitrógeno. La mayor parte de esta asimilación tiene lugar a partir de nitrato, mientras que sólo una pequeña fracción (unas 2×10^8 Tm de N) se basa en fijación de dinitrógeno, asimilándose directamente como amonio una cantidad indeterminada de nitrógeno (50, 51).

Con excepción de los animales, la utilización del nitrato como fuente nitrogenada se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de organismos, siendo realizada tanto por algas y plantas superiores como por distintos géneros de hongos y bacterias. Por su parte, la capacidad de llevar a cabo fijación de nitrógeno atmosférico se encuentra restringida a algunos grupos de procariotas.

Las cianobacterias utilizan prioritariamente nitrato y amonio como fuente de nitrógeno, siendo destacable la amplia distribución de la capacidad de reducción del nitrato en este grupo de organismos (109). No obstante, un buen número de estirpes pueden también fijar el nitrógeno atmosférico en aerobiosis, siendo particularmente característica la capacidad de desarrollar células especializadas en esta función (heterocistos) que poseen algunas cianobacterias filamentosas. De las diferentes cianobacterias empleadas en este trabajo, las unicelulares *Anacystis nidulans* (44, 80) y *Synechocystis* (80) pueden utilizar para su crecimiento tanto nitrato como amonio, pero no dinitrógeno, mientras que las filamentosas formadoras de heterocistos *Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp. 6719 y *Anabaena* sp. 7119, además de con nitrato y amonio, pueden crecer a expensas del nitrógeno atmosférico (80).

1.3. LA ASIMILACION DEL NITRATO EN CIANOBACTERIAS

En organismos procarióticos carentes de vacuolas de almacenamiento, como es el caso de las cianobacterias, la asimilación del nitrato comprende tres fases fundamentales: la entrada del nitrato al interior de la célula, la reducción del nitrato hasta el término de amonio, y la incorporación del amonio resultante en esqueletos carbonados para dar lugar, a continuación, a los diversos compuestos orgánicos nitrogenados que se encuentran en la célula.

1.3.1. Entrada del nitrato y del nitrito al interior de la célula

Puesto que la evidencia experimental disponible indica que los enzimas que participan en la reducción del nitrato en cianobacterias se localizan en el interior de las células de estos organismos, la propia reducción de este ión se considera también un proceso intracelular. Esta idea se ve corroborada por el hecho de que las actividades de esos enzimas no puedan detectarse en cianobacterias intactas, pero sí después de alterar mediante diversos procedimientos sus barreras de permeabilidad (24). En consecuencia, resulta manifiesto que el nitrato debe penetrar en la célula cianobacteriana antes de que pueda comenzar el proceso de su metabolización.

Al no poseer estos organismos vacuolas de almacenamiento de iones, el nitrato, una vez dentro de la cianobacteria, es inmediatamente transformado por reducción, lo que dificulta el estudio del paso de transporte en forma aislada. La mayoría de los estudios existentes sobre el proceso de entrada del nitrato en estos organismos se han realizado estimando la desaparición del ión del medio externo, desaparición que no sólo refleja el propio paso de entrada de nitrato, sino también el de su posterior reducción (22). No obstante, este sistema ha permitido obtener algunos datos interesantes acerca de las características del primer paso en el proceso de asimilación del nitrato.

El nitrato se comporta como un anión relativamente liposoluble que podría, por tanto, atravesar libremente la barrera lipídica que supone la membrana celular. La cuestión fundamental que se plantea es si la en-

trada por simple difusión de nitrato al interior celular, cuando este ión se encuentra en el medio a concentraciones tan bajas como las que normalmente se dan en hábitats naturales (1-10 μM), sería suficiente para satisfacer la demanda de nitrógeno de la célula cianobacteriana, o si por el contrario, se requeriría la operación de algún sistema de transporte activo para satisfacer dicha demanda.

Recientemente se ha demostrado (84) que las cianobacterias son relativamente impermeables al nitrato cuando este ión se encuentra en el medio externo a concentraciones inferiores a 1 mM. De hecho, la adición de nitrato, en este orden de concentración, a células intactas de *Anabaena* sp. 7119 y *Nostoc* sp. 6719 no provoca disminución de la fluorescencia emitida por la clorofila, a diferencia de lo que ocurre con células de estos mismos organismos sometidas a tratamiento suave con ultrasonidos o a la acción de detergentes (84, 85). No obstante, en las condiciones apropiadas, se observan altas velocidades de utilización de nitrato por suspensiones iluminadas de cianobacterias, incluso en presencia de concentraciones extracelulares de este ión bastante inferiores a 1 mM, lo cual sugiere la participación de un sistema de transporte activo en el proceso de entrada del nitrato al interior celular.

Fundamentalmente existen dos líneas de evidencia que apoyan la existencia de un sistema de transporte activo en cianobacterias. En primer lugar, la afinidad de las células intactas de *Anacystis nidulans* para el nitrato - K_m del orden de 1-10 μM (22) - es mucho mayor que la afinidad por ese sustrato de la nitrato reductasa del mismo organismo - $K_m = 0,7 \text{ mM}$ (9) - que es el primer enzima encargado de su metabolización intracelular. Igualmente, las células intactas de otra cianobacteria, *Oscillatoria*, exhiben un valor de K_m para el nitrato del orden de micromolar (112). En segundo lugar, la utilización de nitrato por diferentes estirpes de cianobacterias presenta un requerimiento de energía (se inhibe drásticamente por agentes desacoplantes e inhibidores de ATPasas, 22, 65, 77) que no es adjudicable al paso de la reducción intracelular de este ión (31). En consecuencia, aunque su existencia no se haya demostrado concluyentemente, los datos de que se dispone se explican mejor asumiendo la operatividad en cianobacterias de un sistema de transporte activo para el nitrato.

En cuanto a la entrada de nitrito en cianobacterias, se han argumentado consideraciones análogas a las expuestas para el caso del nitrato (22), pero con la particularidad de que al proceso global de adquisición de nitrito pueda contribuir, además del transporte activo del ión, la entrada pasiva de ácido nitroso ($pK_a = 3,4$) al interior de las células de estos organismos. La propuesta de una entrada pasiva de ácido nitroso se ha realizado concretamente para el caso de *A. nidulans* (20), en base a que la inhibición del proceso de consumo de nitrito por agentes que interfieren con la generación intracelular de ATP, es sólo parcial y dependiente del pH del medio externo (mayor a pH altos). Estos resultados se han tomado como indicación de la existencia de una entrada pasiva de ácido nitroso insensible a tales agentes, cuya contribución relativa a la entrada global de nitrito al interior celular aumentaría al disminuir el pH (a medida que disminuye el pH del medio externo aumentaría la proporción de la forma ácida respecto del total).

1.3.2. Reducción del nitrato

Una vez que el nitrato ha penetrado en la célula cianobacteriana se metaboliza inmediatamente por reducción. Puesto que el nitrógeno del nitrato posee una carga formal de +5, se requiere un proceso de reducción que implique la transferencia de ocho electrones, para que el nitrógeno pueda alcanzar la carga de -3 típica de los compuestos nitrogenados orgánicos. Esta reducción tiene lugar previamente a la incorporación del nitrógeno inorgánico a esqueletos carbonados, y resulta en la conversión del nitrato en amonio, la forma de nitrógeno inorgánico que posee el mismo estado de reducción que el nitrógeno orgánico.

Actualmente se encuentra bien establecido que, al igual que en otros organismos capaces de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, la reducción asimilatoria del nitrato hasta amonio en cianobacterias tiene lugar en dos pasos sucesivos. En primer lugar, el nitrato se reduce hasta nitrito en un proceso que implica la transferencia de dos electrones, catalizado por el enzima nitrato reductasa. A continuación, el nitrito resultante se reduce hasta amonio mediante una reacción de transferencia de seis electrones catalizada por la nitrito reductasa, sin que pueda detec-

tarse la liberación al medio de reacción de ningún compuesto nitrogenado de estado redox intermedio (31, 60).

Se ha conseguido purificar hasta homogeneidad la nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, que se ha caracterizado como una proteína de peso molecular 75.000 daltons, constituida por una única cadena polipeptídica, que presenta una K_m para el nitrato de 0,7 mM (9). Este enzima no parece contener grupos prostéticos flavínicos o hemínicos (en contraste con las nitrato reductasas de organismos eucarióticos), pero posee molibdeno, metal que se ha descrito como constituyente de todas las nitrato reductasas estudiadas, y que parece desempeñar un papel esencial en la actividad catalítica del enzima de *Anacystis* (9). El hecho de que el p-hidroximercuribenzoato, un reactivo típico de grupos sulfidrilo, actúe como un potente inhibidor de la nitrato reductasa de *A. nidulans* (54) sugiere la participación de tales grupos en la actividad catalítica del enzima.

En lo que se refiere a las nitrito reductasas de cianobacterias, se ha conseguido purificar y caracterizar parcialmente los enzimas de *A. nidu-*
lans (53) y *Anabaena* sp. 7119 (61). Para ambos se ha determinado que poseen valores de K_m para el nitrito comprendidos entre 70 y 100 μ M, estan-do constituidas por una única cadena polipeptídica. Ambas nitrato reduc-tasas parecen contener hierro, habiéndose propuesto la existencia de un grupo prostético del tipo sirohemo, típico de las nitrato reductasas de plantas superiores, en el enzima de *Anabaena* (61).

Una característica importante que poseen tanto las nitrato reducta-sas como las nitrito reductasas de todas las cianobacterias estudiadas es la de utilizar ferredoxina reducida como donador fisiológico de electro-nes (54, 55, 60, 66). Este hecho, unido a que los enzimas se encuentren generalmente asociados con membranas fotosintéticas (10, 33, 54, 66), su-giere que en cianobacterias exista una estrecha relación entre los proce-sos de la generación de poder reductor fotosintético y la reducción del nitrato. De hecho, existen diversas referencias acerca de la reducción de nitrato y/o nitrito asociada a fotosíntesis anoxygenica, en sistemas constituidos por células intactas o partículas que contenían clorofila y fe-rredoxina, iluminados en presencia de un donador de electrones adecuado para el fotosistema I (29, 33, 54, 66, 71). Posteriormente se ha consegui

do además la reducción de nitrato asociada a fotólisis del agua iluminando preparaciones de membranas fotosintéticas de *A. nidulans* que, en ausencia de cualquier suplemento adicional, catalizaban la reducción del nitrato añadido hasta nitrito y amonio (10). Resultados similares se han obtenido con partículas subcelulares de *Anabaena* sp. 7119 (66).

El desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato se ha estudiado también "in vivo" utilizando células intactas de *A. nidulans* que, mediante un tratamiento adecuado, se hacían incapaces de asimilar el amonio resultante de dicho proceso de reducción, con lo cual se conseguía evitar que las reacciones de asimilación pudiesen contribuir al desprendimiento de oxígeno medido (22). En estas condiciones se han descrito estequiometrías de unos 2 moles de oxígeno desprendido por mol de nitrato que entraba en la célula y se reducía hasta amonio (22). Experimentos similares utilizando nitrito como sustrato arrojaban estequiometrías de 1,5 moles de oxígeno por mol de nitrito reducido hasta amonio (22). Ambos valores de estequiometría coinciden con los que cabría esperar si la fotólisis del agua fuese el proceso encargado de suministrar los electrones necesarios para la reducción de nitrato y nitrito en estos organismos.

La naturaleza fotosintética de la reducción del nitrato y el nitrito en cianobacterias se ha visto confirmada finalmente con la comprobación de que ambos sustratos son capaces de provocar la disminución de la fluorescencia de la clorofila que manifiestan las células de *Anabaena* sp. 7119 y de *Nostoc* sp. 6719 al ser iluminadas (84, 85).

1.3.3. Asimilación del amonio

Como se ha indicado anteriormente, el amonio generado en el interior de la célula cianobacteriana como resultado de la reducción del nitrato, es un compuesto nitrogenado apto para combinarse con esqueletos carbonados.

Wolk y colaboradores han demostrado de manera elegante y concluyente, que la acción combinada de los enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa constituye la ruta principal de asimilación de amonio en cianobacterias fijadoras de nitrógeno (57, 58, 110). Tal conclusión se basaba fundamentalmente en el empleo del radioisótopo N^{13} y de inhibidores de los enzimas

implicados. En este sistema, el amonio se incorpora inicialmente al glutamato constituyendo el grupo amido de la glutamina resultante, a partir del cual se transfiere a la posición α del α -cetoglutarato con la formación concomitante de una molécula de glutamato. La reacción global de formación de una molécula de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato mediante esta ruta consume una molécula de ATP y dos equivalentes de poder reductor. El glutamato resultante puede actuar entonces como donador, directo o indirecto, de su grupo amino a una gran variedad de esqueletos carbonados orgánicos.

Para el caso de *Anacystis nidulans*, estirpe L 1402-1 (cianobacteria no fijadora del nitrógeno atmosférico) se ha identificado también la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa como la vía principal de asimilación tanto del amonio suministrado exógenamente al medio de cultivo, como del generado intracelularmente por reducción del nitrato (24). Los resultados experimentales en que se basa esta proposición consisten en estudios de asimilación de nitrato y de amonio y de niveles de glutamina y glutamato, en células de *A. nidulans* tratadas con inhibidores de los enzimas glutamina sintetasa o glutamato sintasa o de las transaminasas encargadas de distribuir a otros esqueletos carbonados el grupo α -amino del glutamato. A este respecto, es interesante señalar además que en extractos de esta cianobacteria se detectan altos niveles de actividad glutamina sintetasa, mientras que intentos reiterados de detectar la actividad glutamato deshidrogenasa (enzima característico de la otra gran ruta de asimilación de amonio descrita en microorganismos) resultaron infructuosas (78).

Por último, hay que destacar el hecho de que la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa sea operativa en *A. nidulans* tanto para células cultivadas con nitrato como con amonio como fuente de nitrógeno (24). Para el caso de la cianobacteria fijadora *Anabaena* ATCC 33047 se ha propuesto la misma vía de asimilación de amonio para células cultivadas con nitrato, amonio o dinitrógeno como fuente de nitrógeno (24, 79). En base a estos y otros estudios (21, 83, 93) parece poder generalizarse que en cianobacterias el amonio se asimila fundamentalmente a través de la ruta glutamina sintetasa-glutamato-sintasa, sin que, tal como sucede en otros microorganismos (101), la naturaleza de la vía preferencial de asimilación de amonio se vea influenciada por la fuente de nitrógeno utilizada para su cultivo.

1.4. REGULACION DE LA ASIMILACION DEL NITRATO EN MICROORGANISMOS

El proceso global de asimilación de nitrato en microorganismos en general puede verse afectado por una amplia variedad de factores, tales como son la disponibilidad de los diferentes sustratos requeridos, incluyendo, entre otros, reductores adecuados, ATP o determinados compuestos carbonados, así como por determinados metabolitos con papel regulador. Este apartado se restringe, sin embargo, a la consideración de los efectos reguladores que, sobre la asimilación del nitrato, ejercen el propio nitrato y el ión amonio (producto final de la reducción del nitrato). Dentro de este marco se considerarán exclusivamente los efectos reguladores ejercidos sobre las primeras etapas del proceso global de asimilación del nitrato, esto es, la entrada del sustrato al interior de la célula y su reducción intracelular hasta amonio.

1.4.1. Regulación por amonio del transporte de nitrato

El amonio se comporta como un efectivo antagonista de la asimilación del nitrato en prácticamente todos los tipos de microorganismos estudiados. Entre los distintos niveles a que puede ejercer su acción negativa, hay que resaltar la rápida inhibición del consumo de nitrato provocada por la presencia de bajas concentraciones de amonio en el medio donde se encuentran suspendidas las células de esos microorganismos. Este efecto se ha descrito, entre otros, para diferentes estirpes de *Chlorella* (16, 72, 98, 100), para *Chlamydomonas reinhardtii* (97, 99) y para *Phaeodactylum tricorutum* (17), habiéndose propuesto en algunos de estos casos que se encuentra mediado por productos de la asimilación del amonio (98) y que opera a nivel de transporte del nitrato al interior de la célula (17).

Para el caso de cianobacterias, se ha estudiado detalladamente la inhibición del consumo de nitrato en células de *A. nidulans* provocada por la presencia en el medio de concentraciones micromolares de amonio, habiéndose observado que esta inhibición procede de manera inmediata y reversible (21). Resultados similares se han descrito para las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno *Anabaena* sp. 7119, *Nostoc* sp. 6719 (21) y *Anabaena cylindrica* (65).

Flores et al (21, 24) han propuesto que el efecto inhibitor del amonio sea en realidad ejercido por algún(os) de los productos de la metabolización del amonio a través de GS que, con carácter de reguladores negativos podrían actuar en la utilización del nitrato y más concretamente en el transporte de este ión al interior celular.

1.4.2. Regulación por nitrato y amonio de los niveles celulares de nitrato reductasa y nitrito reductasa

El amonio, producto final de la reducción asimilatoria del nitrato, actúa como un efectivo regulador de los niveles celulares de nitrato reductasa en una gran variedad de microorganismos, habiéndose descrito efectos negativos de este compuesto sobre la actividad, la síntesis y la estabilidad del enzima (31, 51, 105). Por otra parte, se ha adjudicado al nitrato un papel positivo sobre la síntesis o la estabilidad de la nitrato reductasa de algunos microorganismos (31, 64, 89).

En algas eucarióticas se ha estudiado con bastante detalle el papel de estos dos nutrientes sobre la síntesis del enzima que cataliza la reducción asimilatoria del nitrato hasta nitrito (la NAD(P)H-nitrato reductasa). Las conclusiones que pueden desprenderse de tales estudios son, por una parte, que el amonio actúa como represor de dicho enzima en la mayoría de los casos considerados (35, 62, 104), y por otra, que el nitrato no puede considerarse como inductor obligatorio, puesto que la síntesis de la nitrato reductasa puede tener lugar en estos organismos en medios que carecen de nutrientes nitrogenados o que contienen aminoácidos como única fuente de nitrógeno (35, 90, 96, 104).

Por el contrario, en la actualidad se dispone de poca información referente a efectos reguladores del nitrato y el amonio sobre la síntesis de las nitrato reductasas de algas procarióticas (cianobacterias), habiéndose descrito inducción por nitrato de los enzimas de la especie unicelular *Agmenellum quadruplicatum* (92) y de la filamentosa fijadora de nitrógeno *Anabaena cylindrica* (32, 64), y represión por amonio de los de las especies unicelulares *Anacystis nidulans* (54) y *Agmenellum quadruplicatum* (92). No obstante, las conclusiones alcanzadas tanto para *Agmenellum* como para *Anacystis* deben considerarse como poco sólidas puesto que se basan,

exclusivamente, en la comparación de los niveles de nitrato reductasa encontrados en células cultivadas con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno.

Quizás el hongo *Neurospora crassa* sea el microorganismo donde se han estudiado con mayor detalle los efectos reguladores ejercidos por el nitrato y el amonio sobre los niveles celulares de nitrato reductasa. En este caso no sólo se ha descrito que ambos nutrientes desarrollan papeles antagonistas a nivel de síntesis del enzima (2, 4, 19, 73, 89) sino que también se han aportado valiosas contribuciones para el conocimiento del mecanismo por el cual el amonio ejerce su efecto represor, habiéndose propuesto, con apoyo experimental sólido, que no es este compuesto por sí mismo, sino la glutamina o un derivado de ésta el que, a nivel molecular, interfiere con la síntesis de la nitrato reductasa. En *N. crassa* se ha demostrado además que el nitrato aumenta la estabilidad de las moléculas de nitrato reductasa una vez sintetizadas, lo cual contribuye a determinar los altos niveles enzimáticos encontrados en micelios cultivados en presencia de este sustrato nitrogenado (89, 95).

En cuanto a los posibles efectos del nitrato, el nitrito o el amonio sobre la actividad nitrato reductasa celular, se han desarrollado escasos estudios que, además, son poco concluyentes en general. No obstante, de ellos parece desprenderse que también los niveles de este enzima, segundo de la ruta de reducción asimilatoria del nitrato, se encuentran regulados por la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo del microorganismo correspondiente, habiéndose descrito inducción por nitrito de la nitrato reductasa de *Anabaena cylindrica* (64) y represión por amonio de las de *Neurospora crassa* (13) y *Anabaena* sp. 7119 (60).

En este trabajo se presenta un estudio de los efectos reguladores ejercidos por el nitrato y el amonio sobre los niveles celulares de nitrato reductasa en varias cianobacterias -dos unicelulares incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico y tres filamentosas fijadoras de nitrógeno- habiéndose concluido la existencia de modelos de regulación distintos en ambos tipos de cianobacterias. También se ha puesto de manifiesto que el amonio no ejerce por sí mismo ninguno de los efectos negativos atri-

buibles a su presencia en el medio de cultivo, sino que, para desarrollar los, debe incorporarse previamente en compuestos orgánicos nitrogenados a través de la glutamina sintetasa. Se ha estudiado también la estabilidad "in vivo" de la nitrato reductasa de *A. nidulans*, parámetro que, junto con la velocidad de síntesis, determina los niveles celulares de cualquier enzima, pudiéndose concluir la existencia de diferentes grados de estabilidad del enzima de *Anacystis* en respuesta a la presencia o ausencia de nutrientes nitrogenados. Por último se ha estudiado la influencia del nitrato, el nitrito y el amonio sobre los niveles celulares de la actividad nitrito reductasa de *A. nidulans*, habiéndose alcanzado como conclusión más significativa la de que el amonio actúa también como represor nutricional de este enzima, con un efecto mediado por productos de su asimilación a través de la glutamina sintetasa.

Parte de los resultados que aquí se exponen se encuentran ya publicados (24, 39) o en vías de publicación (40), habiendo sido presentados también en reuniones y congresos (32, 36, 38, 82).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado como material biológico las cianobacterias siguientes: *Anacystis nidulans* estirpe L 1402-1, unicelular no fijadora de nitrógeno, obtenida de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Göttingen (RFA); *Synechocystis* sp. estirpe PCC 6714, unicelular no fijadora de nitrógeno, obtenida de la Colección de Cultivos del Instituto Pasteur (Francia); *Nostoc* sp. estirpe PCC 6719, filamentosa formadora de heterocistos, obtenida igualmente de la Colección de cultivos del Instituto Pasteur; *Anabaena* sp. estirpe 7119 (previamente clasificada como *Nostoc muscorum* UW), filamentosa formadora de heterocistos, facilitada por el Profesor D.I. Arnon de la Universidad de Berkeley en California (USA); y *Anabaena variabilis* estirpe ATCC 29413, filamentosa formadora de heterocistos, procedente de la Colección Americana de Cultivos Modelo (ATCC). Estos microorganismos se cultivaban fotoautotróficamente en condiciones axénicas en alguno de los medios sintéticos que se describen a continuación.

Medio A: contenía los siguientes nutrientes disueltos en un litro de agua destilada: SO_4Mg , 0,5 mmol; Cl_2Ca , 0,1 mmol; ClNa , 2 mmol; MoO_4Na_2 , 4 μmol ; PO_4HK_2 12 mmol; CO_3HNa , 10 mmol; 1 ml de una disolución de Fe-EDTA; 1 ml de una disolución de micronutrientes y la cantidad del correspondiente nutriente nitrogenado que se especifica en la Tabla 1. La disolución de micronutrientes contenía, por litro de agua destilada, BO_3H_3 , 46 mmol; Cl_2Mn , 9 mmol; SO_4Zn , 0,77 mmol; y SO_4Cu , 0,32 mmol. La disolución de Fe-EDTA se preparaba según el procedimiento descrito por Arnon et al (3), como sigue. Se disuelven 16 g de EDTA y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y se mezclan con una disolución conteniendo 13,7 g de $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 364 ml de agua. A continuación se burbujea aire a través de la mezcla resultante, durante 6-12 h, con objeto de oxidar el hierro hasta la forma férrica.

El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes, excepto el fosfato y el bicarbonato, se esterilizaba en autoclave, durante 20 min, a la presión de 2 atm (121°C). El fosfato y el bicarbonato se añadían en forma de disolución concentrada de estos compuestos, la cual se esterilizaba por separado, en las mismas condiciones, y se mezclaba con el resto

Tabla 1. Condiciones de cultivo y tiempos de generación de las estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo

Organismo	Temp.	Medio*	Fuente de N	t_g
<i>Anacystis nidulans</i>	40°C	A	NO ₃ K (20 mM)	3,4 h
			SO ₄ (NH ₄) ₂ (10 mM)	3,3 h
<i>Synechocystis</i> sp. 6714	30°C	C	NO ₃ Na (17,6 mM)	7,3 h
			SO ₄ (NH ₄) ₂ (2,5 mM)	7,7 h
<i>Nostoc</i> sp. 6719	30°C	B	NO ₃ K (20 mM)	11,6 h
			Aire (78% N ₂)	18,2 h
			SO ₄ (NH ₄) ₂ (2 mM)	11,9 h
<i>Anabaena</i> sp. 7119	30°C	B	NO ₃ K (20 mM)	8,8 h
			Aire (78% N ₂)	12,9 h
			SO ₄ (NH ₄) ₂ (2 mM)	8,6 h
<i>Anabaena variabilis</i>	35°C	B	NO ₃ K (20 mM)	5,9 h
			Aire (78% N ₂)	8,1 h
			SO ₄ (NH ₄) ₂ (2,5 mM)	5,7 h

* Véase el texto para la composición de cada uno de los medios de cultivo.

del medio de cultivo, una vez enfriado hasta la temperatura ambiental.

Medio B: era análogo al medio A y se preparaba de igual forma, excepto que las concentraciones de fosfato y bicarbonato eran la mitad de las contenidas en el medio A. Es decir, PO_4HK_2 , 6 mM y CO_3HNa , 5 mM.

Medio C: contenía los siguientes nutrientes disueltos en un litro de agua destilada: PO_4HK_2 , 0,2 mmol; SO_4Mg , 0,3 mmol; Cl_2Ca , 0,25 mmol; ácido cítrico, 30 μmol ; citrato férrico amónico, 6 mg; EDTA disódico, 2,5 μmol ; CO_3Na_2 , 1 mmol; CO_3HNa , 10 mmol; 1 ml de la misma disolución de micronutrientes utilizada en el medio A; MOO_4Na_2 , 2 μmol ; y la cantidad del correspondiente nutriente nitrogenado que se especifica en la Tabla 1. El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes se esterilizaba en las mismas condiciones que se han descrito para los medios A y B.

Un volumen de 35 ml de cualquiera de estos medios, contenido en un tubo de 23 mm de diámetro por 200 mm de largo, se inoculaba, en condiciones asépticas, con una cantidad de células de uno de los microorganismos utilizados, correspondiente a 5-15 μg de clorofila a. La suspensión celular resultante se incubaba en un baño termostatzado a la temperatura adecuada para cada organismo, siendo iluminada de manera continua con lámparas fluorescentes que proporcionaban luz blanca con una irradiancia de 25 W/m^2 en la cara expuesta del tubo de cultivo. A través de la suspensión celular se burbujeaba aire esteril enriquecido con CO_2 (en proporción aproximada de 95:5, v/v) que proporcionaba tanto agitación como la fuente de carbono necesaria para el crecimiento del cultivo.

En la Tabla 1 se especifican los medios y las temperaturas utilizados rutinariamente para el cultivo de cada uno de los microorganismos empleados, así como los tiempos de generación determinados en esas condiciones. La estimación de los tiempos de generación de las diferentes cianobacterias se llevó a cabo a partir de los datos cinéticos de aumento en el contenido de proteína celular (seguido desde unos 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$) de cultivos de la estirpe correspondiente en las condiciones de temperatura y nutrición nitrogenada que se indican.

Cuando, por razones experimentales, se quería transferir células de cualquiera de dichos microorganismos a un medio de cultivo que contuviese

una fuente de nitrógeno distinta a la que se había utilizado para su crecimiento, esas células se recogían en filtros Millipore tipo HA de 0,45 μm de diámetro de poro, se lavaban exhaustivamente sobre el mismo filtro con el nuevo medio y se resuspendían en él a una concentración celular que, salvo que se indique otra cosa, correspondía a 4-8 μg de clorofila a por ml de medio de cultivo (Todos los experimentos que se describen en el apartado 3.3 de la sección de Resultados se han llevado a cabo con suspensiones de *Anacystis nidulans* que contenían 1 μl de células por ml).

Para todas las estirpes utilizadas en este trabajo, los inóculos originales, obtenidos de las colecciones que se ha indicado, se mantenían hasta el momento de su utilización para crecimiento rápido en medio líquido, en condiciones estériles en tubos cerrados herméticamente conteniendo medio sólido inclinado. El medio sólido se preparaba mezclando, después de haber sido esterilizados por separado y enfriados a unos 40°C, un volumen de una disolución al 4,5% (p/v) de agar en agua con dos volúmenes de medio C modificado, en el que la concentración de CO_3HNa y de CO_3Na_2 era tres veces superior a la normal para ese medio, siendo la del resto de sus componentes 1,5 veces mayor que la típica.

2.2. ESTIMACION DE NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

En el curso de este trabajo se han determinado niveles celulares de actividad de los enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa. El tipo de ensayo elegido ha sido la modalidad "in situ" por su idoneidad para los fines propuestos. Además de evitarse posibles artefactos e interferencias a los que, en general, se encuentran sometidos los ensayos con extractos celulares, los ensayos in situ presentan ventajas adicionales en lo que se refiere tanto a rapidez como a comodidad. La determinación de una actividad enzimática in situ se caracteriza esencialmente por utilizar, como preparación enzimática, una suspensión de células cuyas membranas se han hecho permeables, mediante un tratamiento adecuado, a compuestos de bajo peso molecular.

2.2.1. Permeabilización de las membranas celulares

Cuando, por requerimiento de una situación experimental determinada, las células en las que quería determinarse una actividad enzimática se encontraban suspendidas en presencia de algún compuesto distinto a los que se han definido como componentes de los medios de cultivo, este compuesto se eliminaba por lavado antes de iniciar el tratamiento de permeabilización. Para ello, las células se recogían por filtración en un filtro Millipore HA de 0,45 μm , se lavaban exhaustivamente con tampón o medio de cultivo sobre el mismo filtro, y se resuspendían en el mismo líquido de lavado. La suspensión de células lavadas resultante se sometía entonces a uno de los tratamientos de permeabilización que se describen a continuación.

Las membranas celulares se hacían permeables a los componentes de las mezclas de reacción para el ensayo "in situ" de las actividades enzimáticas mediante diferentes tratamientos, bien con solventes orgánicos, tales como tolueno o etanol, o con un detergente como el MTA.

El tratamiento con tolueno consistía en mezclar, mediante agitación vigorosa durante 2 min, 20 μl de tolueno con una suspensión celular conteniendo de 5 a 10 μg de clorofila a en 1 ml de tampón o medio de cultivo. Una alícuota de la suspensión celular tratada con tolueno se utilizaba,

inmediatamente después de la permeabilización, en el ensayo de la actividad enzimática correspondiente.

La permeabilización con etanol se conseguía mediante tratamiento de las células con etanol al 75% (v/v). El procedimiento seguido consistía en añadir, a un volumen de suspensión celular, tres volúmenes de etanol absoluto y, tras agitación vigorosa durante 5-10 s, centrifugar la mezcla resultante a 12.000 g durante 10 min. El precipitado obtenido en esta centrifugación se lavaba con 40 ml de tampón Tris-ClH 25 mM, pH 8,5, suplementado con 0,5 mM de EDTA y se centrifugaba nuevamente en las mismas condiciones. El precipitado de esta segunda centrifugación se resuspendía con 1 ml del mismo tampón, utilizándose esta suspensión para el ensayo de la actividad enzimática correspondiente.

La permeabilización de las membranas celulares con el detergente iónico MTA no requería pretratamiento de las células con el detergente, sino que éste se añadía a la mezcla de reacción para el ensayo de la actividad enzimática considerada, a una concentración final que dependía de la actividad a determinar y del organismo utilizado. En este trabajo se han establecido las concentraciones óptimas de MTA para cada caso, siendo éstas las empleadas en los correspondientes ensayos de actividad. Las cantidades de MTA presentes por ml de mezcla de reacción eran las siguientes. (a) actividad nitrato reductasa: 75 µg para *Anacystis nidulans* y 50 µg para *Anabaena variabilis*; (b) nitrito reductasa: 750 µg para *A. nidulans*; (c) glutamina sintetasa (actividad transferasa): 500 µg para *A. nidulans* y *A. variabilis*. En todos los casos el procedimiento llevado a cabo para los ensayos de actividad consistía en mezclar una alícuota de una suspensión de células normales (no permeabilizadas) con un volumen adecuado de la mezcla de ensayo correspondiente, conteniendo todos los componentes habituales además de la cantidad citada de MTA. Después de agitar vigorosamente durante 2-5 s para homogeneizar la suspensión resultante, se procedía de igual forma que para el caso de células previamente sometidas a tratamiento con tolueno o etanol.

2.2.2. Nitrato reductasa

Para estimar el nivel celular de actividad nitrato reductasa se añe-

día una alícuota de la suspensión de células permeabilizadas (mediante pretratamiento con tolueno o etanol) a la mezcla de ensayo para la determinación de esta actividad enzimática. La suspensión resultante contenía, en un volumen de 0,9 ml, además de células, los componentes siguientes (54): tampón $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$, pH 10,5, 100 μmol ; NO_3K , 20 μmol ; y metilviológeno 4 μmol . Si en lugar de células permeabilizadas se utilizaban células no tratadas, esta suspensión contenía además la cantidad de MTA que se indica en el apartado anterior. En cualquier caso, la reacción se iniciaba añadiendo, a los 0,9 ml de la suspensión de células en mezcla de ensayo, 0,1 ml de una disolución que contenía 100 μmol de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ por ml de CO_3HNa 0,3 M, y que se preparaba inmediatamente antes de su empleo. La mezcla de reacción resultante se incubaba a 30°C durante 5 min, transcurridos los cuales la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa. Con objeto de precipitar el material insoluble, la mezcla de reacción se suplementaba entonces con 0,1 ml de NaOH 1 N y 0,1 ml de SO_4Zn 1 M, centrifugándose durante 5 min a 1.500-2.000 g.

La determinación del nitrito formado durante la reacción se llevaba a cabo en muestras constituidas por 0,5 ml del sobrenadante de dicha centrifugación suplementadas con 0,5 ml de una disolución de formaldehído al 0,5% (v/v); este compuesto se añadía con objeto de evitar las interferencias que algunos de los productos de la oxidación del ditionito presente en la mezcla de reacción pudiesen provocar en la posterior determinación de nitrito. Las cantidades de nitrito encontradas se corregían para el nitrito presente en un control paralelo en el que la alícuota de suspensión de células se añadía a la mezcla de ensayo una vez que el ditionito había sido oxidado. Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 μmol de nitrito formado por min.

2.2.3. Nitrito reductasa

La actividad nitrito reductasa se determinaba siempre en células permeabilizadas mediante tratamiento con MTA. El procedimiento que se utilizaba consistía en añadir una alícuota, conteniendo 20-25 μg de clorofila a, de una suspensión de células (que no se habían sometido previamente a ningún tratamiento de permeabilización) a un volumen adecuado de

mezcla de ensayo para la determinación de actividad nitrito reductasa. La suspensión así obtenida contenía, en un volumen de 0,9 ml, los siguientes componentes: tampón MOPS-NaOH, pH 7,2, 25 μmol ; NO_2K , 500 nmol; metil viológeno, 5 μmol ; y la cantidad de MTA que se indica en el apartado 2.2.1.

La reacción se iniciaba añadiendo a esos 0,9 ml de suspensión de células en mezcla de ensayo, 0,1 ml de una disolución que contenía 200 μmol de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ por ml de CO_3HNa 0,3 M, y que se había preparado inmediatamente antes de su empleo. La mezcla de reacción resultante se incubaba a 30°C durante 10 min, transcurridos los cuales la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa. A partir de este momento, y para eliminar el material insoluble, esa mezcla de reacción se procesaba del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior para la determinación de nitrato reductasa, procediéndose a continuación a la determinación del nitrito presente en una alícuota del sobrenadante obtenido en la centrifugación correspondiente. Las cantidades de nitrito encontradas se comparaban entonces con la presente en un control en el que la alícuota de suspensión de células se había añadido a la mezcla de ensayo tras la oxidación del ditionito, estimándose así la cantidad de nitrito desaparecida durante el ensayo de actividad nitrito reductasa. Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 μmol de nitrito desaparecido por min.

2.2.4. Glutamina sintetasa (actividad transferasa)

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (86). Cuando el ensayo se realizaba en células permeabilizadas con tolueno, se procedía añadiendo una cantidad, correspondiente a 2,5-5 μg de clorofila a, de tales células previamente permeabilizadas, a un volumen adecuado de mezcla de ensayo para la determinación de glutamina sintetasa. Además de la cantidad de células indicada, la suspensión resultante contenía en un volumen de 0,9 ml: tampón HEPES, pH 7,3, 50 μmol ; L-glutamina, 30 μmol ; Cl_2Mn , 3 μmol ; ADP, 0,4 μmol ; y AsO_4HNa_2 , 20 μmol . Cuando la permeabilización de las membranas celulares se llevaba a cabo con MTA, se añadía una cantidad de células no tratadas, correspondiente a 2,5-5 μg de clorofila a, a un vo-

lumen adecuado de mezcla de ensayo que contenía, además de los componentes anteriores, la cantidad de MTA necesaria para conseguir la concentración final que se indica en el apartado 2.2.1.

En ambos casos la reacción se iniciaba por adición de 0,1 ml de una disolución que se obtenía mezclando, en el momento de ser utilizada, volúmenes iguales de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M. La mezcla de reacción se incubaba a 30°C durante 10 min, con agitación ocasional, y la reacción se paraba por adición de 2 ml de una disolución de Cl_3Fe en medio ácido (ver apartado 2.4.3). Esta disolución constituye además el reactivo revelador del γ -glutamil hidroxamato, producto de la actividad transferasa del enzima glutamina sintetasa. Las cantidades de γ -glutamil hidroxamato formadas en la reacción enzimática se determinaban espectrofotométricamente en los sobrenadantes resultantes de centrifugar, a baja velocidad, la mezcla de reacción suplementada con el reactivo revelador, y se corregían con la absorbancia de un control, procesado en forma análoga, en el cual la mezcla de hidroxilamina-NaOH se había sustituido por 0,1 ml de agua. Una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 μmol de γ -glutamil hidroxamato formado por min.

2.3. ESTIMACION DEL CONSUMO DE IONES NITROGENADOS INORGANICOS

La utilización de nitrato, nitrito o amonio por células de cualquiera de las cianobacterias estudiadas, se determinó siguiendo la desaparición de estos sustratos del medio en que estaban suspendidas las células.

2.3.1. Consumo de nitrato y de amonio

Células procedentes de cultivos con nitrato como fuente de nitrógeno se recogían por filtración, lavándose exhaustivamente sobre el mismo filtro con tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,1 y resuspendiéndose, a la concentración de clorofila que se indica en cada experimento, con 10 ml del mismo tampón suplementado con CO_3HNa 10 mM. La suspensión celular resultante se disponía en un erlenmeyer de 50 ml, abierto al aire, que se incubaba, con agitación continua, a la luz (100 W/m^2 de luz blanca suministrada desde abajo) en un baño termostatzado a la temperatura de cultivo del microorganismo utilizado. Los ensayos se iniciaban por adición de los sustratos nitrogenados adecuados: NO_3K 0,25-0,3 mM y/o ClNH_4 0,25-1 mM. En el momento deseado se tomaban alícuotas de la suspensión celular que, inmediatamente, se sometían a filtración a través de filtros Millipore tipo HA de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. La concentración de nitrato y/o amonio se estimaba entonces en los filtrados libres de células correspondientes. Cuando se probaba el efecto del MSX sobre el consumo de nitrato o de amonio, la suspensión celular se preincubaba, durante 15-20 min, en presencia de dicho compuesto, a la concentración que se indica en cada experimento, en las mismas condiciones que se han descrito para los ensayos de consumo.

2.3.2. Consumo de nitrito por células de *Anacystis nidulans*

Células de *Anacystis nidulans* constituyentes de una suspensión que había sido sometida a las condiciones experimentales que se indica en cada caso, se recogían por filtración y, tras lavado exhaustivo con tampón MOPS 25 mM, pH 7,2, se resuspendían con 3 ml de este mismo tampón a una concentración celular de aproximadamente $1 \mu\text{l}$ de células por ml. La suspensión así obtenida se colocaba en un erlenmeyer de 25 ml abierto al aire, que se incubaba con agitación continua e iluminación (100 W/m^2 de luz

blanca suministrada desde abajo) en un baño termostatzado a 40°C. Los ensayos se iniciaban por adición de 30 µl de NO₂K 20 mM (concentración final de nitrito en el ensayo, 0,2 mM). A tiempo cero y en los momentos deseados, se tomaban alícuotas de 0,15 ml de dicha suspensión, las cuales se añadían a tubos conteniendo 0,85 ml de agua, que se suplementaban inmediatamente con los reactivos de determinación de nitrito.

2.4. METODOS ANALITICOS

2.4.1. Determinación de nitrato

El nitrato se determinaba por absorbancia a 210 nm en disolución ácida (12). Un volumen de 1,5 ml de muestra, conteniendo entre 0 y 250 nmol de nitrato, se suplementaba con 0,1 ml de ácido amido-sulfúrico al 10% (p/v). Tras incubar unos 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 0,4 ml de ácido perclórico al 20% (p/p). La concentración de nitrato se estimaba midiendo la absorbancia (a 210 nm) de la disolución resultante y empleando el siguiente coeficiente de extinción: $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 7,4$. El tratamiento con ácido amido-sulfúrico eliminaba cualquier pequeña cantidad de nitrito que pudiera encontrarse en la disolución y que también podría absorber la luz ultravioleta en medio ácido.

2.4.2. Determinación de nitrito

El nitrito se determinaba mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway según el procedimiento descrito por Snell y Snell (88). El método de determinación consistía en añadir, a 1 ml de muestra conteniendo entre 0 y 30 nmol de nitrito, 1 ml de una disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH 2,4 N y 1 ml de una disolución de cloruro de N-(1-Naftil)etilendiamonio al 0,02% (p/v) en agua. Tras agitar la mezcla resultante, ésta se dejaba durante 10 min en condiciones ambientales, después de lo cual se utilizaba para determinar espectrofotométricamente la concentración del complejo coloreado formado, utilizando el siguiente coeficiente de extinción a 540 nm: $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 55,0$. Cuando la muestra en que se quería determinar la cantidad de nitrito presente contenía aún algún material insoluble, tal como restos celulares, (p. ej., en las procedentes de los ensayos de consumo de nitrito), la mezcla de determinación se centrifugaba, a baja velocidad, inmediatamente antes de realizar las determinaciones espectrofotométricas (que entonces se llevaban a cabo en los sobrenadantes resultantes de dicha centrifugación).

2.4.3. Determinación de amonio

El amonio se determinaba enzimáticamente estimando la oxidación de

NADPH en la reacción de síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa, con cantidades limitantes de amonio (6). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, los compuestos siguientes: tampón Trietanolamina, pH 8,6, 100 μ mol; α -cetoglutarato, 10 μ mol; ADP, 1,2 μ mol; NADPH, 0,2-0,25 μ mol; y una alícuota de muestra conteniendo entre 0 y 80 nmol de amonio. La reacción se iniciaba por adición de 20 μ l de una preparación de glutamato deshidrogenasa de muy bajo contenido en amonio (7-10 unidades de enzima) y se desarrollaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min. La concentración de NADPH presente en la mezcla de reacción, antes de añadir la glutamato deshidrogenasa y después del desarrollo de la reacción, se determinaba espectrofotométricamente utilizando el siguiente coeficiente de extinción a 340 nm: $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 6,2$. Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido se corregían con blancos a los que no se añadía amonio.

2.4.4. Determinación de γ -glutamil hidroxamato

El γ -glutamil hidroxamato formado en el ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinaba por reacción con Cl_3Fe en medio ácido (86). A 1 ml de disolución, conteniendo el γ -glutamil hidroxamato a determinar, se le añadían 2 ml del reactivo revelador, que incluía en 1 l de volumen final: ClH (37%, p/p), 7,73 ml; ácido tricloroacético (20%, p/p), 60,24 ml; y $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 33,33 g. La concentración del producto coloreado que se formaba después de añadir el reactivo revelador se determinaba espectrofotométricamente utilizando el siguiente coeficiente de extinción a 500 nm: $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 0,9$.

2.4.5. Determinación del volumen de células empaquetadas de *Anacystis nidulans*

El volumen de células empaquetadas que, por mililitro, poseía una suspensión de células de *Anacystis nidulans* se determinaba centrifugando alícuotas (de hasta 5 ml) de esa suspensión en tubos hematocritos graduados. Posteriormente, una vez que se había establecido la existencia de una correspondencia estrecha entre los valores de concentración celular y

turbidez, el volumen de células empaquetadas por ml de suspensión se estimaba por medida de la turbidez (estimada como absorbancia a 750 nm) de la suspensión celular. Para suspensiones de *A. nidulans*, la relación existente entre la absorbancia a 750 nm y la concentración de células era lineal hasta un valor de absorbancia de aproximadamente 0,2, que equivalía a 0,2 μ l de células por ml. 1 μ l de células empaquetadas de dicho microorganismo contenía 7-8 μ g de clorofila a y 150-175 μ g de proteína.

2.4.6. Determinación de clorofila a

El contenido celular en clorofila a se determinaba espectrofotométricamente en los correspondientes extractos metanólicos (52). El procedimiento seguido consistía en recoger, mediante centrifugación a baja velocidad, las células de una alícuota (2-3 ml) de suspensión celular, que a continuación se resuspendían en 2-5 ml de metanol. Tras agitar vigorosamente, la preparación se volvía a centrifugar a baja velocidad, procediéndose a continuación a determinar la concentración de clorofila en el sobrenadante resultante, utilizándose para ello el siguiente coeficiente de extinción a 665 nm: $E_1^{1 \text{ mg/ml}} = 74,46$.

2.4.7. Determinación de proteína

El contenido celular en proteína se estimaba en células tratadas con ácido tricloroacético. El procedimiento utilizado consistía en suplementar una alícuota, generalmente de 1 ml, de suspensión celular, con ácido tricloroacético hasta una concentración final del 11% (p/v). Tras incubar durante 10 min a 0°C, la preparación se centrifugaba (1.500-2.000 g durante 10 min) y, una vez descartado el sobrenadante, el precipitado resultante se resuspendía en ácido tricloroacético al 11% (p/v), después de lo cual se volvía a repetir el paso de centrifugación. El nuevo sedimento obtenido se resuspendía, finalmente, con 1 ml de agua, utilizándose una alícuota de esta preparación para la determinación de proteína, que se llevaba a cabo por el método de Lowry modificado según se describe en la referencia 5, empleando seroalbúmina bovina como patrón.

2.4.8. Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones espectrofotométricas se han realizado empleando un espectrofotómetro PYE Unicam SP 1750 UV dotado de salida digital. Los espectros de absorción se realizaron con un registrador acoplado al espectrofotómetro.

2.4.9. Medidas del pH

El pH de las disoluciones se determinaba con un pH-metro Beckman modelo Expandomatic SS2 provisto de escala expandida.

2.4.10. Medidas de intensidades de iluminación

Se han llevado a cabo utilizando un medidor de Yellow Springs Instruments, modelo Radiometer 65 A, equipado con un sensor Radiometer 6551, que suministraba una salida constante en el intervalo de 280 a 2.600 nm.

2.4.11. Medidas de flujos gaseosos

Para preparar las mezclas de aire-CO₂ y de argon-CO₂ en las proporciones adecuadas, así como para determinar el caudal de gas que se suministraba a los cultivos, se han utilizado un contador de gases Kromschroeder (España) modelo NB-2 en la medida de aire, de argon y de gas total, y un medidor VEB Prüfgerate-Werk Medingen (RFA) tipo TG-300 para el CO₂.

2.5. REACTIVOS

El ADP, la L-glutamato deshidrogenasa (tipo II, de hígado de vaca), la catalasa (de hígado de vaca), el HEPES, el MOPS, el MSX y la Tricina era productos de Sigma Chemical Co., St. Louis (USA). El NADPH era un producto de Böheringer, Mannheim (RFA) y el DCMU y el metil viológeno de Serva, Heidelberg (RFA). Todos los demás productos utilizados procedían de Merck, Darmstadt (RFA) o de Sigma, St. Louis (USA).

El agua destilada se obtenía mediante un destilador de vidrio DRA. Los gases utilizados, anhídrido carbónico y argon, eran de alta pureza y fueron suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno (SEO).

3. RESULTADOS

3.1. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN VARIAS CIANOBACTERIAS

3.1.1. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en *Anacystis nidulans*

Anacystis nidulans es una cianobacteria unicelular no fijadora de nitrógeno atmosférico que puede utilizar formas combinadas de nitrógeno inorgánico, tales como amonio o nitrato, como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Tabla 1). Cuando se estudia la actividad nitrato reductasa presente en células de este microorganismo, se encuentra que aquellas procedentes de cultivos que han crecido con nitrato poseen niveles altos de nitrato reductasa (alrededor de 200 mU/mg de proteína), mientras que en células cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno sólo pueden detectarse niveles basales de esta actividad enzimática (del orden de 5-10 mU/mg de proteína).

La Figura 1.A muestra el desarrollo de actividad nitrato reductasa que tiene lugar cuando células de *A. nidulans*, que se han cultivado con amonio, se transfieren a medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno y se incuban en este último en las condiciones habituales para dicho microorganismo. Se observa que, como consecuencia de ese cambio en el nutriente nitrogenado, se produce un aumento espectacular de la actividad específica nitrato reductasa, que alcanza su nivel máximo unas cinco horas después de haberse efectuado la transferencia y que, a partir de este momento, se mantiene prácticamente constante, a un nivel que corresponde al típico de células cultivadas con nitrato. En la Figura 1.A se muestra también que la velocidad de crecimiento del cultivo, estimado como incremento de proteína (aunque no se muestra se obtuvieron resultados similares estimándolo como incremento del volumen de células empaquetadas) aumenta significativamente unas 4-5 horas después de haberse efectuado la transferencia al medio con nitrato. Este periodo de tiempo es el mismo que se necesita para que las células adquieran el nivel máximo de nitrato reductasa, lo que podría indicar que niveles de actividad por debajo de ese máximo representan una limitación para el crecimiento del cultivo cuando se utiliza nitrato como la fuente de nitrógeno.

La Figura 1.B es una representación diferencial, utilizando los mis-

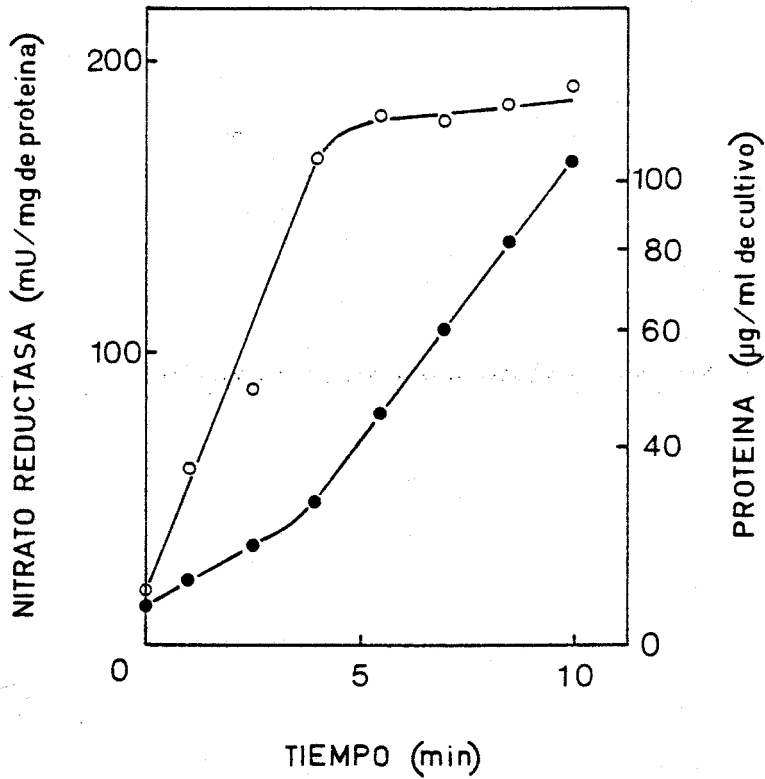


Fig. 1.A. Desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Anacystis nidulans* en respuesta a la transferencia desde medio con amonio a medio con nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas en medio con amonio se incubaron en condiciones de cultivo en medio con nitrato. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de la suspensión en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (O), permeabilizando con tolueno, y la cantidad de proteína (●).

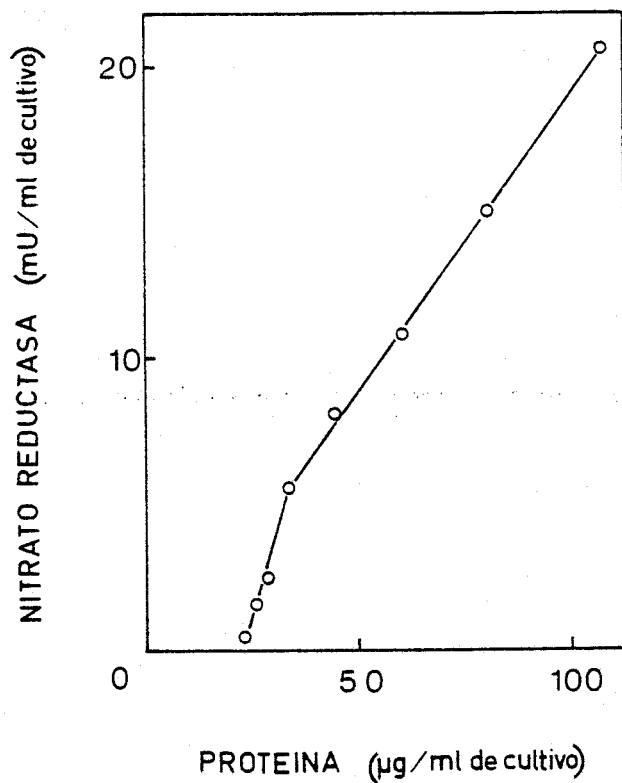


Fig. 1.B. Representación diferencial de la evolución de la actividad nitrato reductasa con respecto a la de la cantidad de proteína de células de *Anacystis nidulans* transferidas desde medio con amonio a medio con nitrato. Los datos representados son los mismos que aparecen en la Figura 1.A.

mos datos que en la Figura 2.A, de la actividad total nitrato reductasa frente a la cantidad total de proteína. Es interesante resaltar que la pendiente de la recta es mayor en la fase inmediatamente siguiente a la transferencia de las células al medio con nitrato, disminuyendo claramente una vez alcanzados niveles de actividad nitrato reductasa próximos al normal para células mantenidas en medio con nitrato (unas 4-5 horas después de la transferencia). Este cambio de pendiente refleja que durante el primer periodo de tiempo se produce un aumento mayor de la actividad nitrato reductasa que de la proteína total del cultivo.

En principio existirían dos posibilidades, no excluyentes, para explicar el aumento observado en el nivel de actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* como consecuencia de su transferencia desde un medio conteniendo amonio a otro con nitrato como nutriente nitrogenado, a saber, (a) que fuese consecuencia de la presencia de nitrato, ó (b) que simplemente se produjese en respuesta a la eliminación del amonio. Para distinguir entre estas alternativas, se han llevado a cabo los experimentos que se describen en la Tabla 2 y la Figura 2.

En la Tabla 2 se muestran las actividades nitrato reductasa de células de *A. nidulans* que, procedentes de un cultivo con amonio, se incubaron durante 6 h en medios con nitrato, amonio, nitrato y amonio o sin fuente de nitrógeno combinado. Los resultados que se obtuvieron indican que la presencia de amonio en el medio de cultivo determinaba bajos niveles de nitrato reductasa, incluso cuando el nitrato se encontraba simultáneamente presente. Por otra parte, también se alcanzaban altas actividades de este enzima en células de *Anacystis* incubadas en ausencia de cualquier fuente de nitrógeno (Tabla 2). Conclusiones similares pueden derivarse a partir de los datos que se recogen en la Figura 2, correspondientes a estudios cinéticos de los cambios iniciales (observados durante la primera hora de incubación) que se producían en los niveles de actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* sometidas a condiciones experimentales análogas a las empleadas en el experimento recogido en la Tabla 2. De los datos obtenidos a corto plazo (Figura 2) se hace aún mas evidente la ausencia de un efecto positivo del nitrato a nivel de regulación de la síntesis de la nitrato reductasa, ya que tanto la cinética de

Tabla 2. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrato reductasa de células de *Anacystis nidulans*

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ K (20 mM)	206
Ninguna	115
SO ₄ (NH ₄) ₂ (10 mM)	10
NO ₃ K (20 mM) y SO ₄ (NH ₄) ₂ (10 mM)	10

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica. Las suspensiones resultantes (con una concentración de 0,5 µl de células/ml) se incubaron durante 6 h en condiciones de cultivo, transcurridas las cuales se procedió a la determinación de la actividad nitrato reductasa (en células permeabilizadas con tolueno) y de la cantidad de proteína en alícuotas de cada una de ellas.

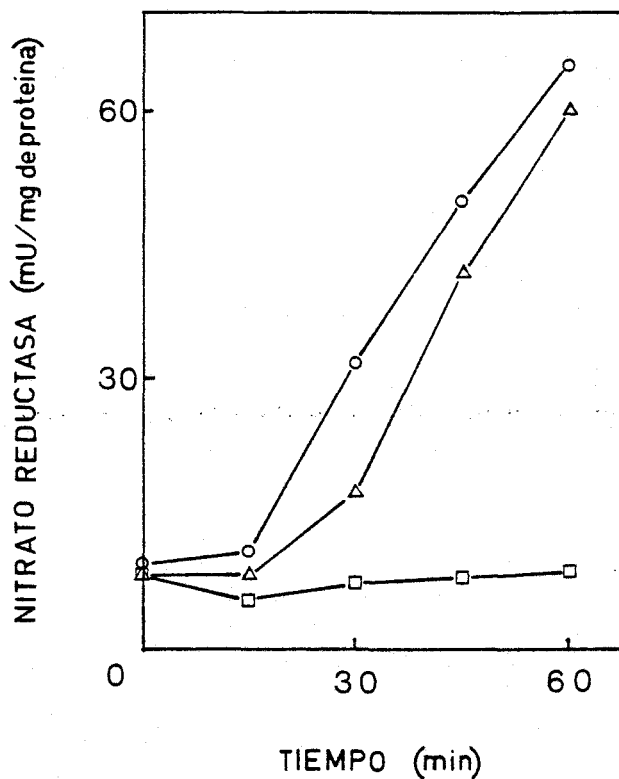


Fig. 2. Evolución de la actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* en respuesta a la transferencia desde medio con amonio a medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo 20 mM de NO_3K (○), ninguna fuente de nitrógeno (Δ) o 10 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ó de NO_3NH_4 (\square) a una concentración inicial de 1,6 μl de células por ml de medio. A los tiempos que se indica se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizado con tolueno) y la cantidad de proteína en las correspondientes alícuotas.

desarrollo de actividad nitrato reductasa como los niveles de actividad alcanzados en 1 h son análogos para los casos de medio con nitrato y medio carente de fuente de nitrógeno.

El conjunto de estos resultados indica, por una parte, que la presencia de nitrato en el medio no es un requisito obligatorio para que puedan desarrollarse altos niveles de actividad nitrato reductasa en *Anacystis*. Y por otra, que la presencia de amonio elimina cualquier efecto positivo que pudiese ejercer el nitrato sobre el establecimiento del nivel celular del enzima. En consecuencia, parece posible concluir también que, más que la falta de nitrato, la presencia de amonio es el factor que determina el establecimiento de la baja actividad nitrato reductasa característica de células de *A. nidulans* cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno.

Según estas consideraciones, la incubación en presencia de amonio de células de *A. nidulans* procedentes de un cultivo con nitrato debería verse acompañada de una disminución en el nivel celular de nitrato reductasa. El experimento que se recoge en la Figura 3 documenta esta situación mostrando que, en respuesta a ese cambio de nutriente nitrogenado, la actividad específica nitrato reductasa disminuía de 300 a 60 mU/mg de proteína tras unas 12 h de incubación en el medio con amonio (Figura 3.A). De los datos que se presentan en la Figura 3 puede deducirse que, aunque la actividad total del cultivo experimentaba una disminución lenta, la mayor parte de la pérdida de actividad específica podía explicarse con el aumento en proteína total que tenía lugar en el cultivo durante ese periodo de tiempo.

3.1.2. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en *Synechocystis* sp. 6714

Al igual que *A. nidulans*, *Synechocystis* es una cianobacteria incapaz de fijar el nitrógeno atmosférico, que puede utilizar nitrato ó amonio como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Tabla 1).

También en este microorganismo se ha estudiado la influencia que la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo posee so-

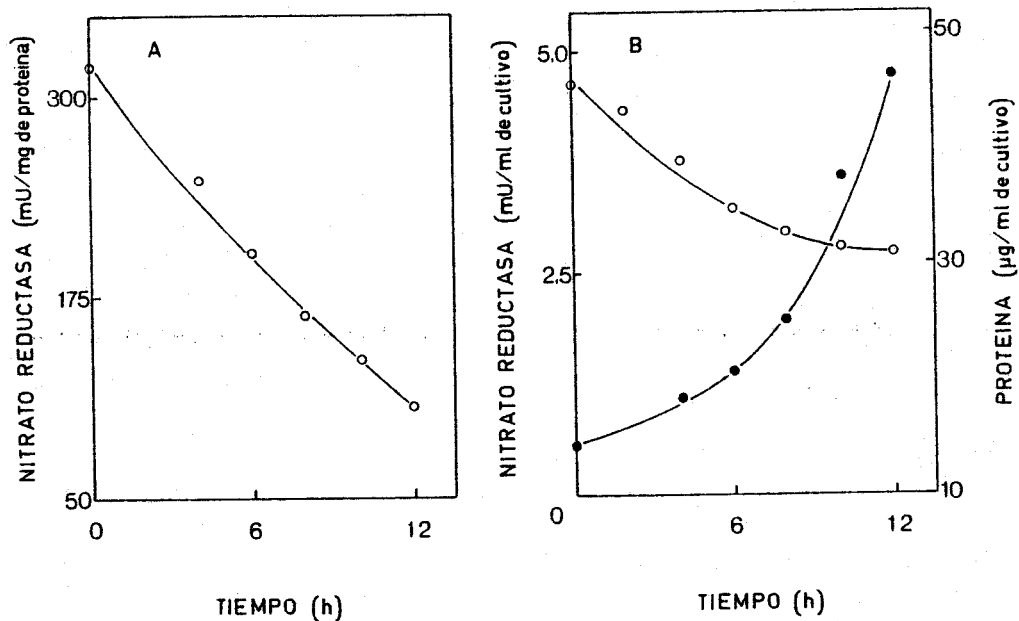


Fig. 3. Disminución de la actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* en respuesta a la transferencia desde medio con nitrato a medio con amonio. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio con amonio en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de esta suspensión en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) (O), y la cantidad de proteína (●).

bre los niveles celulares de actividad nitrato reductasa. En la Tabla 3 se presentan las actividades encontradas en células de *Synechocystis* cultivadas en medios con nitrato o con amonio. Puede observarse que, aunque las diferencias son menos acusadas que en el caso de *Anacystis*, también se detectaban niveles de nitrato reductasa claramente más altos en las células de *Synechocystis* cultivadas con nitrato que en aquellas cultivadas con amonio. Por otra parte, células de este microorganismo que poseían inicialmente poca actividad nitrato reductasa, por proceder de un cultivo con amonio, aumentaban sensiblemente su nivel de este enzima cuando se transferían e incubaban en medio conteniendo nitrato o carente de cualquier forma de nitrógeno combinado (Tabla 4); lo cual cuestiona también para *Synechocystis* la necesidad de la presencia de nitrato como requisito obligado para el establecimiento de altos niveles de nitrato reductasa. En la misma Tabla se muestra también que la incubación, en medios conteniendo simultáneamente nitrato y amonio, no conlleva cambios significativos en el nivel de la actividad enzimática considerada, con respecto al de células incubadas con amonio en ausencia de nitrato.

3.1.3. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en *Anabaena variabilis*

Anabaena variabilis es una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos, que es capaz de asimilar y utilizar para su crecimiento el nitrógeno atmosférico. Además también puede utilizar como fuente de nitrógeno compuestos inorgánicos tales como el amonio o el nitrato (Tabla 1). Cuando *A. variabilis* se cultivaba con nitrato como nutriente nitrogenado, exhibía una actividad celular nitrato reductasa notablemente superior a la que podía detectarse en cultivos con amonio o en ausencia de compuestos de nitrógeno combinado (Tabla 5).

En la Figura 4 se muestra la cinética del desarrollo de actividad nitrato reductasa que tiene lugar cuando células de este microorganismo, cultivadas con amonio, se incuban en medio con nitrato. La Figura 5 presenta la evolución que experimentaba la nitrato reductasa de células de *A. variabilis* que se habían cultivado a expensas de dinitrógeno y se transferían a medios conteniendo nitrato, amonio, nitrato y amonio, ó

Tabla 3. Niveles de actividad nitrato reductasa de células de *Synechocystis* sp. 6714 cultivadas con nitrato ó amonio como fuente de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ Na (21 mM)	110
SO ₄ (NH ₄) ₂ (2 mM)	21

Los valores de actividad nitrato reductasa que se muestran corresponden a los encontrados en cultivos discontinuos de *Synechocystis* que, mediante transferencias sucesivas, se habían mantenido durante múltiples generaciones con la fuente de nitrógeno que se indica. En el momento de la determinación (que se realizó tras permeabilización con tolueno) el cultivo de nitrato poseía 105 µg de proteína/ml y el de amonio 111 µg de proteína/ml.

Tabla 4. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrato reductasa de células de *Synechocystis* sp. 6714

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ Na (17,6 mM)	100
Ninguna	65
SO ₄ (NH ₄) ₂ (2,5 mM)	26
NO ₃ Na (17,6 mM) y SO ₄ (NH ₄) ₂ (2,5 mM)	33

Células de *Synechocystis* cultivadas con amonio se utilizaron para preparar cuatro suspensiones con una concentración correspondiente a 155 µg de proteína celular por ml de medio conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica, las cuales se incubaron durante 4,25 h en condiciones de cultivo. Transcurrido este tiempo se determinó la cantidad de proteína y la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) en las células procedentes de alícuotas de cada una de esas suspensiones después de ser recogidas por filtración, lavadas y concentradas convenientemente.

Tabla 5. Niveles de actividad nitrato reductasa de células de *Anabaena variabilis* cultivadas con nitrato, aire o amonio como fuente de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ K (20 mM)	82,43
Aire (78% N ₂)	0,03
SO ₄ (NH ₄) ₂ (2,5 mM)	0,56

Los valores de actividad nitrato reductasa que se muestran corresponden a los encontrados en células de *Anabaena variabilis* que se habían mantenido durante varias generaciones con la fuente de nitrógeno que se indica. En el momento de la determinación (que se realizó permeabilizando con MTA) el cultivo de nitrato poseía 417 µg de proteína/ml, el de aire 222 µg de proteína/ml y el de amonio 339 µg de proteína/ml.

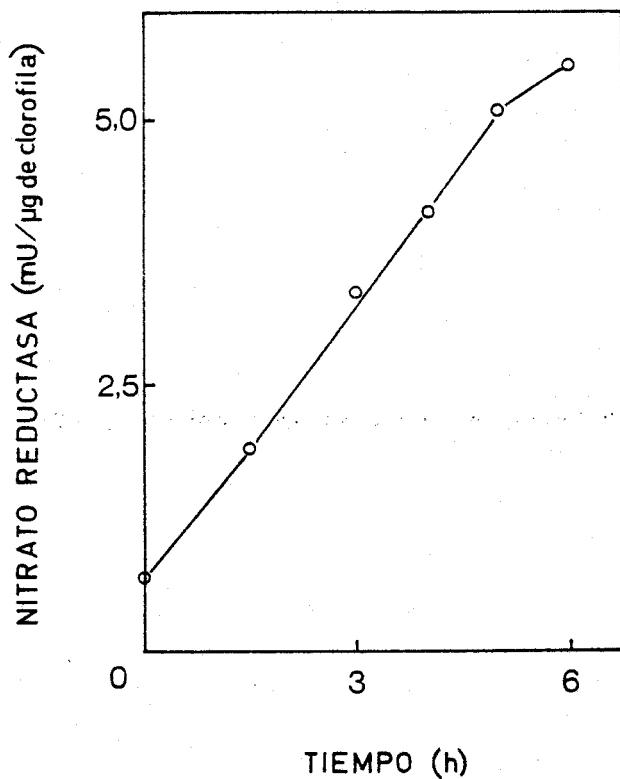


Fig. 4. Desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Anabaena variabilis* en respuesta a la transferencia desde medio con amonio a medio con nitrato. Células de *A. variabilis* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración correspondiente a 3 µg de clorofila por ml de medio, a medio con nitrato, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de la suspensión obtenida, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con MTA) y la cantidad de clorofila.

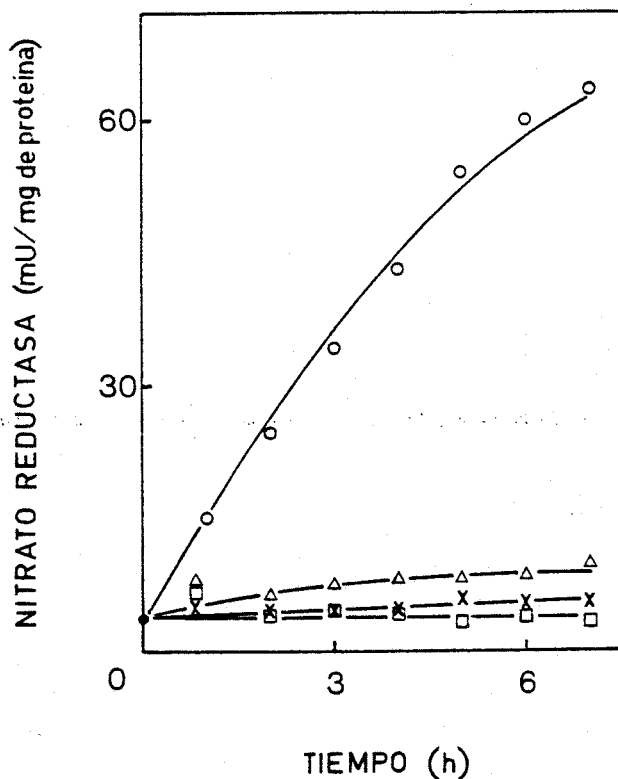


Fig. 5. Evolución de la actividad nitrato reductasa de células de *A. variabilis* en respuesta a la transferencia desde medio carente de nitrógeno combinado a medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Células de *A. variabilis* cultivadas con aire como única fuente de nitrógeno, se transfirieron a medio conteniendo 20 mM de NO₃K (○), ningún compuesto de nitrógeno combinado (Δ), 2 mM de SO₄(NH₄)₂ (□) ó 20 mM de NO₃K y 2 mM de SO₄(NH₄)₂ (X). A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada una de estas suspensiones, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con MTA) y la cantidad de proteína.

ninguna fuente de nitrógeno combinado. Como puede observarse, solo se desarrollaban niveles enzimáticos altos en el medio que poseía nitrato como único nutriente nitrogenado; mientras que el nivel basal de nitrato reductasa que presentaban originalmente las células se mantenía sin cambios apreciables en el medio sin nitrógeno combinado y en presencia de amonio, aunque el nitrato se encontrase también presente simultáneamente.

Estos resultados indican que el establecimiento de altos niveles celulares de nitrato reductasa en *Anabaena variabilis* requiere la presencia de nitrato en el medio de cultivo, sin que se produzcan en respuesta a la mera eliminación del amonio de tales medios. Parece evidente además, que el amonio es capaz de impedir la manifestación del efecto positivo del nitrato.

3.1.4. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en *Nostoc* sp. 6719

Nostoc sp. 6719 es otra cianobacteria filamentosa, formadora de heterocistos, fijadora de nitrógeno atmosférico, que puede utilizar nitrato ó amonio como fuente de nitrógeno (Tabla 1). La Tabla 6 muestra los niveles de actividad nitrato reductasa encontrados en células de este microorganismo que, durante repetidas generaciones, se habían cultivado con cada uno de estos compuestos de nitrógeno combinado. En la Tabla 7 se presentan los valores de nitrato reductasa alcanzados en células procedentes de un cultivo con amonio que se incubaron, durante 6 horas, en medios conteniendo nitrato, amonio, nitrato y amonio, o ninguna fuente de nitrógeno combinado. Por último, en la Figura 6 se recoge la cinética del desarrollo de actividad nitrato reductasa observado para células de *Nostoc* cultivadas con amonio, tras su transferencia a medio con nitrato. Los resultados que se obtuvieron en estos tres tipos de experimentos ponen de manifiesto, conjuntamente, que en esta cianobacteria sólo se alcanzan niveles altos del enzima considerado en células incubadas en medios que contienen nitrato y de los que se encuentra excluido el amonio.

Tabla 6. Niveles de actividad nitrato reductasa de células de *Nostoc* sp. 6719 cultivadas con nitrato ó amonio como fuente de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO_3K (20 mM)	80
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	6

Los valores que se muestran corresponden a las actividades nitrato reductasa (medidas tras permeabilización con tolueno) de cultivos discontinuos de *Nostoc* que, en transferencias sucesivas a lo largo de semanas, se habían mantenido con la fuente de nitrógeno que se indica. En el momento de llevar a cabo la determinación el cultivo de nitrato poseía 407 μg de proteína/ml y el de amonio 168 μg de proteína/ml.

Tabla 7. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrato reductasa de células de *Nostoc* sp. 6719

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO_3K (20 mM)	80
Aire (78% N_2)	13
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	12
NO_3K (20 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	19

Células de *Nostoc* cultivadas con amonio se utilizaron para preparar suspensiones conteniendo 60 μg de proteína celular por ml de medio de cultivo con la fuente de nitrógeno que se indica. Tras 6 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de cada una de esas suspensiones en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) y la cantidad de proteína.

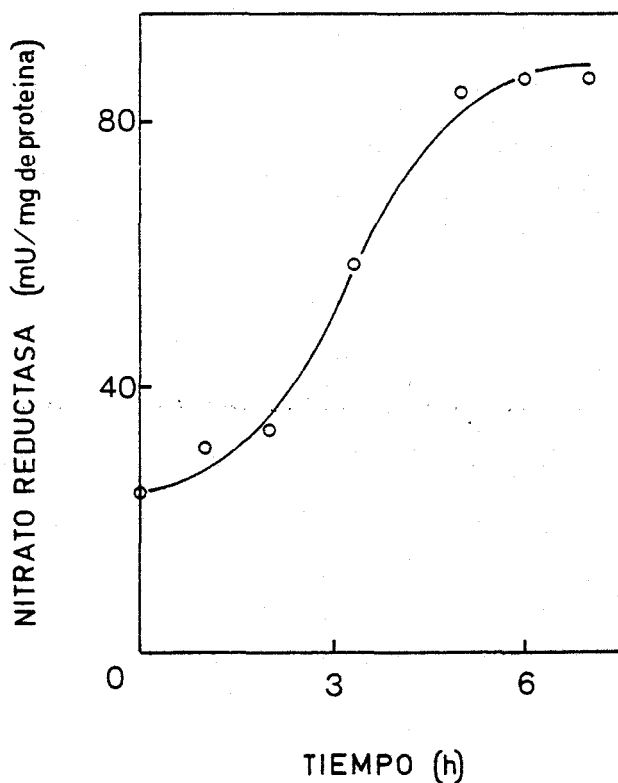


Fig. 6. Desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Nostoc* sp. 6719 en respuesta a la transferencia desde medio con amonio a medio con nitrato. Células de *Nostoc* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración inicial correspondiente a 19 μ g de proteína por ml, a medio con nitrato. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de esta suspensión en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y la cantidad de proteína.

3.1.5. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de nitrato reductasa en *Anabaena* sp. 7119

Anabaena sp. 7119 es una cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos, que puede fijar nitrógeno atmosférico y utilizar nitrato ó amonio como nutriente nitrogenado (Tabla 1). Los experimentos que se ilustran en la Tabla 8 y en la Figura 7 dan información acerca de cómo se afectan, en este microorganismo, los niveles celulares de actividad nitrato reductasa, en respuesta a la naturaleza del nutriente nitrogenado utilizado para el crecimiento. Sus resultados ponen de manifiesto que el enzima de *Anabaena* sp. 7119 responde a este factor de manera similar a lo que se ha descrito para *A. variabilis* y *Nostoc*.

De los resultados presentados en este apartado 3.1 para la nitrato reductasa de las cinco cianobacterias consideradas, pueden derivarse unas reglas generales. En las cianobacterias incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico (*Anacystis nidulans* y *Synechocystis*) el nivel celular de nitrato reductasa se afecta negativamente por la presencia de amonio en el medio de cultivo, sin que sea indispensable la presencia de nitrato para que puedan desarrollarse altas actividades del enzima. Por el contrario, en las especies fijadoras de nitrógeno (*Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp. 6719 y *Anabaena* sp. 7119) la presencia de nitrato parece ser un requerimiento obligado para que puedan alcanzarse altos niveles de nitrato reductasa.

Tabla 8. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrato reductasa de células de *Anabaena* sp. 7119

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO_3K (20 mM)	73
Aire (78% N_2)	13
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	4

Células de *Anabaena* sp. 7119 cultivadas con amonio se utilizaron para preparar tres suspensiones conteniendo 142 μg de proteína celular por ml de medio conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica. Después de 4,25 h de incubación en condiciones de cultivo se determinó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) y la cantidad de proteína en alícuotas de cada una de esas suspensiones celulares.

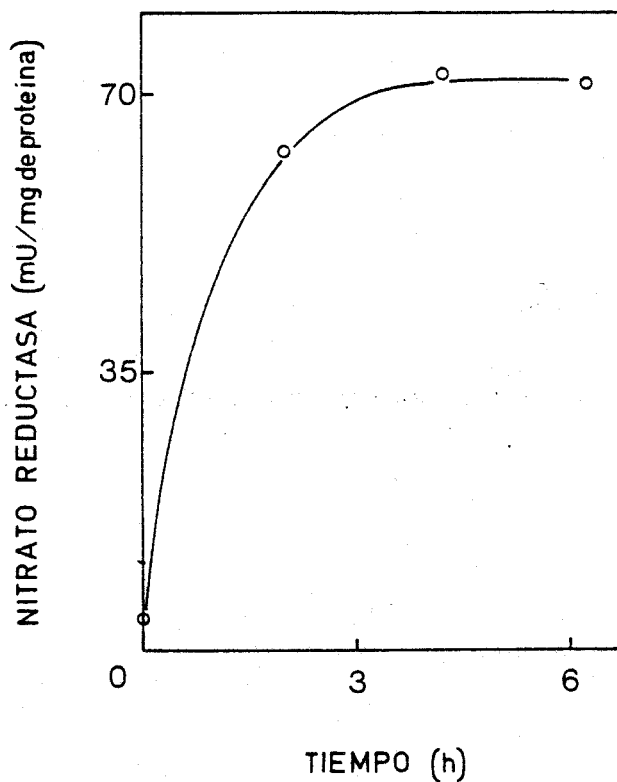


Fig. 7. Desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Anabaena* sp. 7119 en respuesta a la transferencia desde medio con amonio a medio con nitrato. Células de *Anabaena* sp. 7119 cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración correspondiente a 142 μ g de proteína por ml, a medio con nitrato. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de esta suspensión celular en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y la cantidad de proteína.

3.2. REGULACION DE LA SINTESIS DE NITRATO REDUCTASA EN VARIAS CIANOBACTERIAS

Los estudios que se presentan en este apartado están encaminados a suministrar información acerca del papel regulador de los iones amonio y nitrato sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa en las cianobacterias que estamos considerando.

3.2.1. Efecto de inhibidores de la síntesis de ARNm y de proteínas sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa

En el apartado anterior se ha descrito que cuando células de *Anacystis nidulans* que se habían cultivado con amonio como fuente de nitrógeno se transferían a medios conteniendo nitrato como único nutriente nitrogenado o carentes de nitrógeno combinado, se registraba un desarrollo de actividad nitrato reductasa, que resultaba en el establecimiento de altos niveles de este enzima. El experimento cuyos resultados se recogen en la Figura 8 ponen de manifiesto que la rifampicina (inhibidor de la síntesis de ARNm, cuya eficacia a este respecto se ha verificado para la estirpe utilizada en este trabajo, 47, y otras especies, 81, de *Anacystis*) impide el desarrollo de actividad nitrato reductasa que se registra normalmente al transferir a medios con nitrato células cultivadas con amonio, las cuales presentan bajos niveles de esta actividad enzimática.

El cloranfenicol y la kanamicina son dos inhibidores de la síntesis de proteínas en organismos procarióticos, no relacionados químicamente y que, mediante diferentes mecanismos, interfieren con la traducción de los ARNm en los ribosomas 70 S, habiéndose constatado para el caso del cloranfenicol, que inhibe eficazmente la síntesis de proteínas en una gran variedad de cianobacterias (46). Tanto el cloranfenicol (Fig. 9) como la kanamicina (Fig. 10) prevenían efectivamente el desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans*, característico de la transferencia desde medios conteniendo amonio a medios conteniendo nitrato como únicos nutrientes nitrogenados. Como se ilustra en la Figura 11, tampoco se producía desarrollo de actividad nitrato reductasa cuando células de *Anacystis* procedentes de cultivos con amonio se incubaban en medios carentes de fuente de nitrógeno en presencia de rifampicina o cloranfenicol.

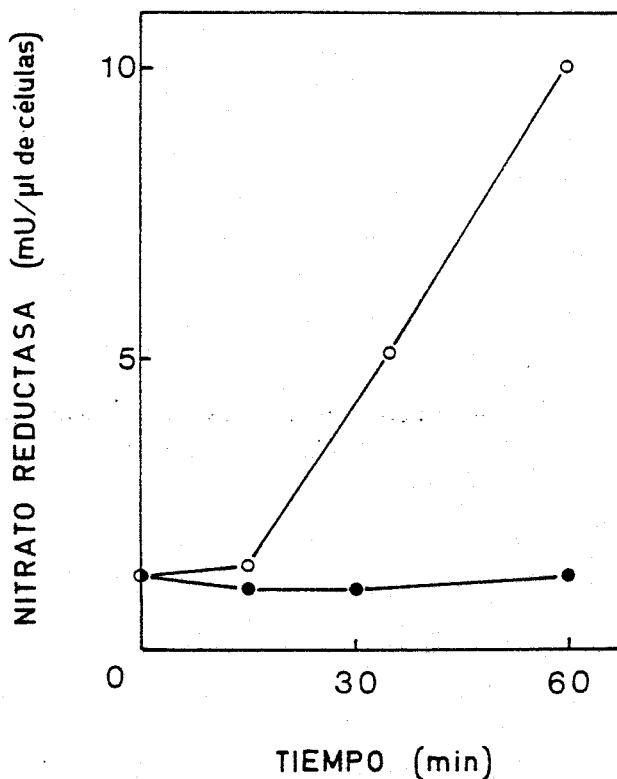


Fig. 8. Prevención por rifampicina del desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Anacystis nidulans* transferidas de amonio a nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se incubaron, en condiciones de cultivo, en medio con nitrato conteniendo (●) o no (○) 50 μ g/ml de rifampicina. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de cada una de las suspensiones, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y el volumen de células empaquetadas. La concentración celular en el momento de comenzar la incubación fué de 1,5 μ l de células por ml de medio.

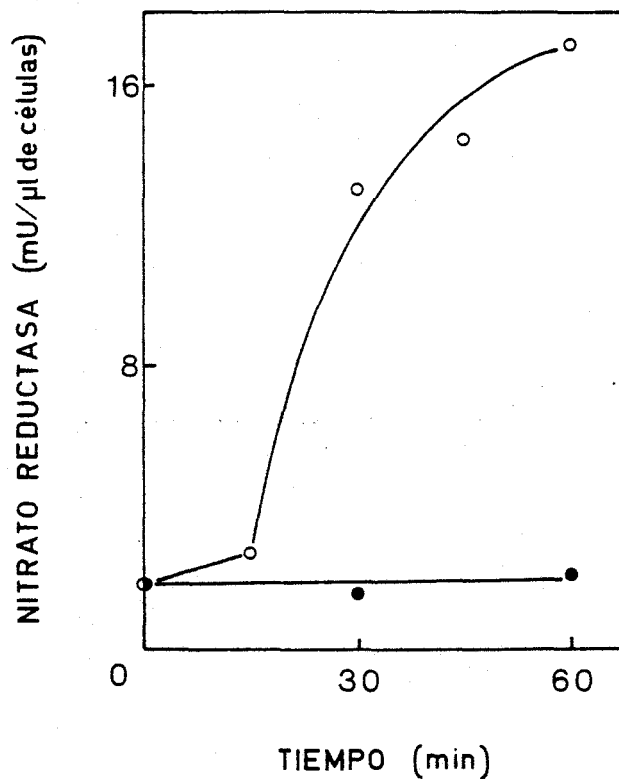


Fig. 9. Prevención por cloranfenicol del desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 1 μ l de células por ml de medio, a medio con nitrato conteniendo (●) o no (○) 50 μ g/ml de cloranfenicol, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se midió la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y el volumen de células empaquetadas, en cada una de las suspensiones obtenidas.

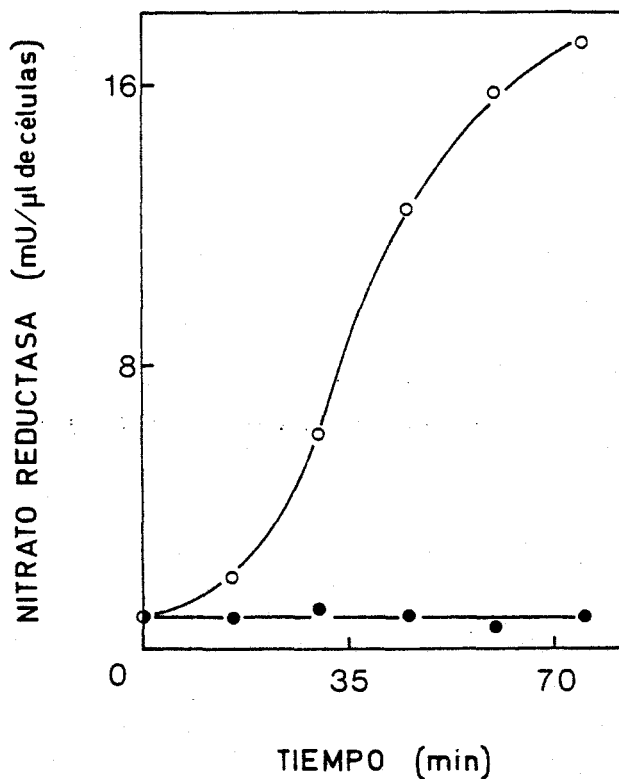


Fig. 10. Prevención por kanamicina del desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 1,3 μ l de células por ml de medio, a medio con nitrato conteniendo (●) o no (O) 50 μ g/ml de kanamicina. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y el volumen de células empaquetadas.

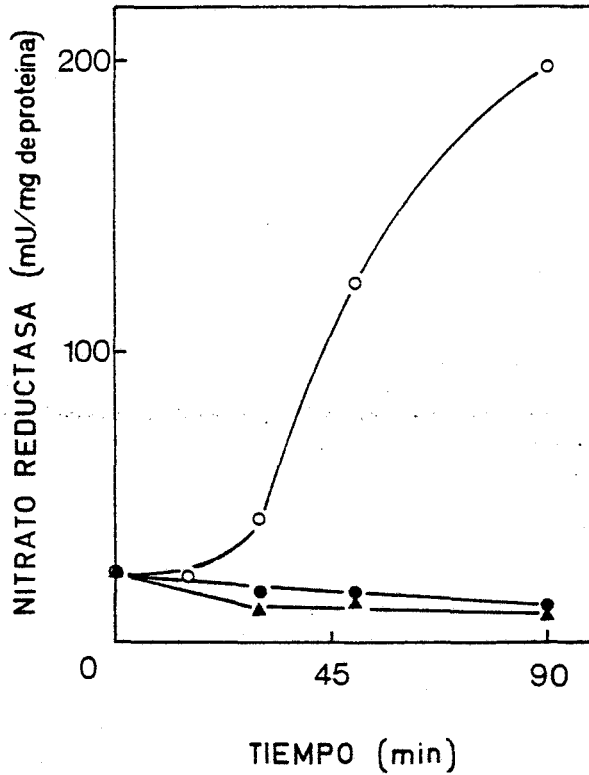


Fig. 11. Prevención por rifampicina o cloranfenicol del desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a medio carente de fuente de nitrógeno. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 1 μ l de células por ml de medio, a medio carente de compuestos de nitrógeno combinado en ausencia (O) o presencia de 50 μ g/ml de rifampicina (●) o de 50 μ g/ml de cloranfenicol (▲). Las 4 suspensiones resultantes se incubaron en condiciones de cultivo, tomándose a los tiempos indicados alícuotas de cada una de ellas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y la cantidad de proteína.

Por otra parte se ha comprobado (no se ilustra) que la adición de rifampicina a un cultivo con nitrato de células de *A. nidulans* previamente cultivadas con amonio, 30 min después de haber efectuado el cambio de nutriente nitrogenado, permitía, durante algún tiempo, posterior aumento de actividad nitrato reductasa. Este hecho elimina la posibilidad de que el efecto de la rifampicina inhibiendo el desarrollo de nitrato reductasa se deba a una acción directa sobre las moléculas de enzima ya sintetizadas, provocando su pérdida de actividad, o a cualquier otra acción que, distinta a la propia de inhibición de síntesis de ARNm, pudiese desarrollarse sobre el metabolismo de *Anacystis*. En relación con estos resultados, es interesante señalar que cabe esperar que la adición de un inhibidor de la síntesis de ARNm (tal como la rifampicina) no provoque una parada inmediata de la aparición de nuevas moléculas de proteína, si se realiza después que las células han permanecido durante algún tiempo en condiciones que favorecen dicha aparición, durante el cual podrían haberse sintetizado moléculas de ARNm que pueden traducirse en presencia de rifampicina.

Para el caso del cloranfenicol, en el apartado 3.3 (véase apartado 3.3.1.1) se presentarán resultados que ponen de manifiesto que tampoco este agente ejerce ningún efecto negativo directo sobre la actividad nitrato reductasa de *A. nidulans*.

Los resultados que se han presentado en este apartado ponen de manifiesto que el desarrollo de actividad nitrato reductasa que se observa en células de *A. nidulans* cultivadas con amonio, tras la eliminación de este compuesto del medio de cultivo, requiere la operatividad de los sistemas de transcripción de ADN y de traducción de ARNm. Esto argumenta en favor de la idea de que el incremento de actividad nitrato reductasa observado en estas condiciones sea consecuencia de la aparición de nuevas moléculas de esta proteína, más que de la activación de moléculas preexistentes que, en estado inactivo, pudieran encontrarse en células cultivadas con amonio. Por tanto, podemos deducir también que la naturaleza de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo posee un papel regulador sobre la síntesis de la nitrato reductasa en *Anacystis nidulans*.

Los experimentos que se ilustran en las Tablas 9 y 10 ponen de manifiesto que también en *Synechocystis* y *Anabaena variabilis* respectivamente, el cloranfenicol inhibe, de manera efectiva, el aumento de actividad nitrato reductasa que tiene lugar cuando células cultivadas con amonio se transfieren a medios que contienen nitrato. Estos resultados indican que, al igual que en *Anacystis*, también para *Synechocystis* y *A. variabilis*, el efecto regulador que la naturaleza de la fuente de nitrógeno ejerce sobre la nitrato reductasa celular, opera a nivel de síntesis de nuevas moléculas de esta proteína.

3.2.2. Liberación por MSX del efecto negativo del amonio sobre la síntesis de nitrato reductasa

Como se ha documentado en el apartado 3.1, todas las cianobacterias consideradas en este trabajo presentan sólo niveles basales de actividad nitrato reductasa cuando se cultivan en medios que contienen amonio. En este apartado se presenta una serie de experimentos mediante los cuales se pretende obtener información acerca de los posibles mecanismos por los que el amonio ejerce su efecto negativo sobre el nivel celular de nitrato reductasa.

Para verificar si el efecto negativo del amonio sobre la nitrato reductasa se debía al amonio "per se" o era resultado de la metabolización de este compuesto, se procedió al estudio de dicho efecto en células de cianobacterias en las que la asimilación del amonio se encontrase afectada. Como se ha descrito en la Introducción, el funcionamiento coordinado de los enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa parece constituir la vía mayoritaria mediante la cual el amonio se incorpora a esqueletos carbonados originando compuestos orgánicos nitrogenados en cianobacterias. La L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX) es un análogo del ácido glutámico que actúa eficazmente en una gran variedad de organismos (entre ellos cianobacterias) como un inhibidor irreversible del enzima glutamina sintetasa (75,24) y, en consecuencia, de la asimilación de amonio por las células. Como puede observarse en la Figura 12, la adición de MSX a células de *A. nidulans* creciendo en medio con amonio resultaba, después de un periodo de aproximadamente 1 h, en un fuerte desarrollo de actividad nitrato re-

Tabla 9. Efecto de cloranfenicol sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Synechocystis* sp. 6714 transferidas de amonio a nitrato

Adición	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
Ninguna	101
Cloranfenicol (50 µg/ml)	49

Células de *Synechocystis* cultivadas con amonio se transfirieron a medio con nitrato en presencia o ausencia de cloranfenicol a la concentración que se indica, incubándose a continuación en condiciones de cultivo. En el momento de comenzar la incubación y 3 h después, se midieron la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) y la cantidad de proteína en alícuotas de ambas suspensiones celulares. La actividad nitrato reductasa a tiempo cero era de 48 mU/mg de proteína. La proteína celular cambió, durante las 3 h de incubación, de 44 a 53 µg/ml en el cultivo control y se mantuvo sin variaciones apreciables (de 37 a 36 µg/ml) en la suspensión tratada con cloranfenicol.

Tabla 10. Efecto del cloranfenicol sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *Anabaena variabilis* transferidas de amonio a nitrato

Adición	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
Ninguna	32
Cloranfenicol (50 µg/ml)	14

Células de *A. variabilis* cultivadas con amonio se transfirieron a medio con nitrato suplementado o no con la concentración de cloranfenicol que se indica y se incubaron en condiciones de cultivo. En el momento de comenzar la incubación y transcurridos 90 min, se midieron la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con MTA) y la cantidad de proteína, en alícuotas de ambas suspensiones celulares. La actividad nitrato reductasa a tiempo cero era de 16 mU/mg de proteína. La proteína celular cambió de 60 a 80 µg/ml en la suspensión control y de 77 a 69 µg/ml en la tratada con cloranfenicol.

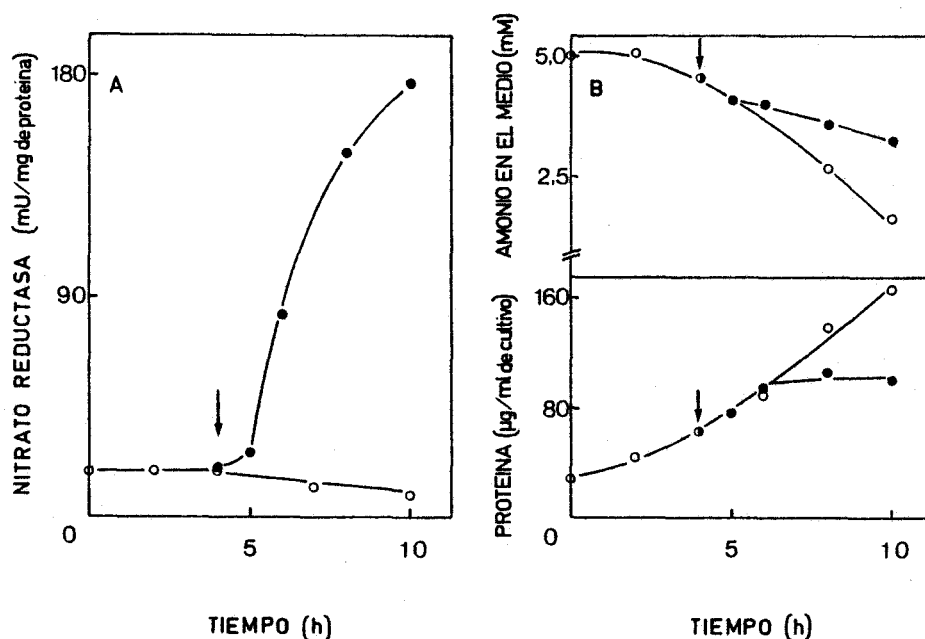


Fig. 12. Liberación por MSX del efecto represor del amonio sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se incubaron, durante 4 h, en condiciones de cultivo en medio conteniendo 2,5 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Transcurrido este tiempo la suspensión celular se dividió en dos mitades, a una de las cuales se añadió la cantidad de MSX adecuada para alcanzar una concentración final de 1 μM , prosiguiéndose la incubación en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de la suspensión correspondiente, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno tras concentrar 5 veces las células), la cantidad de proteína y la cantidad de amonio presente en el medio de incubación. (O) control; (●) suspensión conteniendo MSX.

ductasa. En estas condiciones, la aparición de la actividad enzimática (Fig. 12.A) iba en paralelo con la inhibición tanto de la utilización de amonio como del crecimiento celular (Fig. 12.B), inhibiciones que son resultado lógico de la inactivación de la glutamina sintetasa. El periodo de retardo observado entre la adición del MSX y la manifestación de los resultados descritos representa probablemente, en su mayor parte, el tiempo requerido para que la concentración empleada de MSX provoque el grado adecuado de inactivación de la glutamina sintetasa.

En la Tabla 11 se muestra el efecto de la presencia de MSX sobre los niveles de actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* incubadas en medios conteniendo diferentes compuestos nitrogenados o carente de fuente de nitrógeno. Como puede observarse, en presencia de MSX siempre se alcanzaban altas actividades enzimáticas, especialmente en los medios suplementados con nitrato o amonio y, sobre todo, en aquellos que contenían simultáneamente ambos compuestos. Puede concluirse por tanto, que el MSX elimina el efecto negativo que el amonio ejerce sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Este hecho podría indicar que tal efecto negativo no se ejerce por el propio ión amonio de manera directa, sino que requiere su previa metabolización a través de la glutamina sintetasa.

Como complemento del experimento ilustrado en la Tabla 11, En la Figura 13 se recogen los espectros de absorción que, tras 6 h de incubación en el medio correspondiente, presentaban las células de cada una de las suspensiones utilizadas en dicho experimento. Puede observarse que, en ausencia de MSX, las células cultivadas con nitrato o amonio presentaban una fuerte absorbancia a 628 nm, característica del pigmento ficocianina, el cual es degradado en situaciones de deficiencia en nitrógeno (1) y cuya abundancia suele tomarse como índice del estado nitrogenado celular. El valor de la absorbancia a 628 nm de la suspensión incubada en ausencia de fuente de nitrógeno era notablemente inferior a los de aquellas incubadas en presencia de nitrato o amonio. Por el contrario, todas las suspensiones incubadas en presencia de MSX conservaban el alto contenido en ficocianinas que presentaban las células originales (procedentes de un cultivo con amonio), con independencia de que el medio de incubación contuviese o no nutrientes nitrogenados. Este hecho de la conservación de fi-

Tabla 11. Efecto del MSX sobre el nivel de actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* incubadas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (mU/mg de proteína)	
	sin MSX	con MSX
NO_3K (20 mM)	272	224
Ninguna	150	53
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (10 mM)	8	187
NO_3K (20 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (10 mM)	8	497

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica, en presencia o ausencia de MSX 1 μM . Las suspensiones resultantes, con una concentración celular de 0,5 μl de células/ml, se incubaron durante 6 h en condiciones de cultivo, transcurridas las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilizar con tolueno) y la cantidad de proteína en alícuotas de cada una de dichas suspensiones.

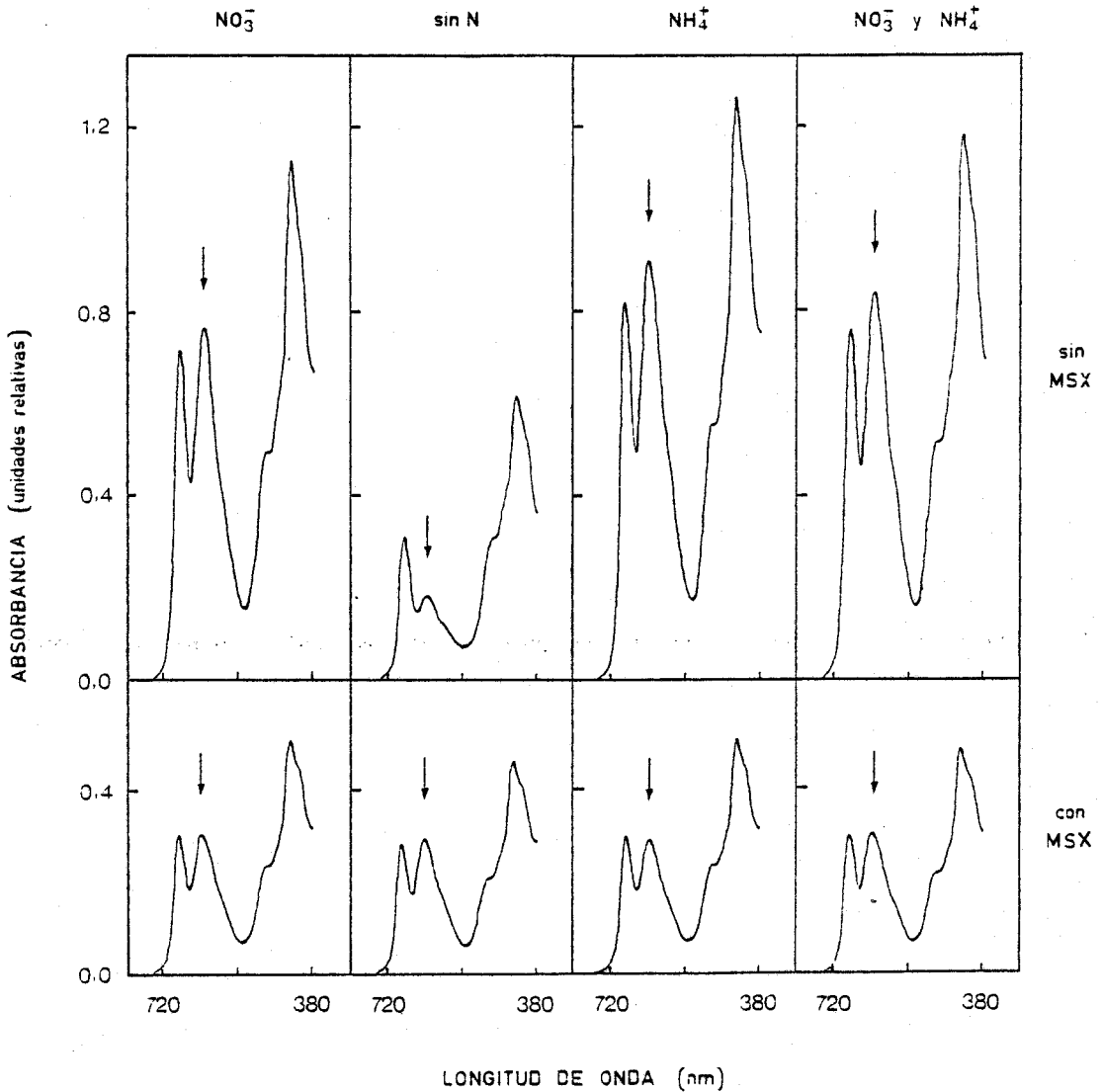


Fig. 13. Espectros de absorción de suspensiones celulares de *A. nidulans* incubadas en medio conteniendo diversas fuentes de nitrógeno, en presencia o ausencia de MSX. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se mantuvieron en las condiciones experimentales que se describen en la tabla 11. Al término del periodo de incubación se tomaron alícuotas de cada una de las ocho suspensiones obtenidas, que se utilizaron directamente para realizar las medidas de absorbancia. Las flechas indican el máximo de absorción de las ficocianinas ($\lambda=628$ nm).

cocianinas en células de *A. nidulans* tratadas con MSX podría interpretarse de dos formas diferentes con respecto a su significado para la evaluación del estado nitrogenado de las mismas. En presencia del inhibidor de la glutamina sintetasa, las células podrían mantener, durante algún tiempo, un estado nitrogenado satisfactorio aún en ausencia de nutrientes nitrogenados exógenos (en esas condiciones el crecimiento celular está fuertemente inhibido, Fig. 12, con lo que disminuiría drásticamente su requerimiento de nitrógeno). Alternativamente, pudiera ser que, aún en situación de deficiencia, el MSX impidiese la generación de la señal intracelular que provoca la degradación de la ficocianina.

En este contexto, es interesante señalar que en células de *A. nidulans* tratadas con MSX, cuya capacidad de asimilación de amonio (bien sea suministrado exógenamente o resultante de la reducción intracelular del nitrato) estaba reducida al 10-15% de la que manifiestan las células no tratadas (24), este ión no solo no ejercía su efecto negativo sobre la síntesis de nitrato reductasa, sino que la síntesis del enzima se veía favorecida al aumentar la concentración de amonio en el medio de cultivo (Fig. 14). Estos resultados podrían indicar que, en presencia de MSX, la síntesis de proteínas celulares se encuentra limitada por la disponibilidad de precursores nitrogenados y que el aporte de amonio, a alta concentración, podría contribuir a aumentar esta disponibilidad.

Según se ha descrito en el apartado anterior, las cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno sólo desarrollan altos niveles celulares de actividad nitrato reductasa en medios conteniendo nitrato como única fuente de nitrógeno. Como se ilustra en la Tabla 12, en *Anabaena* sp. 7119 la presencia de MSX hacía posible que esos altos niveles pudieran alcanzarse en cultivos conteniendo nitrato y amonio simultáneamente. Los experimentos que se presentan en las Tablas 13 y 14 muestran para *Anabaena variabilis* y *Nostoc* sp. 6719 respectivamente, que en estos organismos el MSX permitía que se alcanzasen altas actividades nitrato reductasa en medios que contenían amonio, pero solo si el nitrato se encontraba presente simultáneamente. Estos resultados confirman la idea de que el nitrato ejerce un papel positivo esencial para que proceda la síntesis de nitrato

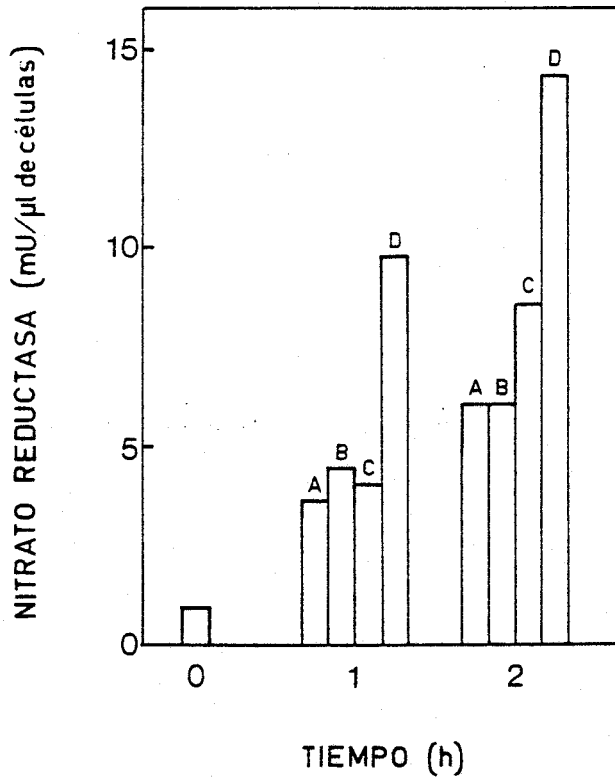


Fig. 14. Efecto de la fuente de nitrógeno y su concentración sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans* tratadas con MSX. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se preincubaron durante 1 h, en condiciones de cultivo, a una concentración de 2 μ l de células por ml de medio conteniendo 10 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y 10 μ M de MSX. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por filtración y, tras ser lavadas exhaustivamente con medio libre de nitrógeno combinado, se resuspendieron, a igual concentración, en medios suplementados con 10 μ M de MSX y conteniendo como fuente de nitrógeno: 2 mM de NO_3K (A), 20 mM de NO_3K (B), 1 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (C) ó 10 mM de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (D), siendo nuevamente incubadas en condiciones de cultivo. En el momento de comenzar esta incubación y después de 1 y 2 h se tomaron muestras de cada una de las cuatro suspensiones, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y la cantidad de proteína.

Tabla 12. Efecto del amonio y del MSX sobre el nivel de actividad nitrato reductasa de células de *Anabaena* sp. 7119 incubadas en presencia de nitrato

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (mU/mg de proteína)	
	sin MSX	con MSX
NO_3K (20 mM)	76	ND
NO_3K (20 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	26	101

Células de *Anabaena* sp. 7119 cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración celular correspondiente a 161 μg de proteína/ml, a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica, en presencia o ausencia de MSX 10 μM . Después de 6 h de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la determinación de la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con tolueno) y de la cantidad de proteína, en alícuotas de cada una de las suspensiones celulares obtenidas. ND: no se determinó.

Tabla 13. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa en *Anabaena variabilis* en presencia de MSX

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ K (20 mM)	171
Aire (78% N ₂)	6
SO ₄ (NH ₄) ₂ (2 mM)	6
NO ₃ K (20 mM) y SO ₄ (NH ₄) ₂ (2 mM)	225

Células de *A. variabilis* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración celular correspondiente a 8,5 µg de clorofila por ml de suspensión, a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica y 10 µM de MSX. Después de 6 h de incubación en condiciones de cultivo se procedió a la determinación de las actividades nitrato reductasa y glutamina sintetasa (transferasa), en alícuotas de cada una de dichas suspensiones permeabilizadas con MTA. Los valores de actividad GS encontrados fueron de 170 mU/mg de proteína para el cultivo con nitrato, 150 mU/mg de proteína para el que no poseía nitrógeno combinado, 230 mU/mg de proteína para el que contenía amonio y 200 mU/mg de proteína para el de nitrato y amonio. Tras 6 h de incubación en idénticas condiciones, cultivos controles conteniendo las mismas fuentes de nitrógeno pero en ausencia de MSX, dieron valores de actividad GS de alrededor de 2.700 mU/mg de proteína.

Tabla 14. Efecto del MSX sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa en *Nostoc* sp. 6719

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (mU/mg de proteína)	
	sin MSX	con MSX
NO_3K (20 mM)	72	69
Aire (78% N_2)	19	16
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	19	18
NO_3K (20 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (2 mM)	18	76

Células de *Nostoc* cultivadas con amonio se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica, en presencia o ausencia de 10 μM de MSX. Después de 7 h de incubación en condiciones de cultivo se estimó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) y la cantidad de proteína en cada una de las suspensiones celulares obtenidas.

reductasa en estas cianobacterias filamentosas.

Se ha estudiado en *A. variabilis* si el ión amonio en el medio externo tenía alguna influencia sobre el proceso de entrada del nitrato al interior celular. Para ello se ha seguido la cinética de consumo de nitrato por células de este microorganismo en presencia y ausencia de amonio añadido exógenamente (Fig. 15). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el amonio ejerce una drástica inhibición del consumo de nitrato por esta cianobacteria. Además de refrendar esta conclusión, los resultados que se recogen en la Tabla 15 muestran también que el MSX es capaz de anular por completo dicha acción inhibidora del amonio sobre el consumo de nitrato.

Como se ha indicado en la Introducción, resultados similares a los aquí descritos para la inhibición por amonio del consumo de nitrato y su prevención por MSX en *A. variabilis*, se habían obtenido para otras cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno, concretamente *Nostoc* sp. 6719 y *Anabaena* sp. 7119 (21). En consecuencia, aunque puede existir un efecto negativo directo del amonio sobre la síntesis de la nitrato reductasa, los resultados disponibles, referentes a la regulación de la síntesis de este enzima en cianobacterias fijadoras de nitrógeno, podrían interpretarse en base a la inhibición ejercida por el amonio sobre el proceso de entrada de nitrato al interior celular y a la eliminación por MSX de dicha inhibición.

3.2.3. Efecto de aminoácidos sobre la síntesis de nitrato reductasa en *Anacystis nidulans*

En el apartado anterior se ha puesto de manifiesto que el efecto represor ejercido por el amonio sobre la síntesis de la nitrato reductasa de *A. nidulans* requería que este ión se metabolizase a través de la glutamina sintetasa. Entre los candidatos para el papel de mediador del efecto represor del amonio parece lógico considerar a los aminoácidos, metabolitos nitrogenados típicos; en especial a la glutamina, que se sintetiza directamente a partir del amonio con intervención de la glutamina sintetasa, y a derivados de la glutamina.

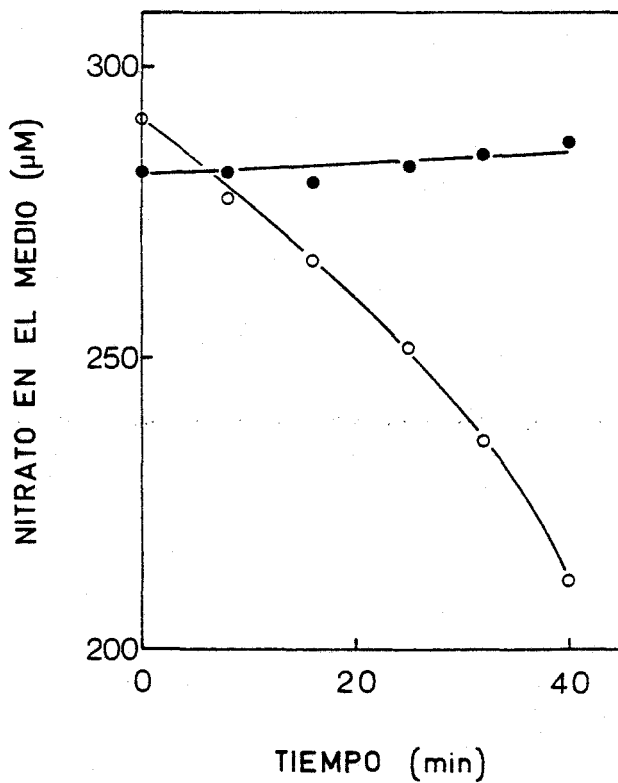


Fig. 15. Consumo de nitrato por células de *Anabaena variabilis* y su inhibición por amonio. Células de *Anabaena variabilis* cultivadas con nitrato se ensayaron para la capacidad de consumo de este ión en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos, en presencia (●) o ausencia (○) de ClNH_4 1 mM. La concentración de células en el ensayo de consumo correspondía a 6 μg de clorofila/ml.

Tabla 15. Efecto del MSX sobre el consumo de nitrato y su inhibición por amonio en *Anabaena variabilis*

Adición	Nitrato consumido (nmol/ml)
Ninguna	170
ClNH ₄ (1 mM)	0
MSX (0,1 mM)	110
ClNH ₄ (1 mM) y MSX (0,1 mM)	106

Células de *A. variabilis* cultivadas con nitrato se preincubaron durante 20 min en tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,1, suplementado con 10 mM de CO₃HNa, con o sin 0,1 mM de MSX, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos para el ensayo de consumo de nitrato. La concentración de clorofila era de 30 µg/ml. Transcurrido el periodo de preincubación se comenzó el ensayo por adición de los iones nitrogenados que se indican y se desarrolló durante 40 min. Después de esos 40 min se midió la actividad glutamina sintetasa de cada una de las suspensiones celulares utilizadas (permeabilizando con MTA), obteniéndose valores de 1,80 U/ml para las que se mantuvieron en ausencia de MSX y de 0,13 U/ml para las tratadas con dicho compuesto.

Partiendo de esta idea, se ha ensayado el efecto de 24 aminoácidos, entre los que se encuentran los que forman parte de las proteínas, sobre el desarrollo de actividad nitrato reductasa que tiene lugar cuando células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfieren a medio conteniendo nitrato como único nutriente nitrogenado. En las Figuras 16-21 se presentan las cinéticas de estos desarrollos de actividad, recogiendo un resumen de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos en la Tabla 16. El efecto de los aminoácidos se probó siempre en medios que contenían simultáneamente nitrato, al objeto de asegurar un suministro adecuado de nitrógeno en todos los casos. Puede observarse que la mayoría de los aminoácidos presentaban efecto positivo sobre el desarrollo de la nitrato reductasa celular, siendo especialmente destacable la estimulación de este proceso provocada por la presencia de histidina o de leucina en el medio de cultivo. Este efecto positivo general podría explicarse por el aumento en la disponibilidad de los precursores para la síntesis de proteínas que supondría el suministro exógeno de aminoácidos, asumiendo que las concentraciones intracelulares de aquellos que estimulan más fuertemente el desarrollo de nitrato reductasa limitarían, en condiciones normales, el mencionado proceso de síntesis.

Por otra parte, puede observarse también que siete de los aminoácidos ensayados inhibían, en distintos grados, el desarrollo de actividad nitrato reductasa en la transferencia de amonio a nitrato, siendo especialmente notables los efectos negativos debidos a la presencia de cisteína, triptófano y valina. Otros aminoácidos que presentaban efecto inhibitorio sobre el mencionado proceso eran arginina, glutamina, isoleucina y fenilalanina. Todos los aminoácidos con efecto inhibitorio podrían representar "a priori" posibles mediadores de la represión nutricional de la nitrato reductasa, provocada por la presencia de amonio en el medio de cultivo de *Anacystis*. Los experimentos que se presentan a continuación están encaminados a contrastar la validez de esta propuesta general.

La glutamina es un compuesto nitrogenado que presenta características especialmente adecuadas para poder ejercer un papel regulador promovido por el amonio, puesto que es el primer producto que se sintetiza en la célula a partir de este ión. No obstante, era importante considerar

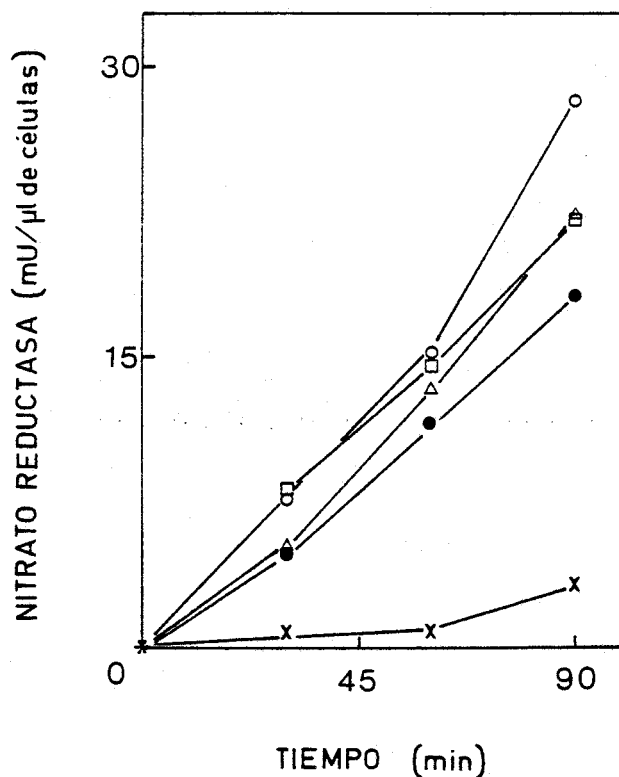


Fig. 16. Efecto de los aminoácidos alanina, asparraguina, aspartato y cisteína sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Células de *Anacystis nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, con una concentración celular inicial de 1 μ l por ml, a medio con nitrato sin ningún suplemento adicional (●) o suplementado con 50 mM de L-alanina (○), L-asparraguina (Δ), L-aspartato (□) o L-cisteína (X), incubándose durante 90 min en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de cada una de las suspensiones obtenidas en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa tras permeabilización con tolueno.

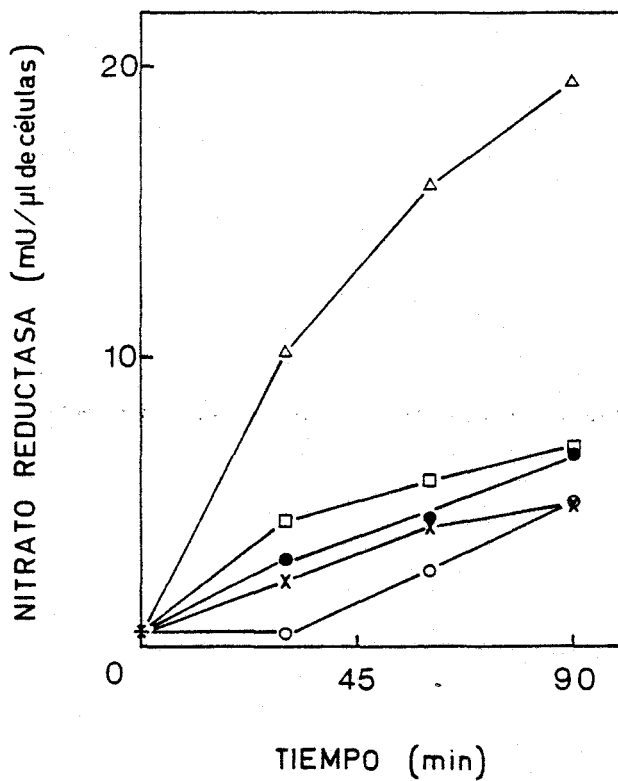


Fig. 17. Efecto de los aminoácidos arginina, histidina, hidroxiprolina e isoleucina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se han descrito para la Figura 16, excepto que las células se transfirieron a medio con nitrato (●) o con nitrato y 50 mM de L-arginina (○), L-histidina (Δ), L-hidroxi prolina (□) o L-isoleucina (X).

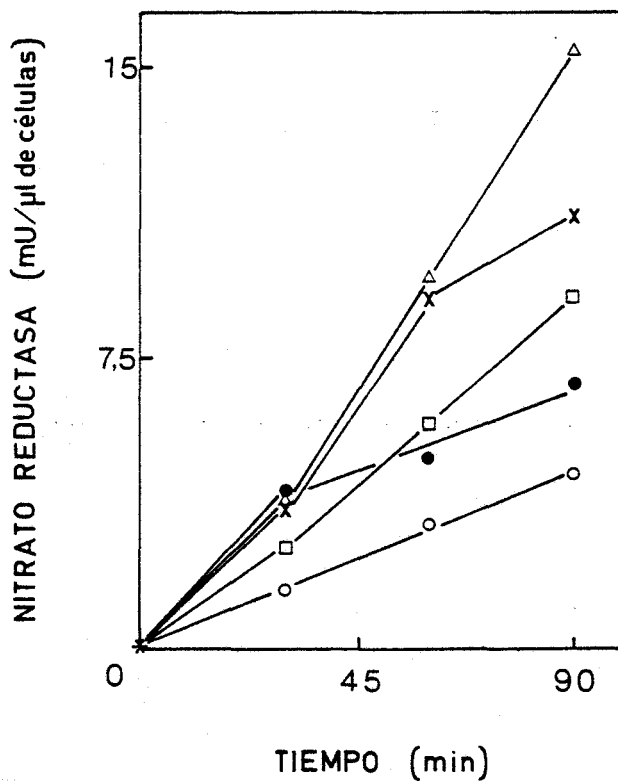


Fig. 18. Efecto de los aminoácidos fenilalanina, leucina, lisina y metionina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se han descrito para la Figura 16, excepto que las células se transfirieron a medio con nitrato (●) o con nitrato y 50 mM de L-fenilalanina (○), L-leucina (Δ), L-lisina (□) o L-metionina (X).

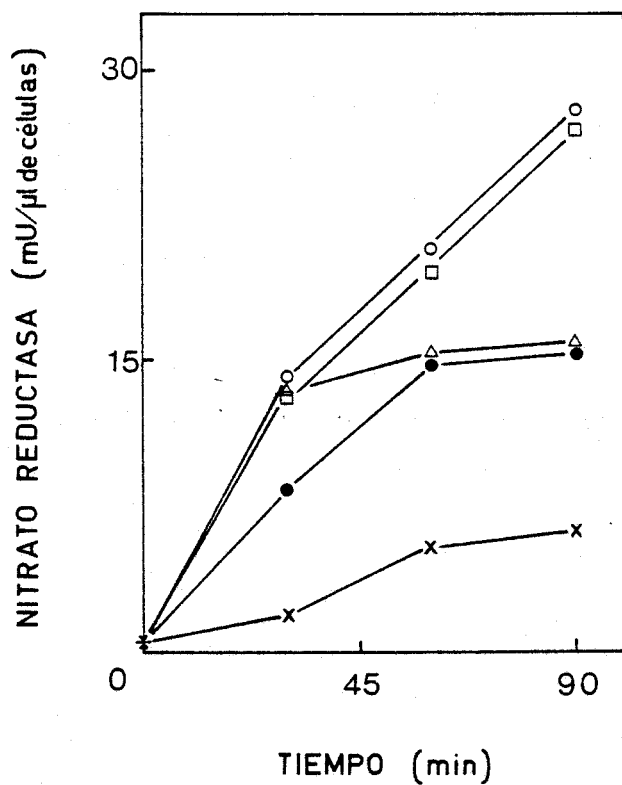


Fig. 19. Efecto de los aminoácidos serina, treonina, glicina y valina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se han descrito para la figura 16, excepto que las células se transfirieron a medio con nitrato (●) o con nitrato y 50 mM de L-serina (O), L-treonina (Δ), glicina (□) o L-valina (X).

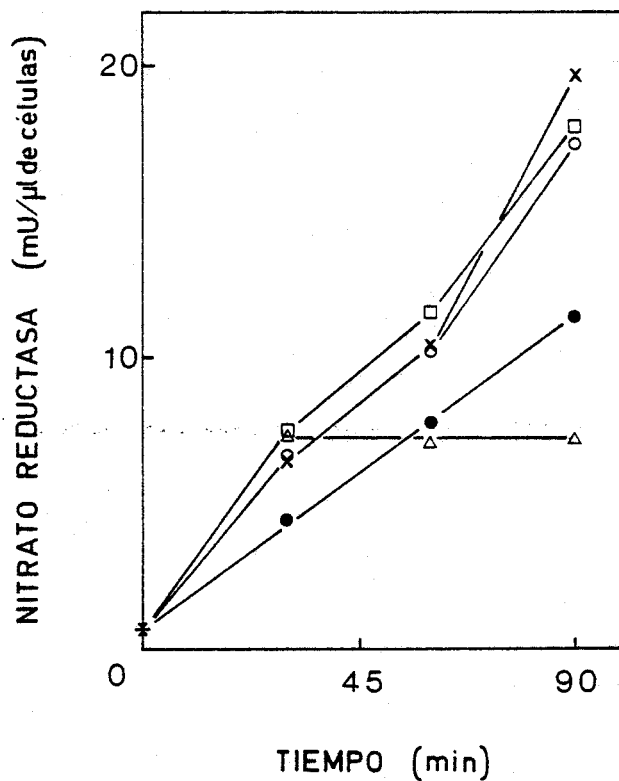


Fig. 20. Efecto de los aminoácidos prolina, triptófano, orbitina y citrulina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se han descrito para la figura 16, excepto que las células se transfirieron a medio con nitrato (●) o con nitrato y 50 mM de L-prolina (○), L-triptófano (Δ), L-orbitina (□) o L-citrulina (X).

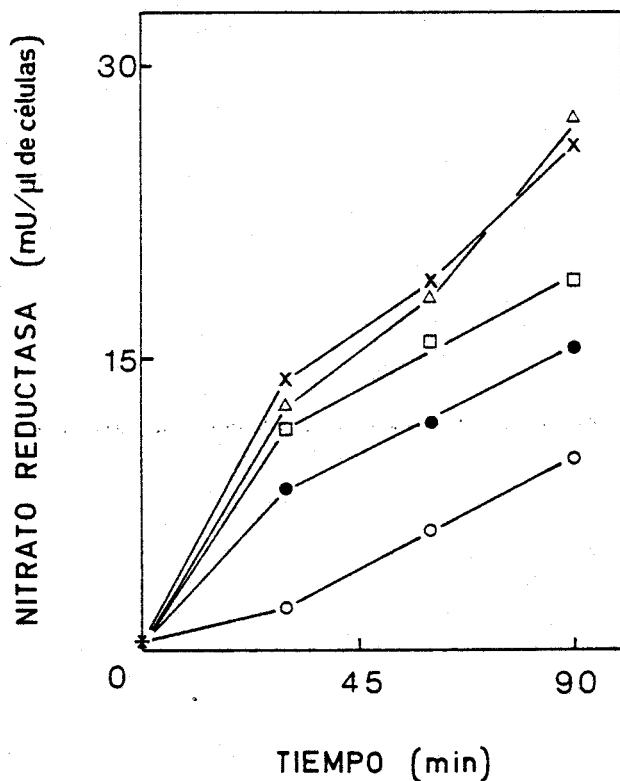


Fig. 21. Efecto de los aminoácidos glutamina, glutamato, cistina y tirosina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se han descrito para la figura 16, excepto que las células se transfirieron a medio con nitrato (●) o con nitrato y 50 mM de L-glutamina (○), 50 mM de L-glutamato (Δ), L-cistina a concentración saturante (□) o L-tirosina a concentración saturante (X).

Tabla 16. Efecto de diversos aminoácidos sobre la síntesis de la nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*

Aminoácido añadido	Nitrato reductasa (% del control)
Ninguno	100
Alanina	156
Arginina	76
Asparraguina	124
Aspartato	121
Cisteína	18
Cistina	124
Citrulina	174
Fenilalanina	66
Glicina	176
Glutamato	177
Glutamina	64
Hidroxiprolina	105
Histidina	294
Isoleucina	73
Leucina	225
Lisina	133
Metionina	162
Ornitina	159
Prolina	153
Serina	182
Tirosina	169
Treonina	105
Triptófano	63
Valina	41

Las condiciones experimentales se encuentran descritas en las Figuras 16-21. En cada experimento se ensayó el efecto de cuatro aminoácidos con la distribución recogida en dichas figuras. El 100% corresponde a la actividad nitrato reductasa detectada en el correspondiente control sin aminoácido que se introducía en cada experimento. Todos los valores que se muestran en esta tabla corresponden a los obtenidos 90 min después de haber efectuado la transferencia desde el medio con amonio al medio con nitrato con o sin aminoácido añadido.

también que la presencia de glutamina en el medio de cultivo podría conllevar la introducción de amonio en el mismo (mas aún a las altas concentraciones de aminoácido utilizadas, que eran las que se requerían para que manifestase su efecto represor, Tabla 17). Este amonio podría generarse por degradación biológica del aminoácido o encontrarse presente ya en la preparación comercial de glutamina, como resultado de su hidrólisis química. A este respecto, es interesante señalar que el grado de inhibición de la síntesis de nitrato reductasa que se obtenía en presencia de glutamina variaba enormemente con el lote utilizado. Parecía pues necesario comprobar si el efecto negativo provocado por la presencia de glutamina se debía en realidad al aminoácido o, por el contrario, se originaba en el amonio, que probablemente se encontraría también presente. Para ello se llevó a cabo el experimento que se ilustra en la Figura 22 en el cual se ensayó el efecto de la glutamina sobre la síntesis de nitrato reductasa en células de *A. nidulans* cultivadas con amonio, que poseían sólo niveles basales de glutamina sintetasa por haberse sometido a tratamiento con MSX antes de su transferencia al medio con nitrato. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el pretratamiento de las células con MSX impide que la glutamina pueda ejercer su acción represora de la nitrato reductasa.

Aunque sería posible elaborar otras interpretaciones (que se tratarán en la sección de Discusión), este hecho apunta a que la glutamina por sí misma no sea el compuesto que, de forma directa, participe en el mecanismo molecular de represión. De hecho, los resultados podrían interpretarse en términos de que la inhibición de la síntesis de nitrato reductasa a que conduce la glutamina, pudiese en realidad ser consecuencia de la introducción o aparición de amonio en el medio de cultivo. A este respecto, es interesante señalar que la incubación de células de *A. nidulans* tratadas con MSX en presencia de 50 mM de glutamina, conlleva la liberación de amonio al medio de cultivo en cantidades sensiblemente superiores a las liberadas por células que, habiendo sido sometidas al mismo tratamiento, se incuban en presencia de 20 mM de nitrato ó 10 mM de glutamina, condiciones ambas no represoras de nitrato reductasa (Fig. 23).

Tabla 17. Efecto de la concentración de glutamina sobre la síntesis de la nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*

Glutamina (mM)	Actividad nitrato reductasa (% del control)
0	100
10	110
20	114
30	122
40	69
50	18

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron (concentración celular, 1 μ l/ml) a medio con nitrato suplementado con la concentración de glutamina que se indica, incubándose a continuación en condiciones de cultivo. Transcurridas 2 h desde el comienzo de la misma, se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa (tras permeabilización con tolueno) y el volumen de células empaquetadas. El 100% de actividad correspondía a 15 mU/ μ l de células.

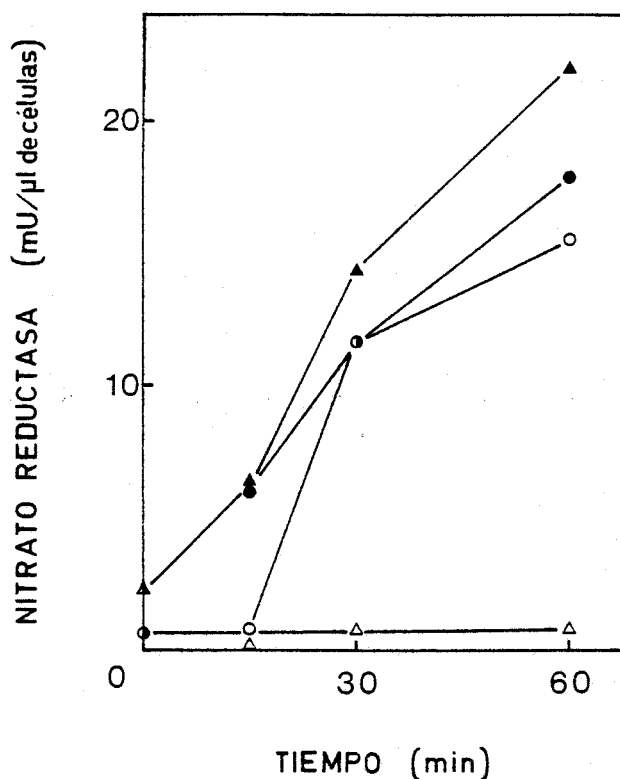


Fig. 22. Eliminación por MSX del efecto represor de la glutamina sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se preincubaron durante 1 h en condiciones de cultivo en medio con amonio suplementado (símbolos oscuros) o no (símbolos claros) con MSX 4 μM (la concentración de células en el momento de comenzar la preincubación fué de 1 μl por ml de medio). Transcurrido este tiempo se recogieron por separado las células de cada una de las dos preparaciones y, tras ser lavadas exhaustivamente con medio de cultivo libre de MSX, se resuspendieron, a concentración de 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$, en medio con nitrato suplementado (triángulos) o no (círculos) con 50 mM de L-glutamina y se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas en las cuales, tras permeabilización con tolueno, se determinó la actividad nitrato reductasa. La actividad glutamina sintetasa (igualmente medida tras toluenización) se mantuvo, durante los 60 min de incubación, en unas 98 mU/ μl de células en los cultivos sin tratar con MSX y alrededor de 25 mU/ μl de células en los tratados con este compuesto.

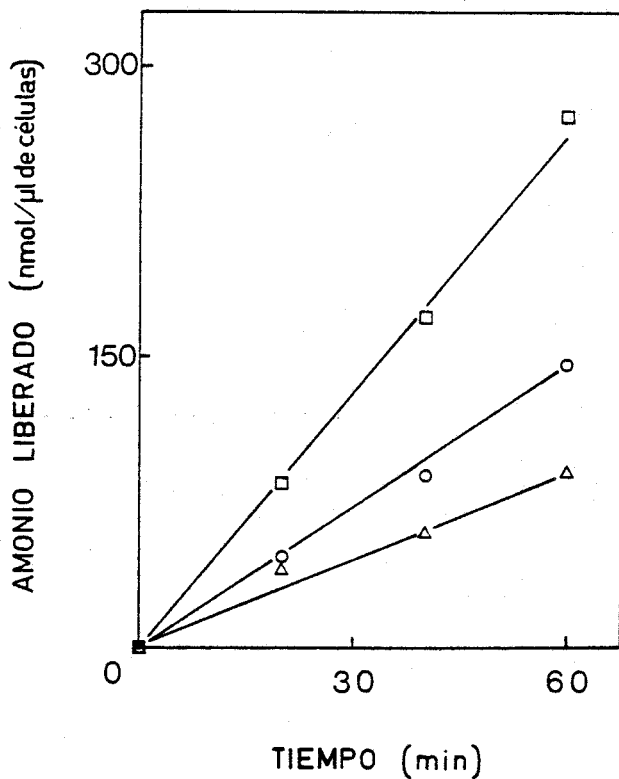


Fig. 23. Liberación de amonio a partir de glutamina por células de *A. nidulans* tratadas con MSX. Se partió de un cultivo de amonio de *A. nidulans* (2,9 μ l de células/ml) al cual se añadió la cantidad de MSX necesaria para alcanzar una concentración final de 1 mM. Tras 15 min de incubación en condiciones de cultivo, las células se recogieron por filtración, se lavaron extensivamente con medio de cultivo sin fuente de nitrógeno y se resuspendieron (a una concentración inicial de 1 μ l de células por ml) en el mismo medio suplementado con NO₃K 20 mM (○), glutamina 10 mM (Δ) o glutamina 50 mM (□), prosiguiéndose la incubación en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas procediéndose, tras separar las células por filtración, a determinar la cantidad de amonio en los filtrados correspondientes.

La arginina es un aminoácido que también puede hidrolizarse fácilmente liberando amonio. Al igual que se ha discutido para la glutamina, la liberación de amonio puede ocurrir espontáneamente con la consiguiente contaminación de las preparaciones comerciales del aminoácido (igualmente la magnitud de la inhibición de la síntesis de nitrato reductasa producida por arginina variaba considerablemente con el lote utilizado) o bien por acción biológica. A este respecto, se ha verificado que células enteras de *A. nidulans* pueden catalizar la oxidación de arginina con liberación concomitante de amonio al medio de cultivo (23). Se hacía pues necesario comprobar si, también en el caso de este aminoácido, el efecto represor ejercido sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans* podía atribuirse, no a la propia molécula de arginina, sino al amonio que le acompañaba o que se generaba a sus expensas. El experimento cuyos resultados se recogen en la Tabla 18 pone de manifiesto que en células tratadas con MSX no se observa un efecto significativo de la arginina en lo referente al desarrollo de actividad nitrato reductasa (haciéndose evidente además, la fuerte generación de amonio a partir de este aminoácido).

La prevención por MSX del efecto represor tanto de la glutamina como de la arginina es una característica que, en principio, no debiera manifestar un metabolito que actuase directamente como correpresor de la nitrato reductasa, aunque sería compatible con el papel de aquellos metabolitos que, sin poseer carácter regulador en sí mismos, participasen en la síntesis del verdadero correpresor. En resumen, los datos que se ha expuesto favorecen la interpretación de que ni la glutamina ni la arginina constituyen el correpresor genuino de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Más aún, aunque los datos no permitan descartar la participación, más o menos directa, de estos aminoácidos en la síntesis de dicho correpresor (que para el caso de la glutamina es casi obligada al ser el primer producto de la metabolización del amonio), pueden interpretarse más fácilmente en términos de su papel como sustratos para la producción del represor nutricional amonio, cuando se añaden al medio de cultivo a las altas concentraciones utilizadas.

Anteriormente se había expuesto que la cisteína, el triptófano y la

Tabla 18. Efecto de la arginina sobre la síntesis de la nitrato reductasa de células de *Anacystis nidulans* tratadas con MSX

Adición	Nitrato reductasa (mU / μ l de células)	Amonio liberado (nmol / μ l de células)
Ninguna	6	61
Arginina (50 mM)	8	199

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se preincubaron durante 1 h en medio con amonio suplementado con MSX 4 μ M (concentración de células, 1 μ l/ml) en condiciones de cultivo. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron, se lavaron exhaustivamente con medio con nitrato libre de MSX, se resuspendieron en este mismo medio (a una concentración inicial de 1 μ l/ml) suplementado o no con L-arginina según se indica y se incubaron, durante 2 h, en condiciones de cultivo. En el momento de comenzar dicha incubación y después de las 2 h se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas en las cuales se determinaron las actividades nitrato reductasa y glutamina sintetasa (ambas tras permeabilizar con tolueno) y la cantidad de amonio presente en el medio (tras separar las células por filtración). En el momento de comenzar la incubación se detectó, en ambas suspensiones, una actividad nitrato reductasa de aproximadamente 3 mU/ μ l de células y ausencia total de amonio. La actividad glutamina sintetasa se mantuvo en las dos suspensiones, durante todo el tiempo de incubación, en unas 23 mU/ μ l de células.

valina eran los aminoácidos que, de entre los ensayados, presentaban en forma más clara y repetitiva un efecto represor de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. A este respecto es interesante señalar que, aunque ni la valina ni el triptófano aparezcan en la Tabla 16 como causantes de inhibiciones especialmente drásticas (los valores que aparecen corresponden a los obtenidos después de 90 min en el medio con nitrato), ambos aminoácidos provocan una notable interferencia con la continuación de la síntesis de nitrato reductasa, después de un periodo inicial en que permiten que tenga lugar de manera apreciable (Fig. 19 y 20). Este hecho es aún más evidente para el caso del triptófano que, transcurridos unos 30 min, provoca la detención total de la síntesis de la nitrato reductasa, situación que se ha comprobado se mantiene 3 h después de comenzar la incubación de las células de *Anacystis* en el medio con nitrato y aminoácido.

A diferencia de lo que sucede con la glutamina y la arginina, se ha constatado que la incubación de células de *A. nidulans* tratadas con MSX, en presencia de L-cisteína, L-triptófano o L-valina no conduce a la liberación de amonio a partir de estos aminoácidos (23), lo cual descartaría la posibilidad de que el efecto negativo de los mismos sobre la síntesis de la nitrato reductasa fuese atribuible a un efecto amonio. No obstante, antes de su consideración como serios candidatos a reguladores de la síntesis del mencionado enzima, se hacía necesario comprobar que no afectaban negativamente a la actividad de las moléculas de nitrato reductasa una vez sintetizadas, o que no interferían con el ensayo de su actividad según el procedimiento utilizado rutinariamente. En la Tabla 19 se presentan datos que ponen de manifiesto que la incubación de células de *A. nidulans* con altos niveles iniciales de actividad nitrato reductasa, en medios suplementados con cloranfenicol para impedir la síntesis de nuevas moléculas de enzima, en presencia de altas concentraciones de cisteína, triptófano o valina, no provocaba ningún cambio sustancial en los niveles celulares de dicha actividad enzimática. Por otra parte, los resultados que se presentan en la Tabla 20 indican que los mismos aminoácidos tampoco afectaban significativamente a la determinación de la actividad nitrato reductasa, cuando se encontraban presentes a concentración 12,5 mM (la misma introducida en los experimentos de síntesis) en la mezcla de reacción.

Tabla 19. Efecto de la incubación con cisteína, triptófano o valina sobre la actividad nitrato reductasa preexistente en células de *Anacystis nidulans* cultivadas con nitrato

Adición	Actividad nitrato reductasa (%)	
	1 h	2 h
Ninguna	101	102
L-cisteína (50 mM)	86	77
L-triptófano (50 mM)	95	69
L-valina (50 mM)	86	75

Se partió de un cultivo de *A. nidulans* en medio con nitrato poseyendo una concentración celular de aproximadamente $1 \mu\text{l}$ de células/ml. En el momento de comenzar el experimento dicho cultivo se dividió en 4 partes iguales que se suplementaron con $50 \mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y las adiciones que se indican. Tras 1 h y 2 h de incubación en condiciones de cultivo se determinó la actividad nitrato reductasa en alícuotas de cada suspensión, después de ser sometidas a tratamiento de permeabilización con tolueno. El 100% de actividad corresponde a la estimada en el cultivo original inmediatamente antes de ser dividido, que dió un valor de $31 \text{ mU}/\mu\text{l}$ de células.

Tabla 20. Efecto de los aminoácidos cisteína, triptófano y valina sobre la determinación de la actividad nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del control)
Ninguna	100
L-cisteína (12,5 mM)	98
L-triptófano (12,5 mM)	87
L-valina (12,5 mM)	96

La actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans* permeabilizadas con tolueno, que procedían de un cultivo con nitrato con una concentración de 0,8 μ l de células/ml, se determinó según el procedimiento habitual, pero incluyendo en la mezcla de reacción las adiciones que se indican. El 100% de actividad correspondía a 29 mU/ μ l de células.

Estos resultados permiten seguir considerando a la cisteína, el triptófano y la valina como candidatos a reguladores negativos de la síntesis de la nitrato reductasa de *A. nidulans* aunque, por supuesto, la asignación firme del papel de correpresor de dicho enzima a cualquiera de tales aminoácidos, requeriría el desarrollo de estudios más amplios.

En este contexto se ha contemplado el hecho de que la cisteína, que es uno de los inhibidores que presentan un efecto negativo más claro sobre la síntesis de nitrato reductasa, fuese uno de los tres aminoácidos constituyentes del glutatión. El glutatión es un metabolito celular (tripéptido constituido por glicina, glutámico y cisteína) frecuentemente implicado en mecanismos de regulación enzimática en una gran variedad de organismos (111), entre ellos cianobacterias (102, 103), siendo destacable para nuestro caso el que en su síntesis, a partir de los aminoácidos constituyentes, intervenga un enzima (la γ -glutamilcisteína sintetasa) inhibible por MSX (59). Parecía pues interesante ensayar el efecto del glutatión sobre la síntesis de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Los resultados que se exponen en la Tabla 21 indican que también este metabolito interfiere negativamente con la síntesis del enzima, cuando se encuentra presente a alta concentración en el medio de cultivo. Estos hechos permiten considerar la posibilidad de que la cisteína y/o el glutatión pudieran estar implicados en el mecanismo molecular de regulación de la síntesis de nitrato reductasa en *Anacystis nidulans*.

Tabla 21. Efecto de la concentración de glutatión reducido sobre la síntesis de nitrato reductasa en *Anacystis nidulans*

Glutatión (mM)	Actividad nitrato reductasa (% del control)
0	100
5	103
10	90
20	86
30	82
40	70
50	51
70	48
90	30

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, con una concentración celular de $1 \mu\text{l}$ de células/ml, a medio con nitrato suplementado con las concentraciones de glutatión reducido que se indican. Tras 1 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas en cuyas células, después de lavadas extensivamente con medio libre de glutatión, se procedió a la determinación de actividad nitrato reductasa tras ser sometidas a tratamiento de permeabilización con tolueno. El 100% de actividad correspondía a $17,6 \text{ mU}/\mu\text{l}$ de células.

3.3. REGULACION DE LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN CELULAS DE *Anacystis nidulans*

Como se ha descrito en el apartado 3.1.1, *Anacystis nidulans* es una cianobacteria unicelular no fijadora de nitrógeno atmosférico que, a diferencia de lo que ocurre con las cianobacterias filamentosas fijadoras de N_2 que se han estudiado, presenta niveles sustanciales de actividad nitrato reductasa en ausencia de nitrato. Sin embargo, los niveles de actividad de dicho enzima que se encuentran en células de *A. nidulans* incubadas durante un periodo de 5-6 horas en medios conteniendo nitrato, son sensiblemente superiores a los de células mantenidas durante el mismo tiempo en medios de cultivo que carecen de cualquier posible fuente de nitrógeno utilizable (c.f. Tabla 2).

En el apartado 3.2 se han descrito también los resultados de un estudio similar llevado a cabo con células de *A. nidulans* tratadas con el análogo del glutamato MSX, las cuales son incapaces de asimilar amonio a través de la glutamina sintetasa. Dichos resultados indican que, en estas condiciones en que el amonio no ejerce ningún efecto represor sobre la nitrato reductasa, los niveles de dicha actividad enzimática son mayores en células incubadas en presencia de nitrato y/o amonio que en aquellas mantenidas en ausencia de nutrientes nitrogenados.

Una posible explicación para estas diferencias en los niveles de nitrato reductasa que se encuentran en distintas condiciones nutricionales no represoras, podría ser la existencia de diferencias en la estabilidad de dicha actividad enzimática de acuerdo con la presencia o ausencia de nutrientes nitrogenados. Para verificar esta hipótesis se han llevado a cabo los experimentos que se describen en el presente apartado, a través de los cuales se estudia la estabilidad de la nitrato reductasa preexistente en células de *A. nidulans* incapaces de llevar a cabo síntesis de proteínas. Como se tratará más ampliamente en la sección de Discusión, los resultados obtenidos apoyan la validez de esta interpretación.

3.3.1. Inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en respuesta a la ausencia de fuente de nitrógeno

3.3.1.1. Inactivación en ausencia y presencia de inhibidores de síntesis de proteínas

La transferencia de células de *Anacystis nidulans* cultivadas con nitrato, que poseen por tanto altos niveles de actividad nitrato reductasa, a medio carente de fuente de nitrógeno, resulta en una notable disminución del nivel celular de esta actividad enzimática. Tal inactivación procede de manera muy rápida, siendo particularmente evidente durante los primeros 10-15 min de incubación en el medio sin nitrógeno, con una pérdida de actividad del orden del 40 al 50% del valor inicial tras ese periodo de tiempo. A partir de ese momento la actividad nitrato reductasa comienza a aumentar hasta que al cabo de 45-60 min se recobran los altos niveles enzimáticos que originalmente poseían las células en el momento de efectuar la transferencia (Fig. 24).

La Figura 24 muestra también que cuando células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfieren a medio sin fuente de nitrógeno en presencia de 50 µg/ml de cloranfenicol, tiene lugar una rápida y sustancial inactivación de la nitrato reductasa, similar a la observada en ausencia del inhibidor de síntesis de proteínas. En presencia de cloranfenicol no se registra, sin embargo, recuperación de actividad alguna, sino que la inactivación prosigue con el tiempo, aunque más lentamente, hasta que, una hora después de la transferencia, la actividad se estabiliza en valores que oscilan alrededor del 40 y el 50% de la observada inicialmente.

Para comprobar que el mantenimiento de la inactivación de la nitrato reductasa no se debe a ningún efecto negativo directo que el cloranfenicol pudiese ejercer sobre dicha actividad enzimática, hemos querido comprobar si la kanamicina, otro inhibidor de síntesis de proteínas no relacionado químicamente con el cloranfenicol y cuyo mecanismo de acción es diferente al de esta sustancia, era también capaz de mantener la inactivación de la nitrato reductasa de células incubadas en medio carente de nutrientes nitrogenados. Los resultados que se recogen en la Tabla 22 muestran que la incubación de células de *A. nidulans* con altos niveles iniciales de nitrato reductasa, en medio sin fuente de nitrógeno en presencia de 50 µg/ml de

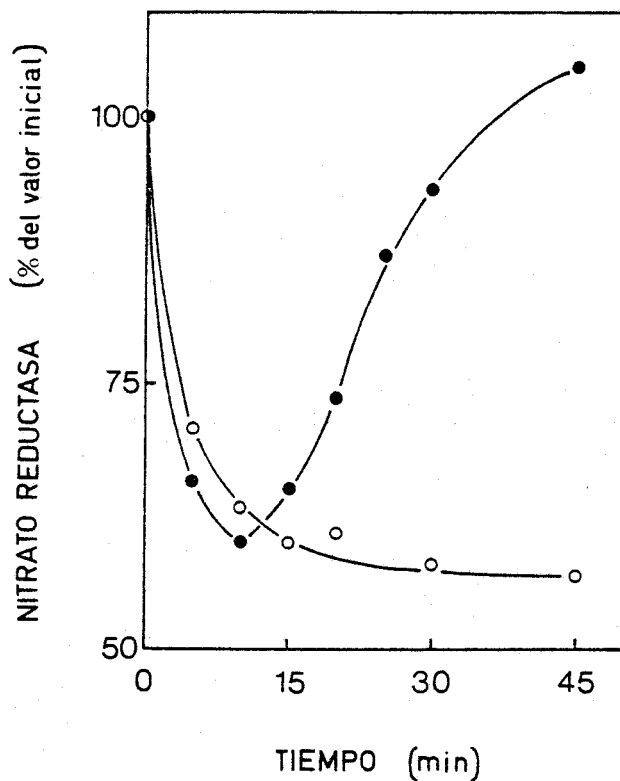


Fig. 24. Evolución de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno en presencia o ausencia de cloranfenicol. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno suplementado (○) o no (●) con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, y se incubaron en el medio correspondiente en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó en alícuotas de cada una de las suspensiones después de someter las células a tratamiento de permeabilización con tolueno. El 100% de actividad nitrato reductasa corresponde a 18 mU/ μl de células.

Tabla 22. Efecto del cloranfenicol y la kanamicina sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Ninguna	72
Cloranfenicol (50 µg/ml)	30
Kanamicina (50 µg/ml)	42

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno con las adiciones indicadas, y se incubaron en condiciones de cultivo durante 30 min. En el momento de efectuar la transferencia y después de transcurridos los 30 min se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones celulares, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de someter las células a tratamiento de permeabilización con tolueno. El 100% de actividad nitrato reductasa corresponde a 43 mU/µl de células.

kanamicina, conduce a una pérdida de dicha actividad enzimática similar a la registrada en presencia de cloranfenicol.

Estos resultados ponen de manifiesto que la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* observada en presencia de cloranfenicol o kanamicina en el medio sin fuente de nitrógeno no obedece a una inactivación artefactual de dicho enzima. El efecto de estos compuestos evitando una recuperación de actividad parece residir en su carácter inhibitor de la síntesis de proteínas, estabilizando así la pérdida de actividad registrada en respuesta a la carencia de nutrientes nitrogenados, y que en células sin tratar se compensa por nueva síntesis del enzima. El uso de estos inhibidores permite pues el estudio de la inactivación de la nitrato reductasa en respuesta a la carencia de fuente de nitrógeno. El resto de los experimentos que se describen en este apartado se han realizado en presencia de 50 µg/ml de cloranfenicol.

3.3.1.2. Estabilidad de la inactivación en células permeabilizadas

La inactivación de la nitrato reductasa de células de *A. nidulans* provocada por su incubación en medio carente de fuente de nitrógeno en presencia de cloranfenicol, se mantiene aún después de someter dichas células a tratamiento de permeabilización con tolueno, MTA o etanol (tratamiento este último que incluye además un lavado extensivo de la suspensión resultante). La Tabla 23 muestra que el porcentaje de la actividad nitrato reductasa inicial que puede detectarse una vez finalizado el tratamiento de inactivación es el mismo cuando las medidas de actividad enzimática se realizan previa permeabilización con tolueno o con etanol. Ambos procedimientos (ver apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos) provocan la salida y fuerte dilución de una gran cantidad de metabolitos intracelulares. La pérdida de actividad nitrato reductasa detectada en células permeabilizadas con tolueno o etanol no debe requerir pues, para su mantenimiento, metabolitos extraíbles con tales disolventes, sino que parece representar, por el contrario, la expresión de una inactivación estable de dicho enzima.

Tabla 23. *Mantenimiento de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans en células sometidas a tratamiento de permeabilización con tolueno o etanol*

Tratamiento	Actividad nitrato reductasa (mU/ μ l de células) (% del valor inicial)		
	t=0	t=60 min	
	Tolueno	61	35
Etanol	35	19	54

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno suplementado con 50 μ g/ml de cloranfenicol. En el momento de efectuar la transferencia y después de 30 min de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron alícuotas de la suspensión celular obtenida, que se sometieron a tratamiento de permeabilización con tolueno o etanol según los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. La actividad nitrato reductasa se estimó entonces en las correspondientes suspensiones de células permeabilizadas.

3.3.2. Prevención por nitrato, nitrito o amonio de la inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Cuando se transfieren células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, poseyendo por tanto niveles altos de actividad nitrato reductasa, a medios de cultivo conteniendo cloranfennicol y nitrato, amonio o ninguna fuente de nitrógeno combinado (Fig. 25), solo se observa una drástica y rápida pérdida de actividad nitrato reductasa en el medio que carece de nitrógeno combinado. Este hecho pone de manifiesto que tanto el nitrato como el amonio poseen un efecto estabilizador sobre dicho enzima, evitando su inactivación. Este efecto protector debe ejercerse a nivel posttraduccional, es decir, sobre las moléculas de nitrato reductasa ya sintetizadas, puesto que en las condiciones utilizadas (presencia de cloranfenicol) se excluye la síntesis de nuevas moléculas de enzima. Como se ilustra más adelante, la presencia de nitrito en el medio de cultivo ejerce un eficaz efecto protector, similar al observado para nitrato y amonio, sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*, frente a la inactivación que opera en medios carentes de nutrientes nitrogenados.

Es de interés discernir si el efecto del amonio estabilizando la nitrato reductasa de *A. nidulans* en las condiciones descritas se debe al propio ión amonio, o si por el contrario se requiere su metabolización posterior. Para ello se ha estudiado el efecto del amonio sobre la evolución de la actividad nitrato reductasa de células incubadas en presencia de cloranfenicol y tratadas con MSX, las cuales carecen de actividad glutamina sintetasa y, en consecuencia, presentan inoperante la ruta mayoritaria por la que el amonio se metaboliza en este microorganismo (24). Por otra parte, dado que el ión nitrato, una vez en el interior de las células de *A. nidulans*, se transforma inmediatamente por reducción en nitrito y amonio, el efecto protector que sobre la nitrato reductasa de este organismo ejerce el nitrato añadido exógenamente podría ser desarrollado por el propio ión nitrato, una vez transportado al interior celular, o aparecer como resultado de su conversión en nitrito o amonio.

La Tabla 24 recoge los valores de actividad nitrato reductasa que se obtuvieron cuando células de *A. nidulans*, cultivadas con nitrato y preincubadas durante 1 h en medio con nitrato o con nitrato y MSX, se transfi-

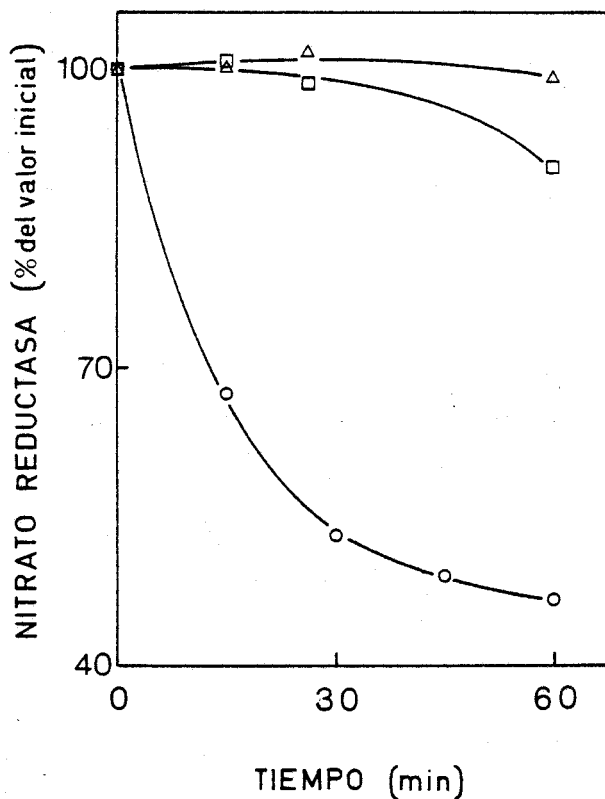


Fig. 25. *Prevención por nitrato o amonio de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans en medio carente de fuente de nitrógeno.* Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medios conteniendo NO_3K 20 mM (Δ), $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM (\square) o ninguna fuente de nitrógeno combinado, suplementados con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol, incubándose las suspensiones en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó en células permeabilizadas con tolueno. El 100% de actividad nitrato reductasa corresponde a 34 mU/ μl de células

Tabla 24. Efecto del MSX en la prevención por nitrato o amonio de la pérdida de actividad nitrato reductasa de *A. nidulans* que tiene lugar en ausencia de fuente de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (% del valor inicial)	
	sin MSX	con MSX
Ninguna	55	61
NO_3K (20 mM)	96	94
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (10 mM)	84	73

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato y preincubadas durante 1 h en medio con nitrato suplementado o no con MSX 5 μM , se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica y 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, en presencia o ausencia de MSX 5 μM . En el momento de efectuar la transferencia y tras 60 min de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de ser tratadas con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 51 mU/ μl de células. Durante el tiempo de incubación la actividad glutamina sintetasa (medida en células tratadas con MTA) se mantuvo alrededor de 260 mU/ μl de células en las suspensiones controles y alrededor de cero en las tratadas con MSX. Los datos que se presentan responden a la media de los obtenidos en tres experimentos independientes.

rieron a medios suplementados con cloranfenicol y conteniendo nitrato, amonio, o ninguna fuente de nitrógeno, con o sin MSX. Esos resultados indican que el efecto protector del amonio se mantiene parcialmente en las células tratadas con MSX, permitiendo sugerir que dicho efecto puede, al menos en parte, ser ejercido por el propio ión amonio. Por otra parte, los mismos resultados ponen de manifiesto que la presencia de MSX no afecta en forma significativa la protección que el nitrato ejerce sobre la actividad nitrato reductasa de células de *A. nidulans*.

En cuanto al efecto del nitrito sobre la inactivación de la nitrato reductasa, los resultados del experimento que se presenta en la Tabla 25, de diseño análogo al que acabamos de describir para el nitrato y el amonio, indican que, al igual que el del nitrato, su efecto protector se mantiene en presencia de MSX.

Dado que en presencia de MSX el efecto estabilizante del nitrato y el del nitrito se mantienen inalterados, mientras que el del amonio se conserva solo parcialmente, parece probable que la protección de la actividad nitrato reductasa ejercida por nitrato o nitrito no requiera que estos iones tengan que ser reducidos hasta amonio, sino que podría explicarse en términos de un efecto directo de los mismos sobre la inactivación que estamos considerando.

Reafirmando la idea de un papel directo del nitrato como estabilizante de la nitrato reductasa de *A. nidulans* se encuentran los resultados obtenidos con cianato, un análogo estructural del nitrato que puede penetrar en las células pero que no parece ser metabolizado posteriormente, sobre la pérdida de dicha actividad enzimática que tiene lugar en medios carentes de nutrientes nitrogenados. Los resultados que se presentan en la Tabla 26 ponen de manifiesto que el cianato ejerce una protección significativa de la nitrato reductasa en tales condiciones, lo que apoya la visión de una actuación directa por parte del nitrato.

Tabla 25. Protección por nitrito, en presencia o ausencia de MSX, de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* que tiene lugar en ausencia de fuente de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	Nitrato reductasa (% del valor inicial)	
	sin MSX	con MSX
Ninguna	33	46
NO ₂ K (1 mM)	69	71

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato y preincubadas durante 1 h en medio con nitrato suplementado o no con MSX 5 μ M, se transfirieron a medios conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica y 50 μ g/ml de cloranfenicol, en presencia o ausencia de MSX 5 μ M y se incubaron en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó, en presencia de MTA, en alícuotas tomadas de cada suspensión en el momento de efectuar la transferencia y a los 60 min de incubación. El 100% de actividad nitrato reductasa corresponde a 25 mU/ μ l de células. En el momento de efectuar la transferencia la actividad glutamina sintetasa (medida en células permeabilizadas con MTA) fue 300 mU/ μ l de células en la suspensión control y 18 mU/ μ l de células en la preincubada con MSX.

Tabla 26. Protección por cianato de la nitrato reductasa de *A. nidulans* frente a su inactivación en medio carente de fuente de nitrógeno

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Ninguna	41
CNOK (5 mM)	67
NO ₃ K	100

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno suplementado con las adiciones que se indican y con 50 µg/ml de cloranfenicol. En el momento de efectuar la transferencia y después de 60 min de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de su tratamiento con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 23 mU/µl de células.

3.3.3. Caracterización de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Los experimentos que se presentan en este apartado se diseñaron para obtener información acerca de la naturaleza del proceso de inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*, operativo en medios carentes de nutrientes nitrogenados, así como de los procesos fisiológicos implicados en dicha inactivación.

3.3.3.1. Efecto de la oscuridad y del DCMU

La Tabla 27 muestra que cuando células de *A. nidulans* que se habían cultivado con nitrato, se transferían a medio sin fuente de nitrógeno en presencia de cloranfenicol, sólo se observaba pérdida de actividad nitrato reductasa si la incubación subsiguiente se realizaba en condiciones de iluminación (las normales para el cultivo de dicho microorganismo). Si, por el contrario, dichas células se incubaban en la oscuridad, manteniendo inalteradas el resto de las condiciones de incubación, la nitrato reductasa celular conservaba los altos niveles de actividad que podían detectarse en el momento de efectuar la transferencia. En la misma Tabla se muestra también que esa alta actividad inicial podía conservarse si la incubación a la luz en medio carente de nitrógeno inorgánico suplementado con cloranfenicol, se realizaba en presencia de DCMU a concentración 10 μM . El DCMU es un inhibidor del flujo fotosintético no cíclico de electrones, que impide el paso de los electrones procedentes del agua al fotosistema I, y cuya eficacia se ha demostrado para el caso de *Anacystis nidulans* (7).

Los resultados que se presentan en la Tabla 27 podrían tomarse, en su conjunto, como indicación de que el poder reductor que se genera durante la fotosíntesis oxigénica de *A. nidulans*, tiene un papel importante en la inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa de esta cianobacteria.

3.3.3.2. Efecto de la limitación en oxígeno

La pérdida de actividad nitrato reductasa observada en medio carente de fuente de nitrógeno y suplementado con cloranfenicol podía disminuirse sensiblemente si la incubación en este medio se realizaba en condiciones

Tabla 27. *Prevención por DCMU u oscuridad de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans en medio carente de fuente de nitrógeno*

Condición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Luz	58
Oscuridad	104
Luz, 10 μ M DCMU	103

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio de cultivo sin nitrógeno suplementado con 50 μ g/ml de clo-ranfenicol y se incubaron en las condiciones que se indica. En el momento de efectuar la transferencia y transcurridos 60 min se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones celulares obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de ser tratadas con tolueno. El 100% de nitrato reductasa correspon-de a 32 mU/ μ l de células.

de microaerobiosis, que se conseguían burbujeando a través de la suspensión celular una mezcla de argon:CO₂ en lugar de la de aire:CO₂ utilizada habitualmente (Fig. 26). Este hecho podría indicar un requerimiento de oxígeno para el proceso de inactivación de la nitrato reductasa que estamos considerando.

3.3.3.3. Efecto del metil viológeno

Los resultados que se llevan expuestos en este apartado 3.3 ponen de manifiesto que la pérdida de actividad nitrato reductasa considerada depende de la generación de poder reductor de origen fotosintético y, probablemente también, de la presencia de oxígeno en las suspensiones celulares. Basada en estas consideraciones, parece adecuada la hipótesis de que dicha inactivación enzimática pudiera estar provocada por algún(os) de los productos resultantes de la reducción fotosintética del oxígeno que, en condiciones fisiológicas, se generan durante la fotosíntesis oxigénica de *Anacystis nidulans*.

El metil viológeno actúa como aceptor de electrones en el sistema fotosintético de *A. nidulans*, catalizando la reducción de oxígeno molecular con electrones suministrados a nivel del aceptor primario del fotosistema I, habiéndose descrito que, en consecuencia, la presencia de este compuesto provoca un aumento de la generación fotosintética (en el lado reductor del fotosistema I) de compuestos de reducción del oxígeno (14). Parecía pues interesante probar el efecto del metil viológeno sobre la inactivación de la nitrato reductasa que estamos estudiando; proceso que, como se ha sugerido, podría estar provocado por alguno de esos radicales del oxígeno. En el experimento que se presenta en la Figura 27 se estudió el efecto del metil viológeno sobre la evolución del nivel celular de nitrato reductasa de células de *A. nidulans* en medio sin fuente de nitrógeno suplementado con cloranfenicol. Los resultados obtenidos indican que la presencia de metil viológeno conducía a una pérdida de actividad aún más drástica que la observada en ausencia de dicho compuesto.

Para comprobar que el metil viológeno no estaba produciendo por sí mismo una inactivación de la nitrato reductasa, sino que su efecto, ampli-

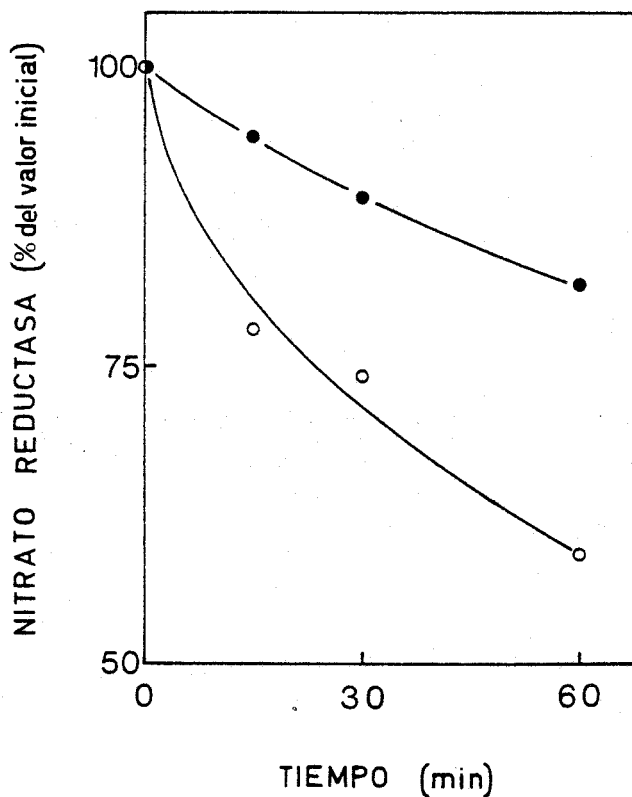


Fig. 26. *Protección por microaerobiosis de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans.* Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno y suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Las suspensiones resultantes se preincubaron durante 15 min en oscuridad a 40°C, siendo burbujeadas con la mezcla gaseosa habitual de los cultivos, aire/ CO_2 95:5 (v/v) (○) ó con una mezcla de argon/ CO_2 , 95:5 (v/v) (●). Tránscurrido este periodo de tiempo, ambas suspensiones se transfirieron a la luz y se incubaron en condiciones de cultivo, excepto que se continuó el burbujeo con las mezclas de gases que se ha indicado. La actividad nitrato reductasa se determinó en células sometidas a tratamiento con tolueno. El 100% de actividad nitrato reductasa corresponde a la medida en el momento de efectuar la transferencia a condiciones de iluminación, que en ambas suspensiones celulares fué de 33 mU/ μl de células.

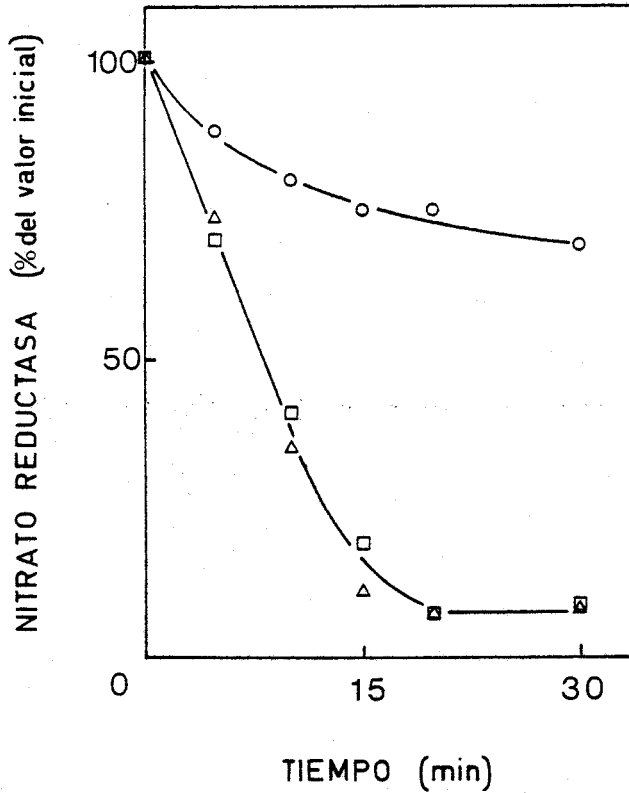


Fig. 27. Efecto del metil viológeno sobre la cinética de inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medios sin nitrógeno combinado suplementados con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y con 0,1 mM de MV (□), 1 mM de MV (△) o sin MV (○), en los cuales se incubaron en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó en alícuotas de las correspondientes suspensiones celulares tratadas con MTA. El 100% de nitrato reductasa corresponde a 23 mU/ μl de células.

ficando la que se observa en medio sin fuente de nitrógeno, es consecuencia de su interacción con el aparato fotosintético, se ha llevado a cabo el experimento que se muestra en el Tabla 28. En este experimento se pone de manifiesto que el DCMU es capaz de anular también la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* registrada en presencia de metil viológeno. Como el DCMU actúa impidiendo la llegada al fotosistema I de los electrones procedentes de la fotólisis del agua, estos resultados indican que para que el metil viológeno pueda ejercer algún efecto negativo sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans* se requiere la operatividad del flujo no cíclico de transporte de electrones fotosintético.

Los resultados expuestos en este apartado permiten interpretar el efecto del metil viológeno, aumentando la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans*, como el de un agente que potencia la generación fotosintética de compuestos de reducción del oxígeno, apoyando la implicación de tales compuestos en el mencionado proceso de inactivación.

3.3.3.4. Efecto del DTE, la cisteína y el peróxido de hidrógeno

Los compuestos de reducción del oxígeno generados fotosintéticamente por *A. nidulans*, que parecen estar implicados en la inactivación de la nitrato reductasa de este organismo, podrían ejercer su efecto sobre el enzima actuando bien como agentes oxidantes o como reductores. Con objeto de obtener información acerca de la naturaleza del proceso de inactivación, parecía pues adecuado ensayar el efecto sobre dicho proceso, de algunos compuestos que están bien caracterizados como causantes de oxidaciones o reducciones de grupos funcionales de una gran variedad de enzimas de muy diversas procedencias.

En la Tabla 29 y en la Figura 28 se presenta el efecto del DTE sobre la inactivación de la nitrato reductasa bajo estudio. En la Tabla 30 se presenta el efecto de la cisteína sobre el mismo proceso de inactivación. Ambos son agentes reductores de grupos disulfuro que pueden contribuir a mantener en estado reducido los grupos sulfidrilo de otras moléculas. Los resultados que se obtuvieron ponen de manifiesto que la presencia de cualquiera de ellos en el medio carente de nitrógeno inorgánico conteniendo

Tabla 28. Protección por DCMU del efecto del metil viológeno sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno

Adición	Nitrato reductasa (% del valor inicial)	
	sin DCMU	con DCMU
Ninguna	43	93
Metil viológeno (1 mM)	2	116

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de fuente de nitrógeno suplementado con 50 µg/ml de cloranfenicol, en presencia o ausencia de DCMU 10 µM y/o metil viológeno 1 mM. En el momento de efectuar la transferencia y después de 60 min de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de haber sido tratadas con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 41 mU/µl de células.

Tabla 29. Efecto de la concentración de DTE sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Ninguna	69
DTE (10 mM)	88
DTE (20 mM)	92
DTE (30 mM)	77

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio carente de nutrientes nitrogenados, suplementado con 50 µg/ml de cloranfenicol y la adición que se indica en cada caso. En el momento de efectuar la transferencia y después de 60 min de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron alícuotas de cada suspensión celular en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa utilizando el tratamiento de permeabilización con MTA. El 100% de actividad corresponde a 4,28 mU/µg de clorofila (equivalentes a unas 34 mU/µl de células).

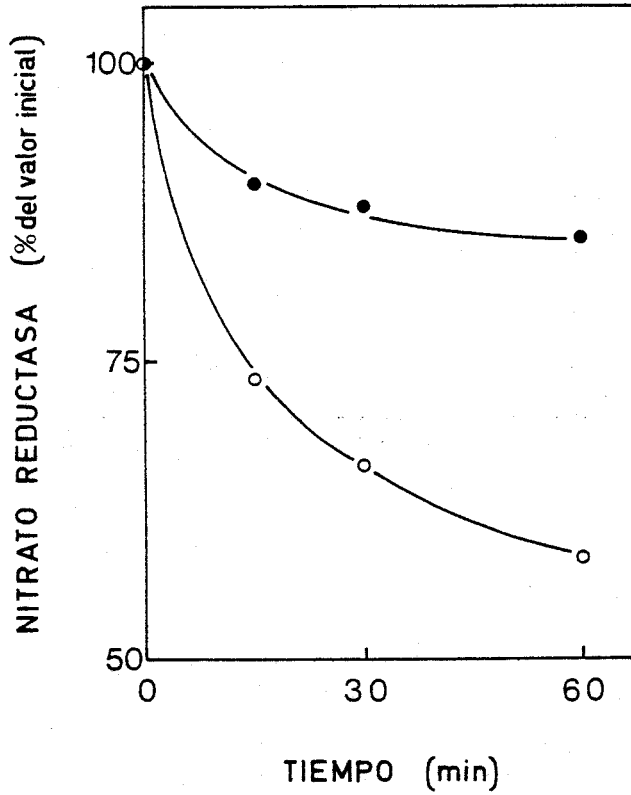


Fig. 28. Efecto del DTE sobre la cinética de inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se incubaron en medio sin fuente de nitrógeno, suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y con (●) o sin (○) DTE 20 mM. La actividad nitrato reductasa se determinó en alícuotas, tratadas con MTA, de las correspondientes suspensiones celulares. El 100% de actividad corresponde a 4,1 mU/ μg de clorofila (equivalentes a unas 33 mU/ μl de células).

Tabla 30. Protección por cisteína de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Ninguna	46
Cisteína (50 mM)	83

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno suplementado con 50 µg/ml de clo-ranfenicol y con o sin L-cisteína a la concentración que se indica. En el momento de efectuar la transferencia y después de 60 min de incubación en condiciones de cultivo se determinó la actividad nitrato reductasa en alícuotas de cada suspensión tratadas con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 44 mU/µl de células.

cloranfenicol, reducía notablemente la pérdida de actividad que característicamente se observa en tales condiciones, obteniéndose para el caso del DTE el máximo efecto protector a concentración 20 mM.

El peróxido de hidrógeno es un producto de la reducción fotosintética del oxígeno molecular en *Anacystis nidulans* (67), que se ha descrito como oxidante de grupos sulfidrilo de una gran variedad de enzimas (43). En la Figura 29 se muestra el efecto de este compuesto sobre la inactivación de la nitrato reductasa de células de *A. nidulans* incubadas en ausencia de nutrientes nitrogenados. El experimento que se recoge en dicha Figura consistía en seguir la evolución del nivel de nitrato reductasa de células que, procedentes de cultivos con nitrato, se transferían a medio sin fuente de nitrógeno conteniendo cloranfenicol, en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la pérdida de actividad enzimática observada era sensiblemente mayor en el medio que contenía peróxido de hidrógeno. También en estas condiciones, el DTE ejercía un notable efecto protector de la actividad nitrato reductasa de *A. nidulans* (Tabla 31).

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno también provocaba una rápida y notable inactivación de la nitrato reductasa de células permeabilizadas de este organismo, incubadas en condiciones que no resultarían inactivantes en ausencia de dicho compuesto (Tabla 32). Como puede observarse, nuevamente en este caso la presencia de DTE reducía notablemente la magnitud de la inactivación provocada por el peróxido de hidrógeno (que en este sistema de células permeabilizadas se protegía además por inclusión de catalasa en la mezcla de incubación).

Los resultados descritos en este apartado 3.3.3.4 indican que agentes conocidos por su carácter reductor (tales como el DTE y la cisteína) protegen a la nitrato reductasa de *A. nidulans* frente a la inactivación de dicho enzima que opera en medios carentes de nutrientes nitrogenados, mientras que el peróxido de hidrógeno (eficaz agente oxidante) favorece dicho proceso de inactivación. Tales resultados apoyan pues la idea de que la pérdida de actividad nitrato reductasa considerada pudiera ser consecuencia de la oxidación de algún(os) de los grupos funcionales de su molécula.

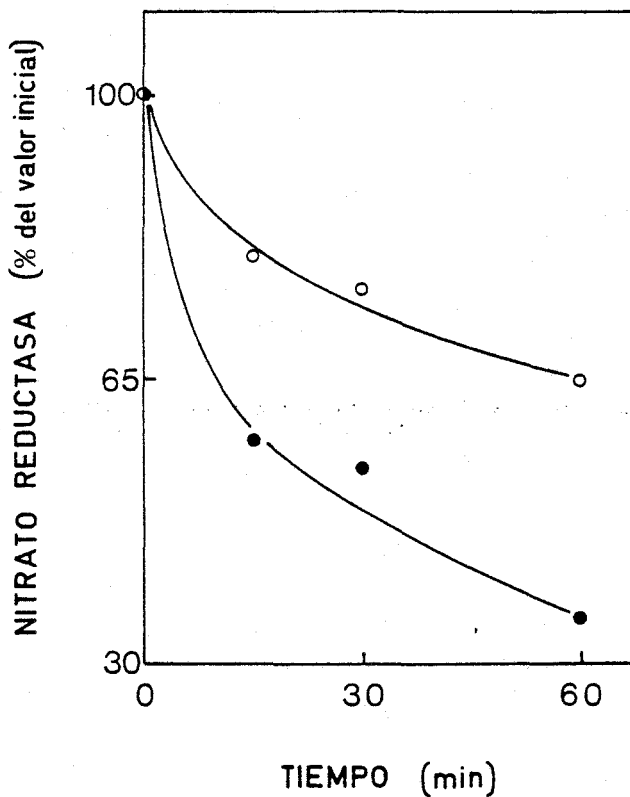


Fig. 29. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la cinética de inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en medio carente de fuente de nitrógeno. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se incubaron en medio carente de fuente de nitrógeno suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y con (●) o sin (○) H_2O_2 1 mM. La actividad nitrato reductasa se determinó en alícuotas de cada suspensión celular una vez permeabilizadas con MTA. El 100% de actividad corresponde a 4,9 mU/ μg de clorofila (equivalentes a unas 39 mU/ μl de células).

Tabla 31. Protección por DTE de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en presencia de peróxido de hidrógeno

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del valor inicial)
Ninguna	66
H_2O_2 (1 mM)	14
H_2O_2 (1 mM) y DTE (20 mM)	67

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y las adiciones indicadas incubándose a continuación en condiciones de cultivo. En el momento de efectuar la transferencia y después de 60 min, se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa, utilizándose MTA para la permeabilización. El 100% de actividad corresponde a 6 mU/ μg de clorofila (equivalentes a unas 48 mU/ μl de células).

Tabla 32. *Inactivación por peróxido de hidrógeno y protección por DTE y catalasa de la nitrato reductasa de células permeabilizadas de A. nidulans*

Adición	Actividad nitrato reductasa (% del control sin H ₂ O ₂)
H ₂ O ₂ (10 mM)	45
H ₂ O ₂ (10 mM) y DTE (10 mM)	76
H ₂ O ₂ (10 mM) y catalasa (10.000 U)	92

Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se sometieron a tratamiento de permeabilización con tolueno y, tras ser lavadas, se utilizaron para preparar 6 suspensiones con 0,25 µl de células por ml de tampón Tris 125 mM/Tricina 125 mM, pH 8,0. Tres de estas suspensiones se suplementaron con las adiciones que se indica, las otras tres se suplementaron de forma análoga pero omitiendo el H₂O₂. Las seis se incubaron durante 15 min en condiciones ambientales, transcurridos los cuales y, tras lavarlas con el mismo tampón, se procedió a la determinación de la actividad nitrato reductasa en las células correspondientes. El 100% de actividad correspondía a 33 mU/µl de células para la suspensión sin suplementar, a 35 mU/µl de células para la suplementada con DTE y a 30 mU/µl de células para la que contenía catalasa.

3.3.4. Reversibilidad de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans*

La inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* que se observa cuando se incuban células de este microorganismo en medios que carecen de fuente de nitrógeno en presencia de cloranfenicol, puede revertirse "in vivo" mediante varios procedimientos que analizaremos en este apartado.

3.3.4.1. Reversión por nitrato o amonio

Como se muestra en la Figura 30, suspensiones de células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, que han perdido parte de su actividad nitrato reductasa por incubación en medio sin fuente de nitrógeno conteniendo cloranfenicol, pueden recuperar parte de la actividad perdida si este medio de incubación se suplementa con nitrato o amonio, aún manteniendo en él la presencia de cloranfenicol. En ambos casos, el porcentaje de recuperación depende del tiempo que hayan permanecido las células en ausencia de nutrientes nitrogenados antes de la adición del nitrato o el amonio; de forma que, pasadas unas tres horas desde el comienzo del tratamiento inactivante, la reversión obtenida era nula ó insignificante.

Los resultados que se presentan en la Figura 31 indican que la adición de nitrato a una suspensión de células de *A. nidulans* cuya actividad nitrato reductasa estaba disminuyendo como consecuencia de su incubación en medio sin nitrógeno combinado (en ausencia de cloranfenicol), conducía al restablecimiento de los altos niveles de actividad que esas suspensiones exhibían en el momento de su transferencia al medio sin fuente de nitrógeno, con independencia de que simultáneamente con el nitrato se añadiese o no cloranfenicol al medio de incubación.

3.3.4.2. Reversión en la oscuridad

Al igual que se ha descrito en el apartado 3.3.4.1. para la adición de nitrato o amonio, la actividad nitrato reductasa perdida en suspensiones celulares de *A. nidulans* que se incuban a la luz en medio sin fuente de nitrógeno conteniendo cloranfenicol, puede recuperarse, al menos par-

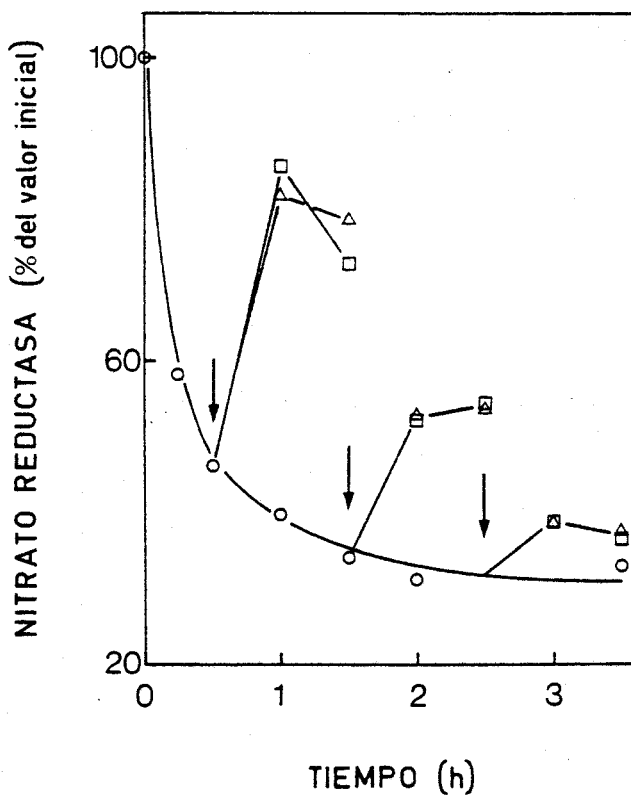


Fig. 30. *Reversibilidad por nitrato o amonio de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans.* Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo (O). A los tiempos que se indica mediante flechas, se tomaron alícuotas a las cuales se añadió NO_3K (Δ) o $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (\square) para alcanzar concentraciones finales de 20 mM y 10 mM , respectivamente, continuándose la incubación en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó después de tratamiento con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 25 $\text{mU}/\mu\text{l}$ de células.

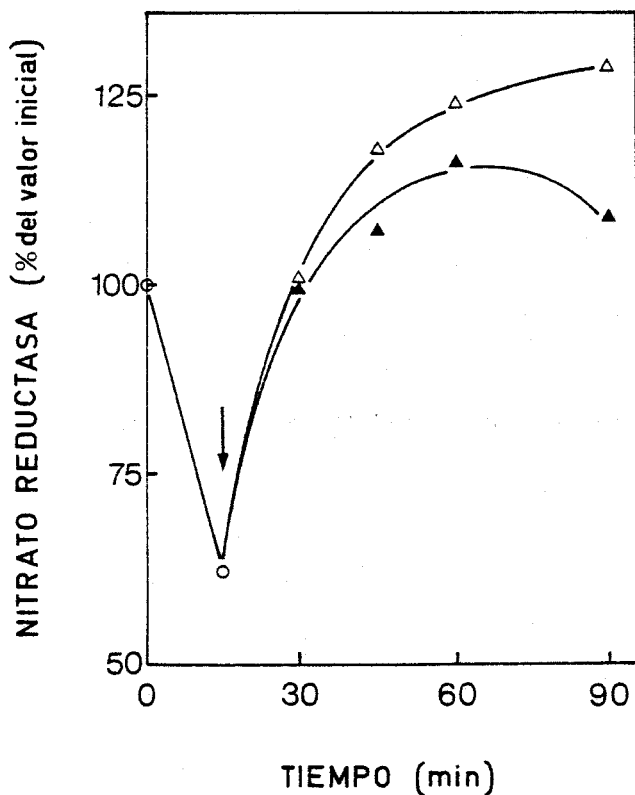


Fig. 31. Reversión por nitrato, en presencia o ausencia de cloranfenicol, de la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno, en el cual se incubaron durante 15 min (O). Transcurrido este tiempo (flecha) la suspensión anterior se dividió en dos mitades que se suplementaron con NO₃K 20 mM (Δ) o con NO₃K 20 mM y 50 µg/ml cloranfenicol (▲), continuándose la incubación en condiciones de cultivo. La actividad nitrato reductasa se determinó después de tratamiento con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 28 mU/µl de células.

cialmente, si tales suspensiones se transfieren a la oscuridad manteniendo constantes el resto de las condiciones de incubación (Fig. 32). Tal como ocurría con la reversión por nitrato o amonio, también la magnitud de la recuperación de actividad enzimática en respuesta a la eliminación de la iluminación depende del tiempo que las suspensiones utilizadas hayan permanecido en la luz antes de ser transferidas a oscuridad; esto es, de cuanto hubiese progresado la inactivación hasta ese momento.

Los resultados que se han expuesto en el apartado 3.3.4 indican la existencia de dos fases sucesivas en el proceso de pérdida de actividad nitrato reductasa observado en células de *A. nidulans* que se incuban en ausencia de nutrientes nitrogenados, en condiciones de inhibición de síntesis de proteínas. La primera fase de la inactivación, reversible por nitrato, amonio u oscuridad, comenzaría a operar inmediatamente después de la transferencia al medio sin nitrógeno combinado. A esta primera fase le seguiría otra forma de inactivación, no reversible mediante los tratamientos indicados, cuya aparición requeriría la permanencia de las células durante algún tiempo en el medio sin nutrientes nitrogenados. Por otra parte, el hecho de que la reversión por nitrato, amonio u oscuridad pueda observarse en presencia de cloranfenicol, pone de manifiesto que dichos agentes actúan a nivel de la propia actividad del enzima, eliminando la posibilidad de que la recuperación de actividad promovida por los mismos pudiera deberse a la aparición de nuevas moléculas de la proteína.

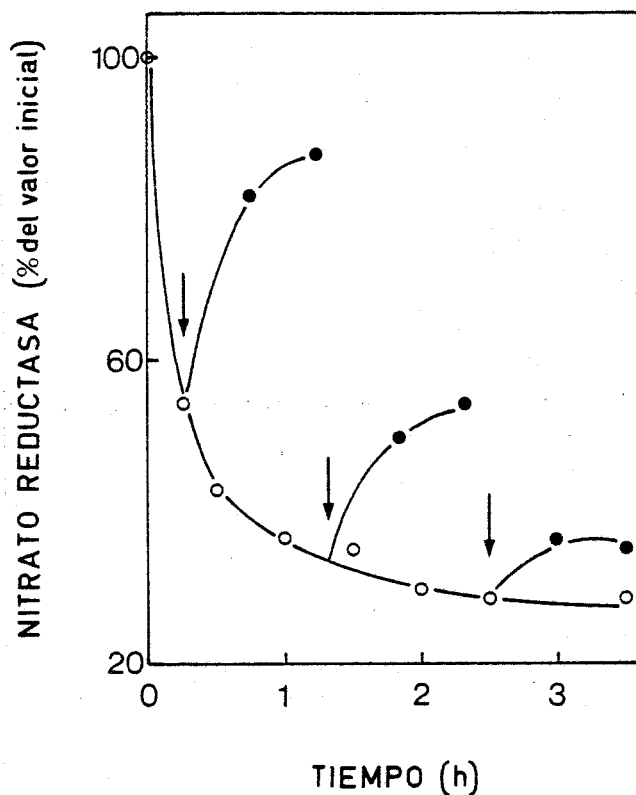


Fig. 32. *Reversión en la oscuridad de la inactivación de la nitrato reductasa de A. nidulans.* Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se transfirieron a medio sin fuente de nitrógeno suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo (O). A los tiempos indicados mediante flechas se tomaron alícuotas de esta suspensión que se transfirieron a la oscuridad (●), manteniéndose inalteradas el resto de las condiciones de incubación. La actividad nitrato reductasa se determinó después de tratamiento con tolueno. El 100% de actividad corresponde a 49 $\text{mU}/\mu\text{l}$ de células.

3.4. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA SINTESIS DE LA NITRITO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

Como se ha mencionado en la Introducción, existían en la literatura algunos precedentes que indicaban que la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo de cianobacterias también ejercía una función reguladora importante sobre el nivel celular de la actividad de reducción de nitrito hasta amonio (29, 60, 64). No obstante, el abordaje experimental de este problema se veía dificultado por la inexistencia de procedimientos idóneos para el ensayo de actividad nitrito reductasa en cianobacterias, ya que sólo se habían desarrollado hasta el momento métodos "in vitro". Como se ha indicado en la sección de Materiales y Métodos, esta modalidad de determinación de actividades enzimáticas no es adecuada para llevar a cabo estudios sistemáticos a nivel fisiológico, menos aún si éstos exigen realizar un número alto de determinaciones, dada la laboriosidad que suele suponer la preparación de extractos celulares, la nada despreciable probabilidad de introducir interferencias con la actuación de los enzimas y, fundamentalmente, la escasa reproducibilidad que a menudo exhiben tales procedimientos.

Un primer acercamiento para desarrollar un procedimiento de estimación "in situ" de la actividad nitrito reductasa de *Anacystis nidulans* consistió en aplicar el procedimiento de ensayo con metil viológeno, descrito en Materiales y Métodos, a células de este organismo permeabilizadas con tolueno, método que, como se ha puesto de manifiesto, rendía excelentes resultados en la determinación de nitrato reductasa. No obstante, en ninguno de los intentos realizados pudo detectarse reducción apreciable de nitrito hasta amonio catalizada por dicho sistema celular.

Posteriores intentos han permitido, sin embargo, el desarrollo de dos procedimientos adecuados, uno "in situ" y otro "in vivo", para la estimación de la actividad nitrito reductasa de *A. nidulans*, algunas de cuyas características más relevantes se discuten a continuación, y que han demostrado ser adecuados para su utilización en el estudio de procesos fisiológicos de regulación. Utilizando uno u otro, o ambos procedimientos, se ha llevado a cabo el estudio del efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre los niveles celulares de la actividad nitrito reductasa de

A. nidulans, que se presenta a continuación.

3.4.1. Puesta a punto de un ensayo "in situ" de actividad nitrito reductasa

Se ha comprobado que la permeabilización de las células mediante tratamiento con el detergente iónico MTA permitía la detección de actividad nitrito reductasa en *A. nidulans*. En la sección de Materiales y Métodos se ha descrito en detalle el procedimiento desarrollado para la estimación de dicha actividad enzimática, habiéndose determinado (Fig.33) la concentración óptima de MTA que debe estar presente en la mezcla de reacción correspondiente y que resultó ser de 750 μg por ml.

Otro factor fundamental para la puesta a punto del ensayo de actividad de reducción de nitrito con metil viológeno reducido como donador de electrones, que exhibían las células de *A. nidulans* permeabilizadas con MTA, era la elección de la concentración inicial de nitrito que debía utilizarse. Esto se debe a que, mientras que concentraciones suficientemente bajas de nitrito representan una limitación para la actuación de la nitrito reductasa, concentraciones saturantes de este ión dificultan la estimación de cambios de su concentración en el medio de ensayo y, en consecuencia, la evaluación de la actividad enzimática. A continuación se describen algunos estudios encaminados a determinar cómo la velocidad de la reacción catalizada por la nitrito reductasa se afecta por la concentración de nitrito presente en el medio de reacción.

En la Figura 34 se ilustra la determinación del valor de la K_m para el nitrito de la nitrito reductasa (estimada con metil viológeno reducido como donador de electrones) en células de *A. nidulans* permeabilizadas con MTA, habiéndose calculado un valor de aproximadamente 120 μM para dicha K_m . Teniendo en cuenta este dato, se diseñó el experimento recogido en la Figura 35, que consistía en estudiar la cinética de desaparición de nitrito, como expresión de la misma actividad enzimática, para varias concentraciones iniciales de nitrito, superiores, en grados diferentes, al valor de K_m encontrado. En esta Figura se recogen también los cambios registrados en la absorbancia a 540 nm (A_{540}), en base a los cuales se deter-

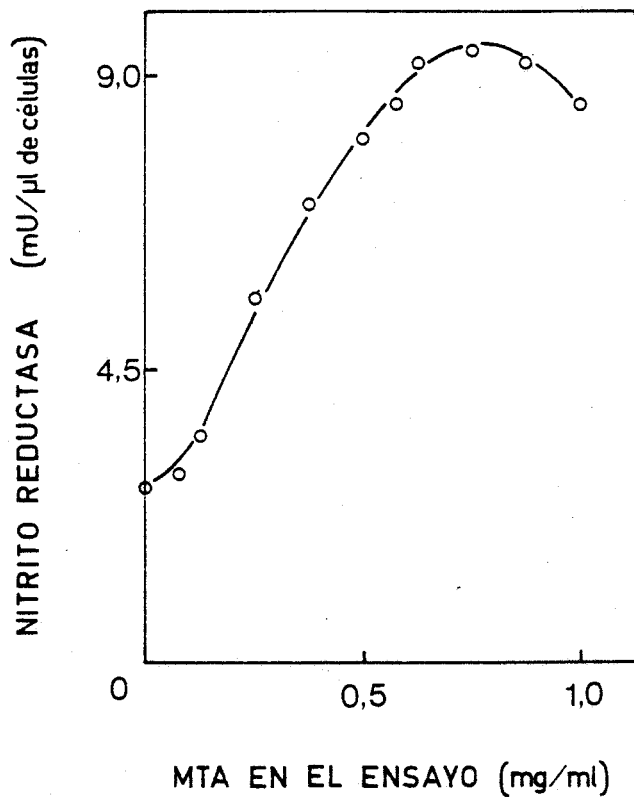


Fig. 33. Efecto de la concentración de MTA sobre el ensayo "in situ" de la actividad nitrito reductasa de *Anacystis nidulans*. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se sometieron al ensayo de la actividad nitrito reductasa según el procedimiento que se describe en Materiales y Métodos, excepto que la mezcla de reacción contenía la concentración de MTA que se indica. La cantidad de células en el ensayo era de 0,8 μ l.

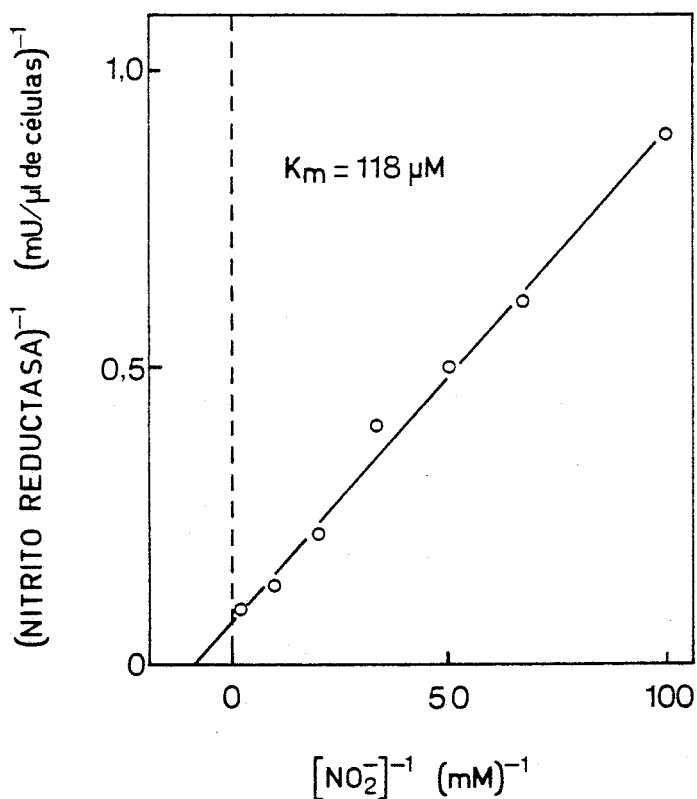
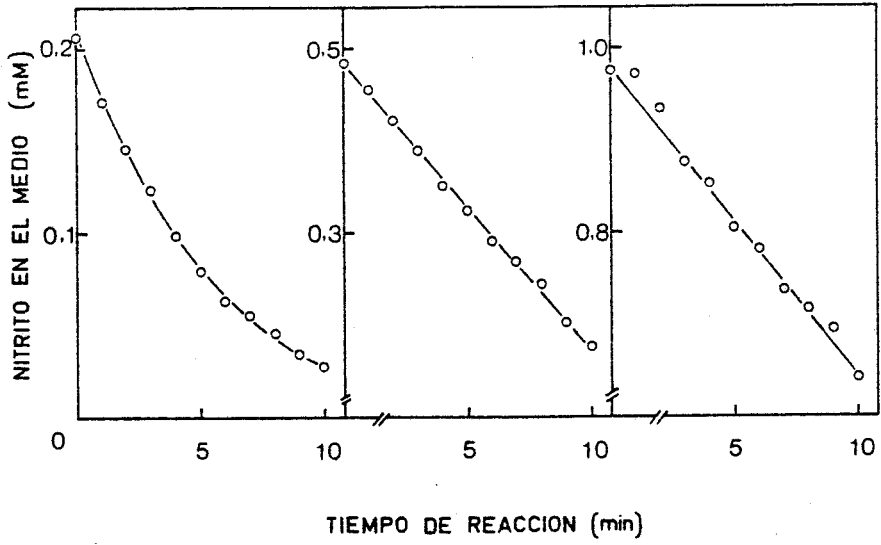


Fig. 34. Determinación de la K_m para el nitrito de la nitrito reductasa de células de *A. nidulans* permeabilizadas con MTA. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, se sometieron a ensayo de la actividad metil viológeno-nitrito reductasa en presencia de las concentraciones iniciales de nitrito que se indica. Por lo demás, se utilizó el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, excepto que la cantidad total de células en el ensayo correspondía a 0,25 μl de células empaquetadas. Para cada concentración de nitrito se realizaron dos estimaciones de actividad en las cuales la reacción se desarrolló durante 5 y 10 min respectivamente, sin que en ningún caso se detectasen diferencias significativas entre ambas.



$[\text{NO}_2^-]$ inicial (mM)	Factor de dilución	A_{540} (t=0)	A_{540} (t=10 min)	ΔA_{540}
0,2	5	0,630	0,086	0,544
0,5	10	0,741	0,273	0,468
1,0	25	0,596	0,393	0,203

Fig. 35. Cinética de transformación de nitrito por células de *A. nidulans* permeabilizadas con MTA, en presencia de distintas concentraciones iniciales del sustrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se sometieron a ensayos de la actividad MV-nitrito reductasa en presencia de las concentraciones iniciales de nitrito que se indica. Por lo demás, se procedió según se describe en Materiales y Métodos excepto que, para cada concentración de nitrito, la reacción se desarrolló durante los tiempos señalados. La cantidad total de células en el ensayo correspondía, en todos los casos, a 3 μl de células empaquetadas. En la tabla adjunta se recogen los valores de A_{540} medidos a los 0 y 10 min de reacción en los sobrenadantes correspondientes (ver Materiales y Métodos), una vez diluídos según se indica.

minaban los cambios en las concentraciones de nitrito (ver Materiales y Métodos), para cada uno de los casos. Como puede observarse, utilizando una concentración inicial de nitrito igual a $500 \mu\text{M}$ (unas 4 veces superior al valor de la K_m) la velocidad de desaparición del anión se mantenía lineal, al menos durante los 10 primeros minutos de reacción, con cambios de A_{540} durante este tiempo de, al menos, 0,4 unidades, lo que permitía establecer de manera fiable las variaciones registradas en la concentración de nitrito presente en el medio.

Este punto era especialmente importante, puesto que la caracterización que estamos describiendo se realizó con células de *A. nidulans* que se habían cultivado con nitrato y presentaban altos niveles de actividad nitrito reductasa, mientras que en los estudios de regulación que se pretendía realizar, se requeriría previsiblemente también estimar la actividad enzimática en células de *Anacystis* que podrían presentar niveles mucho menores de la misma. En consecuencia, se eligió $500 \mu\text{M}$ como concentración inicial de nitrito y 10 min como tiempo de reacción para el ensayo rutinario de nitrito reductasa "in situ".

3.4.2. Puesta a punto de un ensayo "in vivo" de actividad nitrito reductasa

La estimación de una actividad enzimática "in vivo" consiste fundamentalmente en medirla de forma que los valores obtenidos reflejen los de la velocidad de la correspondiente reacción cuando tiene lugar en células intactas, integrada en el conjunto del metabolismo celular. Es decir, no se estima la actividad máxima potencial de un enzima sino la que realmente manifiesta en la célula, donde puede encontrarse limitada por una serie de factores distintos a la propia capacidad catalítica del enzima, tales como, entre otros, condiciones fisicoquímicas distintas de las óptimas teóricas y accesibilidad de sustratos y cofactores.

Como se ha descrito en la Introducción, en *Anacystis nidulans* el ión nitrito se transporta al interior celular mediante sistemas de transporte activo (20, 22), habiéndose propuesto que el ácido nitroso, cuando se encuentra a concentración suficientemente elevada en el medio en que se

hallan suspendidas las células, puede penetrar en este organismo mediante un proceso de difusión (20). En todo momento, la proporción relativa en que ambos tipos de mecanismos de entrada (activo y pasivo) contribuirían a la entrada global de nitrito al interior celular, dependería de las concentraciones de nitrito y de ácido nitroso en el medio externo, a su vez notablemente influenciadas por el pH del mismo (20).

Mediante el uso de la diciclohexilcarbodiimida (DCCD) se ha comprobado que, en *A. nidulans*, el consumo de nitrito a pH 7,2 es un proceso fundamentalmente pasivo, puesto que se inhibe solo débilmente por la presencia de dicho compuesto en el medio (Fig. 36). También se ha indicado en la Introducción que el proceso de consumo de nitrito (seguido por su desaparición del medio externo) que se estudia, incluye tanto la entrada (de nitrito o de ácido nitroso) en la célula, como su posterior reducción hasta amonio catalizada por la nitrito reductasa (20). En consecuencia, a pH 7,2, al cual se ha indicado que la entrada de nitrito ocurre fundamentalmente por difusión pasiva, el factor limitante del proceso global de consumo de este ión debe localizarse en el paso de su reducción intracelular.

No obstante, antes de utilizar el método de estimación del consumo de nitrito a pH 7,2 como ensayo "in vivo" de la actividad nitrito reductasa, se ha procedido a caracterizar la influencia que sobre dicho proceso de consumo ejerce la concentración de nitrito presente en el medio extracelular. En primer lugar se ha estudiado la velocidad de consumo de nitrito por células de *A. nidulans* en función de la concentración de este ión en el medio externo. En la Figura 37 se muestra la correspondiente representación de los inversos de estos dos parámetros que, como puede observarse, indica la existencia de dos sistemas de consumo con diferentes afinidades (valores de K_m aparente del orden de 300 μM y 6 μM respectivamente) y velocidades máximas (del orden de 18 y 2 nmol de nitrito consumido por μl de células por min) que operan para diferentes escalas de concentración externa de nitrito. Como se tratará en la sección de Discusión, este hecho corrobora la idea de la existencia de dos sistemas de entrada de nitrito al interior celular, uno pasivo y otro activo, siendo el prime-

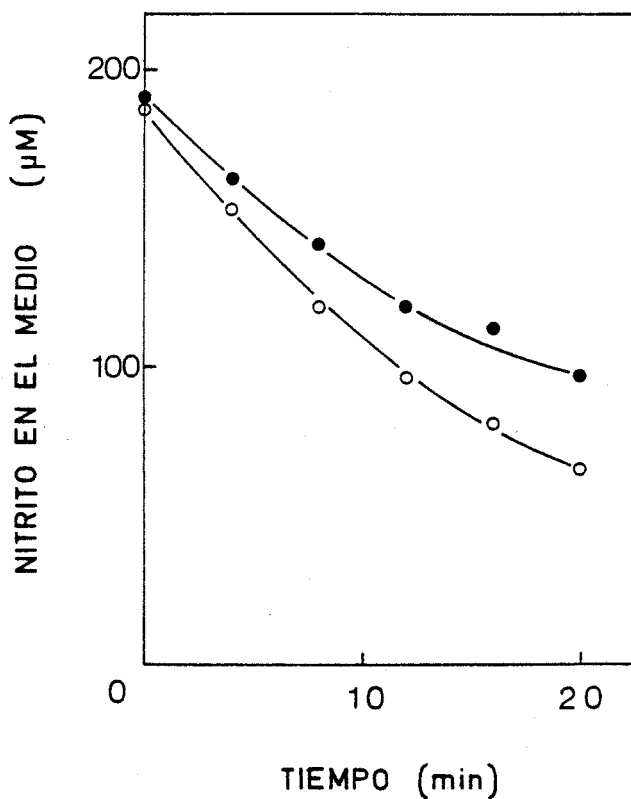


Fig. 36. Efecto del DCCD sobre el consumo de nitrito por células de *A. nidulans* a pH 7,2. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato, tras ser lavadas convenientemente con el mismo tampón, se utilizaron para preparar dos suspensiones (con 1 μ l de células/ml) en tampón MOPS 25 mM, pH 7,2, suplementado (●) o no (○) con DCCD 20 μ M. Después de 15 min de preincubación en las condiciones descritas para el ensayo de consumo de nitrito (ver Materiales y Métodos), éste se inició por adición de suficiente NO_2K para obtener una concentración final de 0,2 mM de nitrito. La suspensión sin DCCD se suplementaba con etanol (0,4%, v/v, concentración final) para igualar la cantidad de etanol añadido junto con el DCCD a la otra suspensión (el DCCD se preparaba en etanol absoluto).

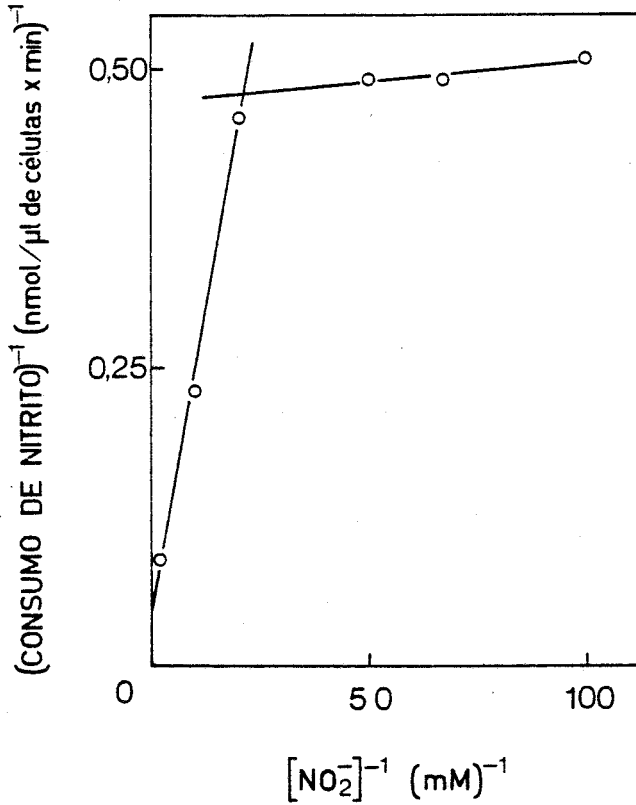


Fig. 37. Efecto de la concentración de nitrito sobre la velocidad de consumo de este ión por células de *A. nidulans*, a pH 7,2. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se ensayaron para el consumo de nitrito en presencia de las concentraciones iniciales de este ión que se indican. Se siguió el procedimiento descrito en Materiales y Métodos excepto que las concentraciones celulares correspondían a 0,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ para las cuatro concentraciones de nitrito inferiores, 0,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ para la quinta y 1 μl cel/ml para la más alta, que los ensayos se iniciaban por adición de las células y que las alícuotas de las suspensiones de ensayo, en las cuales se determinaba la cantidad de nitrito presente, se diluían adecuadamente con arreglo a la concentración inicial de nitrito.

ro de ellos el que, en las condiciones utilizadas (pH 7,2), contribuiría prioritariamente al mantenimiento de las altas velocidades de consumo que se observan cuando se utilizan concentraciones de nitrito superiores a 100 μM .

En la Figura 38 se muestra la cinética de consumo de nitrito por células de *A. nidulans* cuando se utilizaba una concentración inicial de este ión de 200 μM . Puede observarse que, al igual que ocurría con la reacción de reducción catalizada por células permeabilizadas con MTA, el proceso de consumo perdía su linealidad a concentraciones de nitrito inferiores a 100 μM , que en el sistema experimental utilizado se alcanzaban unos 7-10 min después del comienzo del ensayo correspondiente.

Parecen existir pues buenas razones para asumir que la actividad de consumo de nitrito a pH 7,2 representa una buena estimación de la actividad nitrito reductasa exhibida "in vivo" por *A. nidulans*. Desde el punto de vista práctico se han podido establecer, en base a los resultados anteriores, unas condiciones adecuadas para realizar las medidas de consumo, que consistían en desarrollar los ensayos durante periodos de tiempo siempre inferiores a 7 min, y en estimar sus velocidades a partir de las pendientes de las rectas obtenidas al representar los valores de la concentración de nitrito remanente en el medio en función del tiempo de ensayo, determinados al menos en cuatro momentos distintos, entre los minutos 0 y 7, del ensayo.

3.4.3. Regulación de la síntesis de la nitrito reductasa en función del nutriente nitrogenado

En este apartado se recoge una serie de experimentos diseñados para estudiar cómo la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo de *A. nidulans* influye sobre los niveles de nitrito reductasa que presenta este microorganismo, así como para obtener alguna información acerca de los mecanismos implicados en tales procesos de regulación. En todo momento se han utilizado para la medida de la actividad nitrito reductasa en estos experimentos, los procedimientos de ensayo "in situ" e "in vivo" definidos en los apartados anteriores.

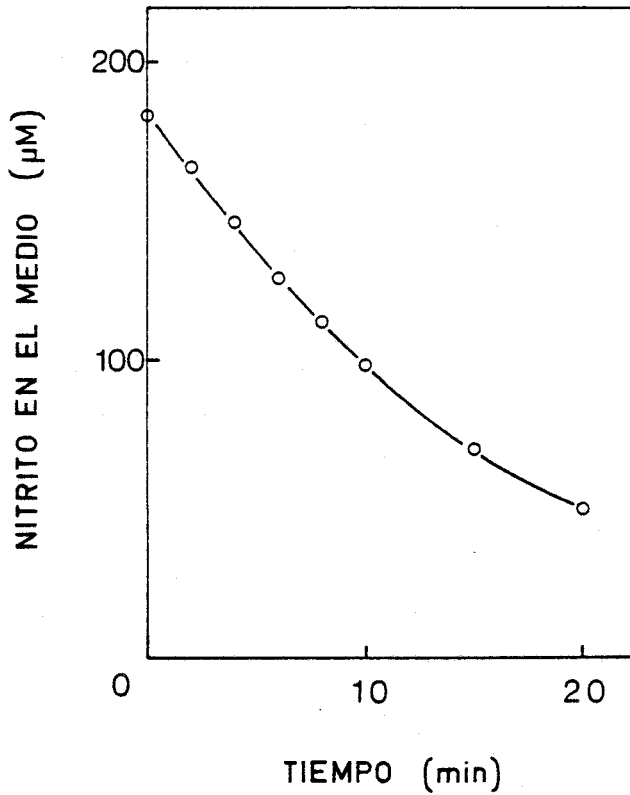


Fig. 38. Cinética del consumo de nitrito por células de *A. nidulans* a pH 7,2. Células de *A. nidulans* cultivadas con nitrato se sometieron a ensayo de consumo de nitrito según se describe en Materiales y Métodos. A los tiempos que se indica se determinó la concentración de nitrito remanente en alícuotas del medio de ensayo.

3.4.3.1. Niveles celulares de nitrito reductasa determinados por diferentes nutrientes nitrogenados.

Cuando *A. nidulans* se cultiva con amonio como fuente de nitrógeno presenta niveles prácticamente indetectables de actividad nitrito reductasa. Cuando estas células cultivadas con amonio se transfieren a medios conteniendo nitrato, se produce un desarrollo de actividad nitrito reductasa que alcanza su valor máximo, correspondiente a unas 40 mU por mg de proteína celular, 4 a 5 h después de haberse efectuado la transferencia (Fig. 39). Puede constatarse además la correspondencia de las estimaciones de la actividad nitrito reductasa realizadas por los procedimientos "in situ" e "in vivo", observándose un desarrollo paralelo de actividad con ambos métodos, y valores de ésta totalmente similares.

El experimento cuyos resultados se ilustran en la Figura 40 pone de manifiesto que un desarrollo de actividad nitrito reductasa, similar al observado al transferir células cultivadas con amonio a medio con nitrato, tiene lugar cuando la transferencia se realiza a medio que contiene nitrito como único nutriente nitrogenado.

En la Tabla 33 se recogen las actividades obtenidas como resultado de la incubación de células de *A. nidulans* cultivadas con amonio en medios conteniendo distintas concentraciones de nitrito. Este experimento permitió la elección de una concentración adecuada de este ión (1-2,5 mM) para los estudios de desarrollo de actividad nitrito reductasa en medios que lo contuviesen. La concentración de nitrito es un factor crítico, puesto que debe ser suficiente para asegurar que el nitrito no se consuma totalmente durante los experimentos y, a la vez, suficientemente baja para no llegar a afectar negativamente al metabolismo de *A. nidulans*. En este contexto, se ha descrito que el nitrito ejerce efectos negativos a varios niveles del metabolismo de diferentes organismos (45,76). Aunque a 0,5 mM de concentración inicial de nitrito, los niveles de actividad nitrito reductasa detectados después de 3 horas eran tan altos como los encontrados en medios con concentraciones de nitrito de hasta 2,5 mM, (Tabla 33), el nitrito remanente en el medio, pasado este tiempo, era inferior a 10 μ M, por lo que tal concentración inicial de nitrito no es adecuada para

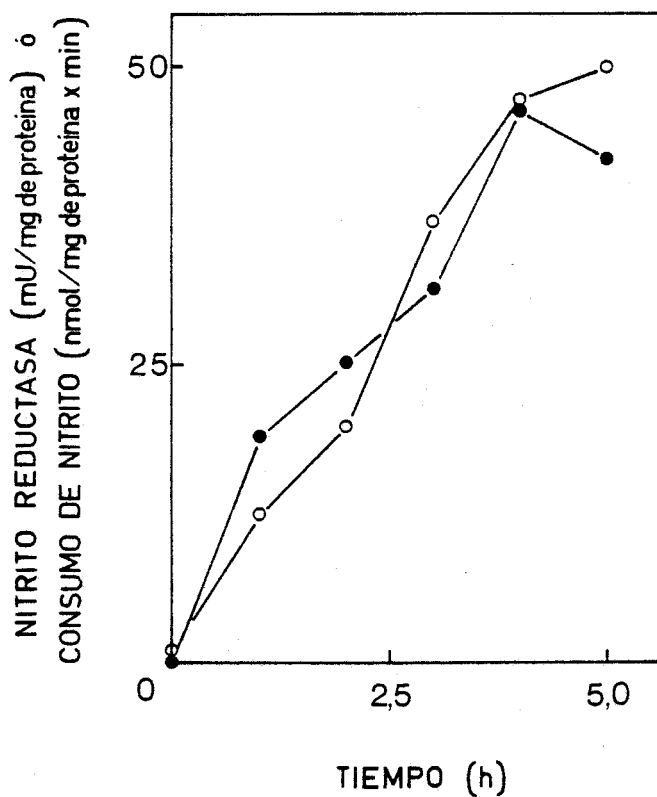


Fig. 39. Desarrollo de la actividad nitrito reductasa de *A. nidulans*, estimada mediante ensayos "in situ" e "in vivo", en respuesta a la transferencia de amonio a nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, con una concentración correspondiente a 1 μ l cel/ml, a medio con nitrato en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de la suspensión resultante en las cuales se determinó la actividad de consumo de nitrito a pH 7,2 (●) y, tras concentrar adecuadamente las células, la actividad nitrito reductasa en células permeabilizadas con MTA (○).

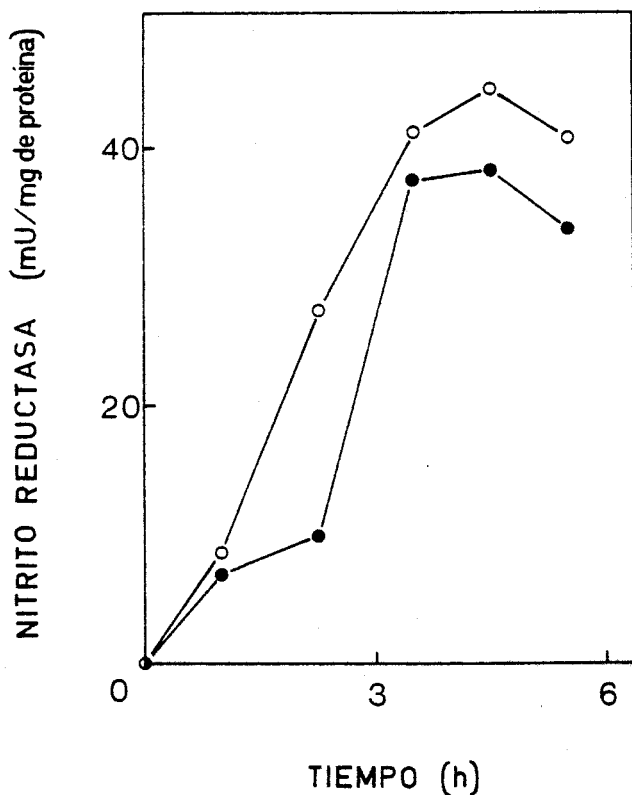


Fig. 40. Cinética del desarrollo de la actividad nitrito reductasa (ensayo "in situ") en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato o nitrito. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración correspondiente a 0,5 μ l de células por ml de medio, a medios conteniendo 2,5 mM de NO₃K (○) ó de NO₂K (●). Las suspensiones resultantes se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de cada una de ellas en las cuales se determinó la actividad nitrito reductasa (permeabilizando con MTA) y la cantidad de proteína.

Tabla 33. Efecto de la concentración de nitrito sobre el nivel de actividad nitrito reductasa (ensayo "in situ") de *Anacystis nidulans*

NO ₂ K (mM)	Actividad nitrito reductasa (mU/mg de proteína)
0,5	33
1,0	28
2,5	28
5,0	21

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 0,25 μ l de células por ml, a medio de cultivo conteniendo la concentración de NO₂K que se indica. En el momento de efectuar la transferencia y tras 3,25 h de incubación en condiciones de cultivo, se tomaron muestras de las suspensiones correspondientes en las cuales, tras concentrar adecuadamente las células, se determinó la actividad nitrito reductasa y la cantidad de proteína. A tiempo cero la actividad nitrito reductasa era indetectable.

Tabla 34. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad nitrito reductasa (ensayo "in situ") de *A. nidulans*

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrito reductasa (mU/mg de proteína)
NO ₃ K (2,5 mM)	34,1
NO ₂ K (2,5 mM)	16,0
Ninguna	11,0
SO ₄ (NH ₄) ₂ (1,25 mM)	0,2
NO ₃ K (2,5 mM) y SO ₄ (NH ₄) ₂ (1,25 mM)	1,7
NO ₂ K (2,5 mM) y SO ₄ (NH ₄) ₂ (1,25 mM)	0,5

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 0,5 μ l de células /ml, a medio conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica. Tras 4 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron muestras de cada una de las suspensiones obtenidas en las cuales, después de concentrar adecuadamente las células por filtración, se estimó la actividad nitrito reductasa y la cantidad de proteína. Los datos presentados corresponden a la media de los obtenidos en dos experimentos independientes.

Tabla 35. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad nitrito reductasa (ensayo "in vivo") de *A. nidulans*

Fuente de nitrógeno	Consumo de nitrito (nmol/ μ g de clorofila x min)
NO_3K (1 mM)	1,76
NO_2K (1 mM)	1,66
Ninguna	0,75
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	0,21
NO_3K (1 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	0,27
NO_2K (1 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	0,28

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de 0,25 μ l de células/ml, a medio conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica. Tras 5 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de cada suspensión las cuales, tras concentrar adecuadamente las células mediante filtración, se sometieron a ensayo de consumo de nitrito según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Las cantidades de clorofila se de terminaron en las correspondientes mezclas de ensayo una vez finali zados éstos.

experimentos de duración superior a las 3 horas.

En las Tablas 34 y 35 se muestra que cuando células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transferían a medios conteniendo nitrato, nitrito, amonio, nitrato y amonio o nitrito y amonio sólo se detectaban valores altos de actividad nitrito reductasa (determinada "in situ" o "in vivo") después de un periodo de incubación en alguno de los medios libres de amonio, especialmente en aquellos suplementados con nitrato o nitrito. La transferencia a medios libres de fuente de nitrógeno también conducía a un aumento, aunque de menor magnitud, de la actividad nitrito reductasa.

De los resultados presentados puede deducirse que la presencia de amonio en el medio de cultivo, aún a concentraciones tan bajas como 0,1 mM (Tabla 36), impide el desarrollo de actividad nitrito reductasa de células de *A. nidulans*, sin que la presencia simultánea de nitrato o nitrito en tales medios parezca afectar esta situación. En medios que no contienen amonio, aún en aquellos carentes de cualquier forma combinada de nitrógeno, pueden alcanzarse altas actividades de este enzima. Por otra parte, tanto el nitrito como el nitrato, y en mayor proporción este último, parecen influir positivamente sobre el nivel celular de actividad nitrito reductasa.

El experimento cuyos resultados se recogen en la Tabla 37 muestra el resultado de la incubación de células, cultivadas con amonio, en medios con distintas fuentes de nitrógeno, durante un periodo de tiempo moderado (2 h), con objeto de disminuir la incidencia que, en las diferencias de velocidad de consumo entre células incubadas con nitrato (o nitrito) y sin fuente de nitrógeno, pudiese tener la deficiencia en nitrógeno provocada por esta última situación. En tales condiciones se encontró que la actividad nitrito reductasa de células incubadas durante 2 h en nitrato era del orden del doble que la detectada en aquellas incubadas, durante el mismo tiempo, en ausencia de fuente de nitrógeno. Esta diferencia (aunque menor que la encontrada después de 5 h de incubación) apoya la sugerencia de que el nitrato (y el nitrito) actúen positivamente, a algún nivel, sobre los niveles celulares de nitrito reductasa de *A. nidulans*.

Tabla 36. Efecto de la concentración de amonio sobre la actividad nitrito reductasa (ensayo "in vivo") de *A. nidulans*

Fuente de nitrógeno	Consumo de nitrito (nmol/ μ g de clorofila x min)
Ninguna	0,77
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,1 mM)	0,15
" (0,2 mM)	0,16
" (0,5 mM)	0,17
" (1,0 mM)	0,15
" (5,0 mM)	0,15

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una densidad de 0,1 μ l de células/ml, a medio de cultivo con la concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ que se indica, o sin ninguna fuente de nitrógeno. Tras 3 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron alícuotas de cada una de las suspensiones obtenidas que, tras concentrarse, se utilizaron para ensayar la capacidad de consumo de nitrito. Las cantidades de clorofila se estimaron en las correspondientes mezclas de ensayo una vez finalizados éstos.

Tabla 37. *Actividad nitrito reductasa (ensayo "in vivo") de células de A. nidulans incubadas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno*

Fuente de nitrógeno	Consumo de nitrito (nmol/ μ g de clorofila x min)
NO_3K (20 mM)	1,38
Ninguna	0,70
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (10 mM)	0,00

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una densidad de 1 μ l de células/ml, a medio conteniendo la fuente de nitrógeno que se indica. Tras 2 h de incubación en condiciones de cultivo se tomaron muestras de cada una de las suspensiones obtenidas, las cuales, tras concentrar las células, se sometieron a ensayo de consumo de nitrito. Las cantidades de clorofila se determinaron en las correspondientes mezclas de ensayo una vez finalizados éstos.

3.4.3.2. Efecto de la rifampicina y el cloranfenicol sobre el desarrollo de actividad nitrito reductasa

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, la incubación de células de *A. nidulans* cultivadas con amonio en medio con nitrato como fuente de nitrógeno, conducía al desarrollo de altos niveles de esa actividad enzimática. En la Tabla 38 se ilustra el hecho de que cuando la incubación se realiza en medio con nitrato pero conteniendo rifampicina (inhibidor de la síntesis de ARNm) o cloranfenicol (inhibidor de la traducción de ARNm) no se produce desarrollo de actividad nitrito reductasa. Al igual que se ha concluido para el caso del enzima nitrato reductasa de este mismo organismo (Apartado 3.2.1), tales resultados argumentan en favor de que el efecto negativo que sobre los niveles de nitrito reductasa ejerce la presencia de amonio en el medio de cultivo, opere a nivel de la síntesis de nuevas moléculas del enzima. Este compuesto puede, en consecuencia, ser considerado como un represor nutricional de ambos enzimas.

3.4.3.3. Liberación por MSX del efecto represor del amonio sobre la síntesis de nitrito reductasa

En la Tabla 39 se muestran los cambios operados en el nivel celular de actividad nitrito reductasa (estimada "in situ") cuando células de *A. nidulans*, cultivadas con amonio, se incuban en medios conteniendo diferentes compuestos de nitrógeno inorgánico y MSX (inactivador de la glutamina sintetasa y, en consecuencia, inhibidor de la incorporación del amonio en compuestos orgánicos celulares). En la Tabla 40 y en la Figura 41 se ilustran los cambios operados en los niveles celulares de nitrito reductasa estimados "in vivo". Puede observarse que la presencia de MSX conduce en todos los casos al desarrollo de actividad nitrito reductasa. No obstante, el nivel del enzima es notablemente superior en aquellos medios suplementados con nitrato o con nitrito. Puede deducirse, por tanto, que el MSX es capaz de actuar anulando el efecto represor del amonio sobre la nitrito reductasa. A la vez se confirma el efecto positivo ejercido por el nitrato y el nitrito sobre la magnitud de esta actividad enzimática, que ya se observaba en células no tratadas con MSX, y que en

Tabla 38. Efecto de la rifampicina y del cloranfenicol sobre la aparición de la actividad nitrito reductasa (ensayo "in situ") en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato

Adiciones	Nitrito reductasa (mU/mg de proteína)	
	1 h	2 h
Ninguna	9,8	18,5
Rifampicina (50 µg/ml)	0,0	0,0
Cloranfenicol (50 µg/ml)	0,0	0,0

Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una densidad de 0,5 µl de células/ml, a medio con nitrato y las adiciones que se indican. Tras 1 y 2 h de incubación en condiciones de cultivo se determinaron, después de haber concentrado adecuadamente la células, la actividad nitrito reductasa y la cantidad de proteína.

Tabla 39. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrito reductasa (ensayo "in situ") de células de *A. nidulans* tratadas con MSX

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrito reductasa (mU/mg de proteína)
NO_3K (2,5 mM)	44,9
NO_2K (2,5 mM)	54,3
Ninguna	4,7
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (1,25 mM)	13,6
NO_3K (2,5 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (1,25 mM)	48,9
NO_2K (2,5 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (1,25 mM)	37,0

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las que se han descrito en la tabla 34, excepto que todos los medios de cultivo utilizados contenían, además de la fuente de nitrógeno que se indica, MSX a la concentración final de 1 μM . Igualmente, los datos que se presentan corresponden a la media de los obtenidos en dos experimentos diferentes.

Tabla 40. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno sobre la actividad nitrito reductasa (ensayo "in vivo") de células de *A. nidulans* tratadas con MSX

Fuente de nitrógeno	Consumo de nitrito (nmol/ μ g de clorofila x min)
NO_3K (1 mM)	3,10
NO_2K (1 mM)	1,97
Ninguna	0,21
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	1,21
NO_3K (1 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	3,22
NO_2K (1 mM) y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (0,5 mM)	3,30

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en la Tabla 35, excepto que todos los medios de cultivo utilizados contenían, además de la fuente de nitrógeno que se indica, MSX a la concentración final de 1 μM .

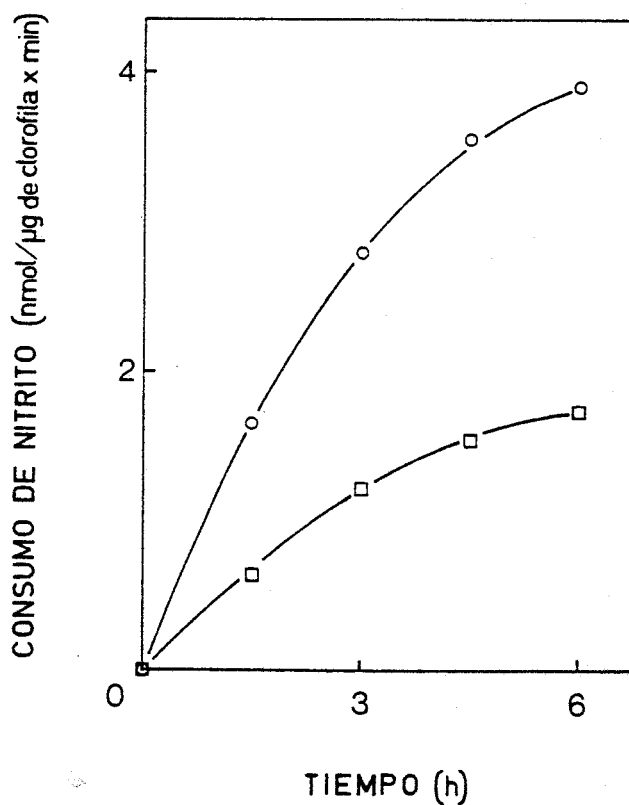


Fig. 41. Adquisición de la capacidad de consumo de nitrato por células de *A. nidulans* tratadas con MSX. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron, a una concentración de $0,5 \mu\text{l}$ de células/ml, a medio con nitrato (O) ó amonio (□) conteniendo MSX $1 \mu\text{M}$, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de cada una de las suspensiones obtenidas, en las cuales se midió, tras concentrar adecuadamente, la capacidad de consumo de nitrato y la cantidad de clorofila. La actividad GS (transferasa), medida en células permeabilizadas con tolueno, fué de unas $18 \text{ mU}/\mu\text{g}$ de clorofila en el momento de efectuar la transferencia y de $4,5 \text{ mU}/\mu\text{g}$ de clorofila al final del periodo de incubación (6 h).

presencia de este compuesto se manifiesta incluso en medios que simultáneamente contienen amonio.

3.4.3.4. Evidencia de que el efecto positivo del nitrato no requiere su previa transformación en nitrito

Cuando el nitrato penetra en el interior de las células de *A. nidulans* no se acumula como tal, sino que se reduce inmediatamente por los correspondientes enzimas, a nitrito y amonio (20,22). El efecto positivo ejercido por el nitrato sobre el nivel celular de nitrito reductasa podría, pues, deberse a una actuación directa del propio ión nitrato como tal, o bien ser indirecto, requiriéndose su previa transformación en nitrito, cuya presencia también afecta positivamente al desarrollo de dicha actividad enzimática. Para discernir entre estas dos alternativas parecía interesante ensayar el efecto del nitrato sobre los niveles de nitrito reductasa en células de *A. nidulans* carentes de actividad nitrato reductasa (enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito), en las cuales el nitrato, una vez en el interior de la célula, no puede generar nitrito.

La nitrato reductasa de *A. nidulans* es una molibdo proteína en la que el molibdeno juega un papel catalítico esencial (9). Se ha descrito también que cuando en el medio de cultivo para este microorganismo se sustituye el molibdeno por su análogo estructural volframio, este último metal parece incorporarse, en lugar del molibdeno, en la nitrato reductasa, pero dando lugar a la constitución de moléculas inactivas de este enzima (9).

Para los experimentos que se describen a continuación era necesario asegurar que las células tratadas con volframio se mostrarían incapaces de desarrollar actividad nitrato reductasa, lo que exigía eliminar totalmente cualquier resto de molibdeno que pudiese encontrarse acumulado en su interior. En este sentido, se puso de manifiesto que al transferir células de *A. nidulans* cultivadas en medio con amonio y molibdeno a medio con nitrato y volframio, se producía un desarrollo considerable de actividad nitrato reductasa, aunque a ese medio con nitrato no se le añadiese molibdeno.

Para obviar este problema y disponer de células de *A. nidulans* carentes de nitrato reductasa se procedía como se describe a continuación. Las células se cultivaban durante múltiples generaciones con amonio como fuente de nitrógeno, en medio A carente de molibdeno añadido. Con antelación a los correspondientes experimentos, células de esta línea se transferían a medio con nitrato, igualmente carente de molibdeno añadido, y suplementado con volframio. Como muestra la Figura 42, la incubación de las células en tales condiciones se veía acompañada de un aumento de la actividad específica nitrato reductasa, que alcanzaba su nivel máximo unas 2 h después de haberse efectuado la transferencia, momento a partir del cual se observaba disminuir, principalmente como consecuencia del aumento de la proteína total del cultivo que, a partir de entonces, no se compensaba con aumentos de la actividad total nitrato reductasa. El que específicamente se detuviese el aumento de actividad nitrato reductasa, se tomaba como indicación del agotamiento de cualquier reserva de molibdeno.

Tras varias horas de incubación en el medio con nitrato y volframio (libre de molibdeno), la suspensión celular se suplementaba con amonio (el amonio se añadía en forma sólida, en vez de transferir las células a un nuevo medio conteniendo este nutriente, obviándose así la posibilidad de introducir en el sistema nuevas trazas de molibdeno que, accidentalmente, pudiesen estar presentes en ese nuevo medio) y se incubaba nuevamente hasta que se conseguían los bajos niveles de nitrato reductasa característicos de células cultivadas con este nutriente nitrogenado.

Las células así procesadas eran especialmente adecuadas para el propósito de ensayar el efecto del nitrato sobre la aparición de actividad nitrito reductasa en ausencia de nitrato reductasa.

Al transferir tales células a medio con nitrato conteniendo molibdeno ó volframio, sólo se observaba desarrollo de actividad en el primero de los casos pero no en el segundo (Fig. 43A). A pesar de esta absoluta diferencia en lo que a presencia de nitrato reductasa se refiere, en ambos casos se registraba un desarrollo notable de actividad nitrito reductasa (estimada mediante ensayo "in situ"), tanto en el medio con molib-

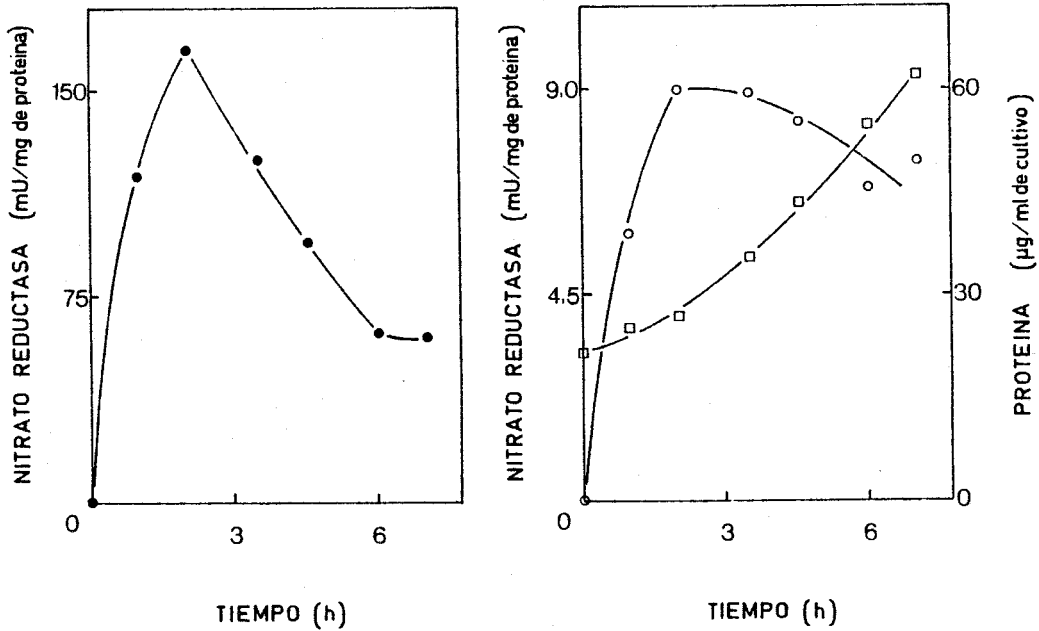


Fig. 42. Evolución de la actividad nitrato reductasa (ensayo "in situ") en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato en presencia de wolframio. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio y en ausencia de molibdeno añadido se transfirieron (a una concentración de 0,5 µl de células por ml) a medio con nitrato carente de molibdeno añadido y suplementado con 1 mM de WO_4Na_2 en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indican en la figura, se tomaron alícuotas de la suspensión celular, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa, permeabilizando con MTA (○) y la cantidad de proteína (□). (●) representa la actividad específica nitrato reductasa deducida de los valores anteriores.

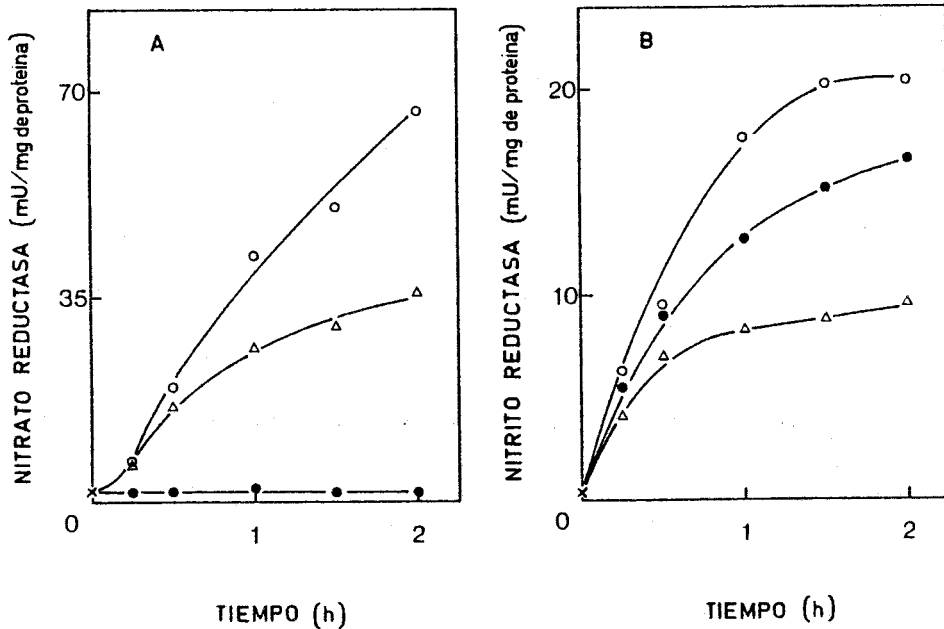


Fig. 43. Efecto del wolframio sobre el desarrollo de las actividades nitrato reductasa (A) y nitrito reductasa (B) de *A. nidulans* en medio con nitrato. Una suspensión de células de *A. nidulans*, incubada durante 8,5 h en las condiciones que se describen en la Figura 42, se suplementó con la cantidad de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ necesaria para obtener una concentración final de 10 mM, continuándose, durante 20 h más, la incubación en condiciones de cultivo. Transcurrido este tiempo, el cultivo resultante, que poseía 5,5 μl de células por ml, se utilizó para preparar tres nuevas suspensiones (con una concentración celular de 0,5 μl de células por ml) en medio con nitrato (O), con nitrato pero sin molibdeno añadido y suplementado con 1 mM de WO_4Na_2 (●) y sin fuente de nitrógeno (Δ), respectivamente. A los tiempos que se indica se tomaron alícuotas de cada una de ellas, en las cuales se determinó la actividad específica nitrato reductasa (A) y nitrito reductasa (ensayo "in situ") (B). Aunque no se ilustra, una cuarta suspensión en medio sin nitrógeno ni molibdeno y con 1 mM de WO_4Na_2 , que no desarrollaba ninguna nitrato reductasa, se comportaba de forma análoga a la tercera de las suspensiones anteriores en cuanto al desarrollo de nitrito reductasa.

deno, como en el que contenía volframio, alcanzándose valores notablemente superiores a los que se detectaban en los correspondientes controles en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 43 B).

En la Figura 44 se presentan los resultados obtenidos en un experimento análogo al anteriormente descrito, en el que la actividad nitrito reductasa se estimó mediante el ensayo "in vivo", midiendo la velocidad de consumo de nitrito a pH 7,2, según se ha descrito anteriormente. Tales resultados pusieron de manifiesto que los niveles de nitrito reductasa, determinados según este procedimiento, alcanzados en presencia de nitrato (Fig. 44 A) eran idénticos para células de *A. nidulans* que presentaban alta actividad nitrato reductasa o sólo niveles basales del enzima (Fig. 44 B).

3.4.3.5. Síntesis simultánea de los enzimas del sistema reductor del nitrato en *A. nidulans*

En apartados anteriores se ha puesto de manifiesto que la transferencia de células de *A. nidulans* cultivadas con amonio a medio conteniendo nitrato como único nutriente nitrogenado, conduce a un aumento notable de las velocidades de síntesis de los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. Cuando se comparan las cinéticas de los desarrollos de ambas actividades (Fig. 45), se observa un notable paralelismo entre ellas, sin que pueda detectarse ningún desplazamiento relativo de los momentos en que cada una de las actividades comienza a aumentar después de la transferencia al medio con nitrato.

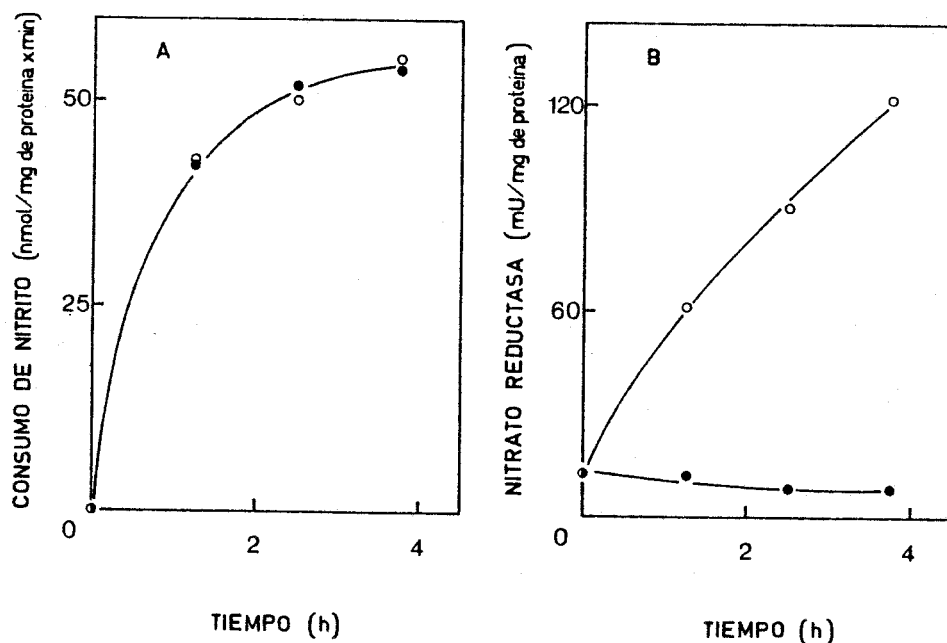


Fig. 44. Aparición de actividad de consumo de nitrito en células de *A. nidulans* tratadas con wolframio. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se sometieron al mismo tratamiento experimental que se ha descrito en las figuras 42 y 43. Las células resultantes del tratamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se utilizaron en este caso para preparar suspensiones (con una concentración correspondiente a $0,5 \mu\text{l}$ de células por ml) en medio con nitrato (○) y con nitrato pero sin molibdeno añadido y suplementado con 1 mM de WO_4Na_2 (●), que se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de cada una de ellas en las cuales se determinó la capacidad de consumo de nitrito (tras concentrar adecuadamente), la actividad nitrato reductasa (permeabilizando con MTA) y la cantidad de proteína.

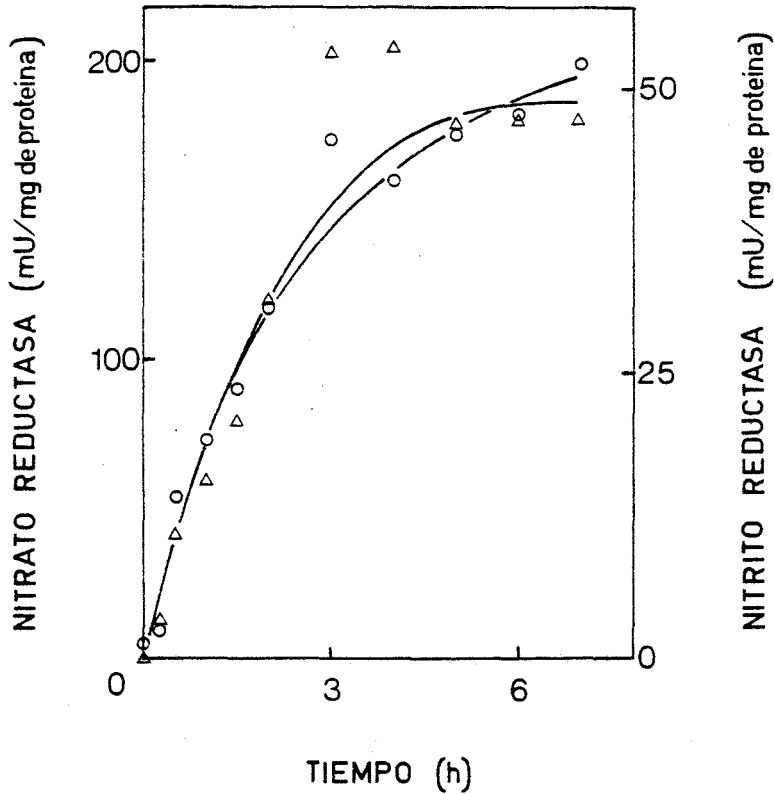


Fig. 45. Desarrollo simultáneo de las actividades nitrito reductasa y nitrato reductasa de células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato. Células de *A. nidulans* cultivadas con amonio se transfirieron (con una densidad correspondiente a $0,7 \mu\text{l/ml}$) a medio con nitrato, en el cual se incubaron en condiciones de cultivo. A los tiempos que se indica se tomaron muestras de la suspensión obtenida, en las cuales se determinó la actividad nitrato reductasa después de permeabilizar con tolueno (O), y la actividad nitrito reductasa después de concentrar adecuadamente las células (Δ).

4. DISCUSSION

En este trabajo se han presentado una serie de estudios encaminados a aclarar la influencia que la naturaleza de la fuente de nitrógeno posee sobre el establecimiento de los niveles celulares de las actividades enzimáticas implicadas en la reducción asimilatoria del nitrato hasta amonio en cianobacterias. El nitrato y el amonio son los compuestos nitrogenados más frecuentemente utilizados por este grupo de microorganismos (91, 109):

Previamente a su incorporación en compuestos orgánicos, el nitrato debe reducirse hasta amonio, con el consiguiente gasto de equivalentes de poder reductor de potencial redox altamente negativo (a nivel de ferredoxina). Por ello, la asimilación de nutrientes nitrogenados en los cuales el nitrógeno se encuentre en el mismo estado redox que el amonio (-3), es más rentable desde el punto de vista energético que la asimilación de compuestos en los cuales el nitrógeno se encuentre en un estado más oxidado, como es el caso del nitrato (+5).

La capacidad de las cianobacterias para utilizar aminoácidos (compuestos en los cuales el nitrógeno posee el mismo estado redox que en el amonio, el más negativo con que este elemento se presenta en compuestos biológicos) como fuente de nitrógeno para su crecimiento es muy restringida (63, 109). Este hecho, junto a la ventaja que en cuanto a competencia en ambientes naturales con otros grupos de organismos puede suponer la facultad de asimilar compuestos oxidados de nitrógeno, hace que la capacidad de asimilación de nitrato aparezca como un proceso metabólico sumamente útil para los organismos que, tal como las cianobacterias, la poseen.

La rentabilidad energética que supone asimilar el nitrógeno en forma de amonio, junto con la utilidad de poder tomarlo como nitrato en condiciones de ausencia de amonio, hablan claramente de la necesidad celular de poseer mecanismos reguladores mediante los cuales se seleccione la fuente de nitrógeno a utilizar, de entre las disponibles en el medio donde se encuentre. Aunque no todas las cianobacterias son capaces de utilizar el dinitrógeno como fuente de nitrógeno para su crecimiento, a aquellas que sí pueden hacerlo pueden aplicárseles, respecto al N_2 y al

amonio, consideraciones análogas a las expuestas para el caso del nitrato y el amonio. Las cianobacterias capaces de utilizar N_2 también asimilan el nitrato con preferencia sobre el dinitrógeno puesto que, aunque en este último el nitrógeno se encuentre en un estado más reducido (0) que en el nitrato (+5), su reducción hasta amonio requiere ATP y generalmente también el desarrollo de células especializadas (heterocistos), todo lo cual supone que la utilización de N_2 como fuente de nitrógeno implique un gasto de energía considerablemente superior al requerido para la utilización del nitrato. El trabajo que se presenta se ha centrado en caracterizar, para diferentes estirpes de cianobacterias, las situaciones nutricionales nitrogenadas que permiten el desarrollo del sistema enzimático para la asimilación del nitrato, así como en el estudio de algunos aspectos de los mecanismos reguladores implicados.

En el apartado 3.1 de la sección de Resultados se han presentado una serie de experimentos que han conducido a la evaluación de los niveles celulares de actividad nitrato reductasa (primer enzima de la ruta de reducción asimilatoria del nitrato) establecidos en función de la naturaleza del nutriente nitrogenado, en varias cianobacterias. Estas incluyen dos estirpes que no asimilan dinitrógeno (*Anacystis nidulans* y *Synechocystis* sp. 6714) y tres que sí pueden utilizar N_2 como fuente de nitrógeno (*Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp. 6719 y *Anabaena* sp. 7119). Los resultados obtenidos, junto con algunos otros presentados en el apartado 3.2 (actividades encontradas en células tratadas con MSX), ponen de manifiesto que existen dos tipos de patrones de regulación de los niveles celulares de nitrato reductasa en función de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo de las cianobacterias estudiadas.

El primero de tales mecanismos opera en las estirpes no fijadoras de dinitrógeno y parece responder fundamentalmente a la presencia o ausencia de amonio en el medio donde se encuentra la cianobacteria en cuestión, detectándose sólo actividades nitrato reductasa basales en cultivos con este nutriente. En este sistema el nitrato parece jugar un papel positivo secundario, a nivel cuantitativo, en el establecimiento de tales niveles de actividad. En el segundo mecanismo de regulación, que ope

ra en las estirpes fijadoras, la presencia o ausencia tanto de amonio como de nitrato parecen ser factores determinantes del establecimiento de niveles altos o basales de nitrato reductasa, detectándose altas actividades de este enzima solo en cultivos que contienen nitrato y carecen de amonio.

En todos los casos estudiados, el desarrollo de actividad nitrato reductasa, observado al transferir células de la cianobacteria en cuestión desde condiciones que determinan niveles basales hasta aquellas que permiten el establecimiento de altas actividades enzimáticas, resulta totalmente anulado por inhibidores de síntesis de proteínas a nivel de traducción (como es el cloranfenicol). Este hecho habla en favor de que, en este grupo de microorganismos, la naturaleza de la fuente de nitrógeno regula el nivel celular de nitrato reductasa controlando el proceso de síntesis de esta proteína.

En *A. nidulans* se ha comprobado que dicho desarrollo de nitrato reductasa se inhibe también completamente por rifampicina, inhibidor de síntesis de ARNm, sin que en presencia de este compuesto pueda observarse aparición alguna de actividad enzimática, ni siquiera en los primeros momentos después de efectuada la transferencia a las condiciones permisivas de síntesis. Este hecho, junto con el periodo de retardo existente entre la transferencia a condiciones permisivas y el aumento de actividad nitrato reductasa argumentan en favor de que, al menos en este organismo, el papel regulador de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis del enzima se ejerza a nivel de síntesis de los ARNm correspondientes. No obstante, los datos actuales no permiten descartar totalmente la posibilidad alternativa de que, en condiciones que no permiten expresión de la actividad nitrato reductasa, pudiese tener lugar síntesis considerable de los ARNm que codifican para dicho enzima. En este caso, el efecto inmediato de la rifampicina obligaría a asumir una vida media de tales ARNm inferior al tiempo empleado en realizar la transferencia desde el medio con amonio al que contiene únicamente nitrato o ninguna fuente de nitrógeno combinado.

De las consideraciones anteriores se puede deducir para el amonio un papel como represor nutricional de la nitrato reductasa de las cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno que se han estudiado. En cuanto a las cianobacterias fijadoras de N_2 estudiadas, puede deducirse que el nitrato ejerce un papel regulador positivo sobre la síntesis de las correspondientes nitrato reductasas, pudiendo considerarse en consecuencia como un inductor nutricional de tales enzimas. Los datos disponibles no permiten, sin embargo, establecer de forma inequívoca un efecto regulador para el amonio sobre la síntesis de nitrato reductasas en las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno.

La dificultad principal estriba en no poder discernir si el nitrato penetra, en cantidad apreciable, en las células de estos microorganismos, cuando se encuentra presente en un medio de cultivo que contiene amonio simultáneamente, en la relación de concentraciones utilizadas en los experimentos. Esta situación nitrogenada determina la expresión de niveles sólo basales de nitrato reductasa. Podría proponerse pues un papel de represor nutricional para el amonio si éste permitiese la entrada en las células del nitrato (inductor nutricional). En cambio, los datos serían irrelevantes en cuanto a la atribución de un efecto regulador de la síntesis de nitrato reductasa para el amonio, si éste determinase la exclusión de dicho inductor del interior del microorganismo considerado. A este respecto conviene considerar que, aunque se ha comprobado (experimentos correspondientes a la Fig. 15, Tabla 15 y referencia 21) que el amonio, a concentración 1 mM, es capaz de inhibir totalmente el consumo de nitrato cuando éste último se encuentra presente a concentración de 0,25-0,3 mM en el medio de cultivo de cualquiera de las cianobacterias fijadoras utilizadas, no se dispone de evidencia que permita descartar la existencia de consumo de nitrato, cuando ambos iones se encuentran en la relación de concentraciones utilizada en los estudios de regulación de los niveles de nitrato reductasa en estas cianobacterias (20 mM de nitrato y 4-5 mM de amonio).

La eliminación por MSX del efecto negativo del amonio, en condiciones de presencia simultánea de nitrato, sobre los niveles de nitrato re-

ductasa de estos microorganismos tampoco permite establecer un papel del amonio como regulador negativo de la síntesis del enzima. En efecto, estos resultados podrían explicarse tanto asumiendo que dicho efecto regulador tendría que estar mediado por productos de la metablización del amonio a través de la glutamina sintetasa, como suponiendo que no existe efecto negativo del amonio o sus derivados a nivel de síntesis, sino que el amonio sólo interfiere con el establecimiento de altos niveles de nitrato reductasa inhibiendo la entrada en la célula del inductor nitrato, que caso de producirse estaría también mediada por los mismos productos de la metabolización del amonio a través de la glutamina sintetasa (21).

En resumen, parece claro que el amonio actúa como represor nutricional de la nitrato reductasa de las cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno estudiadas y que el nitrato lo hace como inductor nutricional de las fijadoras, sin que se disponga de evidencia que permita establecer inequívocamente un papel del amonio como regulador negativo de la síntesis de dicho enzima en este grupo de cianobacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico.

Estas conclusiones están de acuerdo con los datos existentes en la literatura, que describen la necesidad de la presencia de nitrato en el medio extracelular, para que puedan alcanzarse altos niveles de nitrato reductasa en las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno *Anabaena* ATCC 33047 (24) y *Anabaena cylindrica* (32, 64). Aunque para la unicelular no fijadora *Agmenellum quadruplicatum* se ha descrito también inducción por nitrato, además de represión por amonio (92), tales aseveraciones se realizaron únicamente en base a que en presencia de amonio no se detectaba actividad celular nitrato reductasa, la cual se desarrollaba cuando dicha cianobacteria se transfería a medio de cultivo conteniendo nitrato como único nutriente nitrogenado. Esta circunstancia no permite discernir si existe un efecto represor del amonio, un efecto inductor del nitrato, o ambos, sobre la nitrato reductasa de este microorganismo.

Todos los estudios que se han realizado hasta ahora están de acuerdo con los dos modelos propuestos para la regulación de la síntesis de

nitrato reductasas de cianobacterias, que atribuyen un papel positivo al nitrato en el caso de las fijadoras de nitrógeno, y la función reguladora fundamental, como represor nutricional, al amonio en el caso de las no fijadoras. Estas diferencias en regulación podrían tener un interesante sentido fisiológico para los microorganismos correspondientes. En aquellas cianobacterias incapaces de fijar el nitrógeno atmosférico, la doble regulación, por amonio y nitrato, del sistema de asimilación de nitrato podría resultar redundante puesto que no pueden crecer en ausencia de compuestos de nitrógeno combinado. Además, la síntesis de dicho sistema de asimilación de nitrato en ausencia de sustrato no supondría un desperdicio energético, puesto que al microorganismo en cuestión le sería útil estar dispuesto para asimilar cualquier nutriente que pudiera servirle para satisfacer su demanda de nitrógeno. Por otra parte, en las cianobacterias capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico, la síntesis del sistema de asimilación de nitrato en condiciones de ausencia de nitrógeno combinado podría suponer, sin embargo, un gasto poco útil de energía, puesto que, en estas condiciones, el microorganismo dispone del sistema necesario para utilizar el N_2 como fuente de nitrógeno para su crecimiento. De cualquier forma, sería sumamente interesante llevar a cabo estudios similares a los aquí expuestos, referentes a la influencia de la fuente de nitrógeno sobre los niveles celulares de nitrato reductasa, en más estirpes de cianobacterias, para poder generalizar la validez de los dos modelos de regulación propuestos.

Este distinto patrón de regulación de la síntesis de nitrato reductasa entre cianobacterias fijadoras y no fijadoras de N_2 parece poder extenderse a otros procariotas distintos de las cianobacterias. Así, mientras se ha descrito que en la bacteria no fijadora de N_2 *Acinetobacter calcoaceticus* la nitrato reductasa es reprimible por amonio (106), en las fijadoras *Azotobacter chroococcum* (30) y *Rhodospseudomonas* (11) se requiere la presencia de nitrato para que pueda tener lugar síntesis de nitrato reductasa.

Como se ha discutido anteriormente, en las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno estudiadas, no puede discernirse si el efecto negativo

del amonio debe localizarse a nivel de síntesis de la nitrato reductasa o a nivel de interferencia con la entrada a la célula del inductor nitrato. En el último de estos dos supuestos, los posibles mecanismos mediante los cuales el amonio podría ejercer dicha interferencia se encuentran discutidos en la referencia 20. A continuación se exponen una serie de consideraciones, basadas en resultados presentados en este trabajo, referentes a los posibles mecanismos mediante los que el amonio podría ejercer su papel de represor nutricional en los casos en que actuase de esta forma (cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno y quizás también en las fijadoras).

En todas las cianobacterias utilizadas en este trabajo, a excepción de *Synechocystis* sp. 6714, se ha comprobado que el efecto represor del amonio sobre la nitrato reductasa se elimina por tratamiento con MSX. En *Synechocystis* no se ha podido establecer este punto, puesto que la glutamina sintetasa de este microorganismo se mostraba especialmente resistente a inactivación por las bajas concentraciones de MSX utilizadas con el resto de las cianobacterias. Esto dificultó el estudio del efecto del MSX sobre los niveles celulares de la nitrato reductasa de *Synechocystis*, puesto que la experiencia previa de trabajo con MSX indicaba que la actividad de las nitrato reductasas de cianobacterias en general se afectaba negativamente por tratamiento de las células con concentraciones altas de dicho compuesto. El que el MSX evite el efecto represor del amonio sobre las nitrato reductasas parece indicar con bastante firmeza que la operatividad de dicho ^{efecto} represor requiere la metabolización del amonio a través de la glutamina sintetasa que, como ya se ha mencionado, es componente esencial de la ruta prioritaria de asimilación de este compuesto en cianobacterias (24). La asimilación de amonio a través de otras vías secundarias, cuya importancia cuantitativa podría (aunque no está comprobado) aumentar en células tratadas con MSX, no tiene ningún efecto negativo sobre la síntesis de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Este punto parece quedar claro por el hecho (mostrado en el apartado 3.2.2 de Resultados) de que el amonio, probablemente metabolizándose a través de esas rutas alternativas, estimule la síntesis de nitrato reductasa en células de este microorganismo tratadas con MSX.

Existen varios modelos hipotéticos para tratar de explicar el mecanismo mediante el cual el amonio, metabolizándose a través de GS, podría desarrollar dicha acción represora. En la consideración de los mismos vamos a limitarnos al caso de *A. nidulans*, que es la cianobacteria para la cual se han presentado estudios que pueden proporcionar información al respecto. En primer lugar, podría suponerse que la represión nutricional por amonio de la nitrato reductasa pudiese estar mediado por algún metabolito nitrogenado derivado directamente de la acción catalítica de la glutamina sintetasa, o estrechamente relacionado con los productos de la misma. A este respecto es interesante señalar que se ha propuesto a la glutamina (producto de la reacción catalizada por la GS) como el verdadero regulador negativo, mediador de la represión nutricional por amonio, de la nitrato reductasa del hongo *Neurospora crassa* (28, 74). Sin embargo, en el apartado 3.2. de la sección de Resultados se ha presentado evidencia de que la adición de glutamina a células de *A. nidulans* que poseían sólo niveles basales de actividad glutamina sintetasa, no interferiría negativamente con el desarrollo de nitrato reductasa, como cabría esperarse si fuese cierta la suposición anterior. Dada esta falta de efecto represor de la glutamina, la atribución del papel de regulador negativo a este aminoácido, o a cualquier otro metabolito estrechamente relacionado con él, podría mantenerse asumiendo que el mecanismo de represión requiriese, además del mencionado metabolito, la participación de la glutamina sintetasa activa. Este requerimiento podría satisfacerse suponiendo a las propias moléculas de glutamina sintetasa una actuación directa interaccionando con el genoma y provocando la verdadera represión de los genes que codifican para la nitrato reductasa. La actuación a nivel genético de la glutamina sintetasa como mediadora de la represión nutricional de la nitrato reductasa provocada por amonio se ha propuesto para el caso de *Neurospora crassa* (19), aunque posteriores estudios parecen poner en entredicho la necesidad de la participación, en el mecanismo de represión, de las propias moléculas de glutamina sintetasa interaccionando con el genoma de este organismo, y favorecen que el papel ejercido por este enzima esté conectado con su actividad catalítica (74). Alter-

nativamente, en *A. nidulans* podría suceder, como se ha propuesto para *Neurospora* (56), que sin que la glutamina sintetasa jugase un papel directo en la represión de la nitrato reductasa, se requiriese su actividad catalítica para generar un pool intracelular específico de glutamina, que estuviese directa o indirectamente implicado en producir dicha represión, y que no pudiera generarse suministrando el aminoácido exógenamente.

Una segunda hipótesis que permitiría explicar el papel represor del amonio sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans* y su eliminación por MSX sería que en la generación del verdadero correpresor participase otra enzima distinto de la glutamina sintetasa, cuya actividad catalítica fuese igualmente inhibible por MSX. La γ -glutamylcisteína sintetasa es una enzima que cataliza la formación del dipéptido γ -glutamylcisteína a partir de los aminoácidos constituyentes, dipeptido que es el precursor biosintético del glutatión (γ -glutamylcisteinilglicina). Al igual que ocurre en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa, el primer paso en la formación de γ -glutamylcisteína catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa consiste en la fosforilación del glutamato para formar γ -glutamylfosfato, habiéndose descrito que el MSX es capaz de entrar en el sitio activo de cualquiera de estas enzimas y ser igualmente fosforilado, rindiendo un compuesto que queda unido a ellos de manera irreversible, impidiendo que se puedan efectuar nuevos ciclos catalíticos (59). Todos los datos que se han presentado referentes al efecto del amonio como represor nutricional de la nitrato reductasa de *A. nidulans* podrían pues explicarse asumiendo que el correpresor genético es el metabolito producto de la actuación de la γ -glutamylcisteína sintetasa o derivado de éste.

Como se ha expuesto en el apartado 3.2.3 de la sección de Resultados, esta interpretación se ve apoyada por la fuerte inhibición del desarrollo de actividad nitrato reductasa a que da lugar la cisteína (uno de los sustratos de la γ -glutamylcisteína sintetasa) en células de *A. nidulans* transferidas de amonio a nitrato. En el mismo apartado se discute que también sería válida para explicar el efecto negativo del glutatión (que se

sintetiza a partir de γ -glutamilcisteína) sobre el mismo proceso de desarrollo de nitrato reductasa.

Aunque no se tienen noticias hasta el momento de la existencia de otros enzimas inhibibles por MSX, cualquiera con estas características que participase en el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias, podría considerarse como posiblemente implicado en la síntesis del correpresor de la nitrato reductasa.

Por último, con respecto al efecto negativo del amonio sobre los niveles celulares de nitrato reductasa en cianobacterias, es interesante constatar que existen otros procesos en estos organismos también regulados negativamente por amonio, con efectos que se eliminan por tratamiento de las células correspondientes con MSX. Entre esos procesos cabe mencionar el desarrollo de heterocistos y la síntesis de nitrogenasa, que van a capacitar a la cianobacteria en cuestión para utilizar el N_2 como fuente de nitrógeno para el crecimiento (94), o el transporte de nitrato (21). Podría considerarse la existencia de un sistema general de regulación, común a todos estos procesos implicados en el metabolismo asimilatorio del nitrógeno en cianobacterias. Posteriores estudios en este sentido, que deben incluir el abordaje genético de los sistemas de asimilación de los diferentes compuestos nitrogenados, podrían permitirnos un conocimiento más preciso del mecanismo mediante el cual operaría en estos organismos ese sistema de regulación de la asimilación del nitrógeno, uno de los elementos fundamentales de la materia viva.

Se ha estudiado la estabilidad de la actividad nitrato reductasa en células de *Anacystis nidulans* sometidas a condiciones de inhibición de síntesis de proteínas, las cuales permiten seguir la evolución de la actividad preexistente, sin las interferencias que introduciría en el sistema la aparición de nuevas moléculas del enzima. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que la estabilidad de la nitrato reductasa de *Anacystis* es alta en medios conteniendo nitrato, nitrito o amonio y mucho menor en aquellos carentes de fuente de nitrógeno.

Aunque a tiempos cortos después de la transferencia desde amonio hasta nitrato o medio sin fuente de nitrógeno las diferencias son poco acusadas, el nivel de nitrato reductasa en *Anacystis* era considerablemente mayor en las células procedentes de amonio que se cultivaban con nitrato, que en aquellas que se mantenían en ausencia de nutrientes nitrogenados. También se ha puesto de manifiesto que en células del mismo organismo en las que el amonio no puede manifestar su efecto represor de la nitrato reductasa (células tratadas con MSX), el nivel de esta actividad enzimática era mayor en presencia de nitrato y/o amonio que en ausencia de fuente de nitrógeno (Tabla 11). En el apartado 3.3.1 de Resultados se ha mostrado que cuando células cultivadas con nitrato se incubaban en ausencia de fuente de nitrógeno e inhibidores de síntesis de proteínas, se producía una pérdida inicial de actividad, que se recuperaba posteriormente en el plazo de unos 30 min después de efectuada la transferencia al medio sin fuente de nitrógeno (Figura 24). Sin embargo, y aunque no se presentan resultados a este respecto, se ha comprobado que la continuación de la incubación en este medio conduce al establecimiento de niveles de actividad nitrato reductasa considerablemente inferiores a los encontrados en células cultivadas con nitrato y mantenidas en medio con este compuesto nitrogenado.

De acuerdo con estas consideraciones, parece acertado asumir que las diferencias en estabilidad de la nitrato reductasa podrían, junto con las encontradas en la velocidad de síntesis del enzima, jugar un papel importante en el establecimiento del nivel celular de actividad característico de las diferentes situaciones nutricionales nitrogenadas que se han venido considerando. También en el caso del hongo *Neurospora crassa* se ha descrito que el nitrato juega un papel protector de la nitrato reductasa ya sintetizada, conduciendo a una estabilización del enzima que contribuye a determinar niveles más altos de actividad en los micelios de este organismo incubados en presencia de nitrato, que en aquellos mantenidos en ausencia de fuente de nitrógeno (89, 95).

El estudio de los efectos protectores de nitrato, nitrito y amonio sobre la actividad nitrato reductasa de *Anacystis nidulans* ha puesto de

manifiesto que los de los dos primeros se mantienen prácticamente inalterados en condiciones que excluyen la metabolización del amonio a través de la glutamina sintetasa (células tratadas con MSX), mientras que el de este último compuesto se mantiene sólo parcialmente en dichas condiciones. Tales hechos podrían indicar que la protección por nitrato y nitrito es ejercida por estos mismos compuestos, sin que se requiera su previa transformación en amonio. Al efecto protector manifestado por el amonio podría contribuir, además de este ión por sí mismo, algún otro compuesto nitrogenado resultante de su metabolización a través de la glutamina sintetasa. Favoreciendo el papel protector directo del nitrato se encuentra también el hecho de la protección de la nitrato reductasa ejercida por su análogo estructural cianato. Por último, la baja concentración intracelular de nitrito que se supone existe en células que están reduciendo nitrato (31) argumenta en contra de que el efecto protector del nitrato requiriese su previa transformación en nitrito. Parece más bien que, como en el caso del cianato, el papel protector del nitrito podría residir en la analogía estructural entre esta molécula y la de nitrato.

Se han presentado también algunos estudios encaminados a caracterizar el proceso de inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* que tiene lugar en ausencia de nutrientes nitrogenados. Se ha probado que la operatividad de dicha inactivación requiere la incubación de las células en condiciones de iluminación, hecho éste que podría sugerir un requerimiento de poder reductor, de ATP o de ambos componentes del poder asimilatorio generado fotosintéticamente. No obstante, la protección total de la inactivación por DCMU -inhibidor del flujo fotosintético no cíclico de electrones, que a las concentraciones utilizadas permite generación de ATP por fotofosforilación cíclica (7) - sugiere que sea el poder reductor fotosintético el componente necesario para que tenga lugar la pérdida de actividad nitrato reductasa.

Se ha puesto también de manifiesto que la limitación en la cantidad de oxígeno presente en las suspensiones de *A. nidulans*, provoca una notable disminución del grado de inactivación de la nitrato reductasa,

que de otro modo se observa en medios carentes de nutrientes nitrogenados. El que no se obtenga una protección total de la actividad enzimática en este caso podría deberse a que el método utilizado para disminuir la concentración de oxígeno en las suspensiones celulares (burbujeo con argón: CO_2) no resulte en la eliminación total del oxígeno, gas que, por otra parte, está siendo producido continuamente por las células como resultado de su actividad fotosintética.

Conjuntamente, los requerimientos por poder reductor generado fotosintéticamente y por oxígeno, para que tenga lugar la inactivación de la nitrato reductasa, permiten sugerir que algun(os) de los productos resultantes de la reducción fotosintética del oxígeno, que se generan en *A. nidulans*, podrían estar implicados en provocar dicho proceso de inactivación.

Uno de los productos de la reducción fotosintética del oxígeno es el peróxido de hidrógeno (67). Se ha comprobado (apartado 3.3.3 de Resultados) que el peróxido de hidrógeno estimula la pérdida de actividad nitrato reductasa en células de *A. nidulans* incubadas en condiciones de carencia de fuente de nitrógeno, a la vez que provoca la inactivación del enzima en células permeabilizadas del mismo organismo. En ambos casos la pérdida de actividad nitrato reductasa se protege por la presencia en el medio de incubación de agentes reductores de grupos sulfidrilo (DTE o cisteína). A este respecto es interesante observar que se ha descrito para la molécula de nitrato reductasa de *A. nidulans* la existencia de grupos sulfidrilo esenciales para que el enzima pueda desarrollar su actividad catalítica (54). Todo ello permite sugerir que la inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en respuesta a la ausencia de nutrientes nitrogenados, podría ser consecuencia de la oxidación de los grupos sulfidrilo implicados en la actividad enzimática, producida por algún agente oxidante que se generase a partir de la reducción fotosintética del oxígeno (p. ej. el peróxido de hidrógeno). Es interesante considerar a este nivel que, en diversos organismos, algunos enzimas del ciclo de Calvin se encuentran sometidos a regulación por sistemas de oxidación y reducción que afectan a grupos sulfidrilo

de las correspondientes proteínas, conduciendo el proceso de oxidación a la inactivación del enzima (43, 111). En algunos de estos casos se ha indicado que el peróxido de hidrógeno podría estar implicado actuando como agente oxidante de grupos sulfidrilo de los enzimas sometidos a regulación (43, 111).

La inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* mediada por luz y por oxígeno, que tiene lugar en ausencia de nutrientes nitrogenados, parece continuarse con otro tipo de modificación de la molécula de enzima que, en nuestras condiciones, aparece como de naturaleza irreversible. En la literatura se encuentran otros ejemplos de inactivación reversible de enzimas que se continúan con pérdida irreversible de la actividad enzimática correspondiente (34, 48, 49), habiéndose demostrado que este último proceso es la consecuencia de la degradación proteolítica de la proteína enzimática, y sugerido que la función de la primera fase de inactivación (la fase reversible) consistiría en "marcar" al enzima para hacerlo de algún modo reconocible por el sistema proteolítico (25, 34, 49). Resulta particularmente interesante el que para la glutamina sintetasa de *E. coli* la modificación reversible consista en una oxidación producida por peróxido de hidrógeno (49).

Una explicación posible del proceso de inactivación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* observado en medio carente de fuente de nitrógeno, sería que éste se inicia por una oxidación de la molécula de enzima, que posiblemente afecte a los grupos sulfidrilo claves para su actividad catalítica y que la haría más susceptible de sufrir un ataque proteolítico. Aunque otras hipótesis no se puedan excluir, el hecho de que en el sistema de estudio utilizado esa inactivación afecte sólo a una parte de la actividad que inicialmente existía en las células, podría deberse a que la posterior degradación de proteínas podría conllevar liberación intracelular de amonio que, puesto que los estudios referidos están realizados en presencia de cloranfenicol, no se gastaría en nueva síntesis de proteínas y conduciría a un posterior aumento de la

estabilidad de la nitrato reductasa. El hecho de que en los experimentos llevados a cabo el cloranfenicol se encuentre presente en la suspensión celular desde el momento en que se transfieren las células desde el medio con nitrato al medio libre de nitrógeno, indicaría que el sistema responsable de la degradación proteolítica se encontraría ya presente en las células cultivadas con nitrato, sin que fuera necesaria la carencia de nutrientes nitrogenados para inducir su síntesis. En un sistema de regulación tal como éste en que no parece controlarse la formación del aparato de degradación, resulta bastante lógico que lo que se controle sea su actuación, especificando los sustratos sobre los que debe actuar.

En consecuencia, en *Anacystis nidulans*, la nitrato reductasa estaría afectada por la fuerte degradación de proteínas que tiene lugar en microorganismos sometidos a condiciones de limitación en nitrógeno (26). No obstante, los resultados obtenidos en ausencia de inhibidores de síntesis de proteínas, demuestran que la pérdida de actividad nitrato reductasa de *A. nidulans* puede compensarse (al menos durante las primeras 1-2 h después de haber transferido las células al medio sin nitrógeno) con nueva síntesis del enzima. Es por otra parte lógico que este proceso de síntesis se vea dificultado a medida que las células permanecen en el medio sin nitrógeno, puesto que la disponibilidad de los precursores nitrogenados, necesarios para la síntesis de cualquier proteína, disminuirá progresivamente en esas condiciones en que deben obtenerse por degradación de proteínas. La progresiva dificultad para la síntesis de nuevas moléculas de nitrato reductasa, junto con la mayor degradación de este enzima en condiciones de limitación en nitrógeno, contribuirán conjuntamente a que, como se ha mencionado, el nivel de nitrato reductasa disminuya con el tiempo, en relación a los correspondientes controles mantenidos en presencia de nitrato. En consecuencia, dado que la nitrato reductasa de *A. nidulans* es una de las proteínas que se sintetizan de manera significativa en condiciones de deficiencia en nitrógeno, puede deducirse que dicho enzima debe responder con un aumento de su recambio celular a la ausencia de una fuente de nitrógeno utilizable.

En el curso de este trabajo, y dada la ausencia de métodos adecuados, se han puesto a punto procedimientos para la estimación "in situ" e "in vivo" de la actividad nitrito reductasa de células de *Anacystis nidulans*. Las características más relevantes de estos métodos de ensayo se han descrito en la sección de Resultados.

Se había sugerido previamente (20) que la entrada de nitrito en *A. nidulans* tenía lugar mediante dos diferentes mecanismos, transporte activo de nitrito y difusión de ácido nitroso, cuya contribución relativa al consumo global de nitrito por las células dependía del pH del medio. La operación del transporte activo de nitrito, pero no la de la entrada pasiva de ácido nitroso, conllevaría el gasto de energía metabólica, afectándose negativamente por agentes inhibidores de ATPasas tales como el DCCD. De hecho se ha descrito (20) que la inhibición por DCCD de la entrada global de nitrito en *A. nidulans* es dependiente del pH del medio, siendo mayor a medida que aumenta el pH y, por tanto, la proporción de la forma básica del par $\text{NO}_2\text{H}/\text{NO}_2^-$ respecto del total. El consumo de nitrito incluye tanto la entrada en la célula como su posterior reducción hasta amonio. El requerimiento energético que a valores altos de pH presenta este proceso parece corresponder a una entrada activa de nitrito, no pudiendo atribuirse al paso de reducción, el cual tiene lugar a favor de gradiente de potencial redox, no presentando requerimientos de energía metabólica (31).

En este trabajo se ha comprobado que a pH 7,2 el consumo de nitrito por células de *A. nidulans* se inhibe sólo débilmente por DCCD, lo que se ha tomado como indicación de que a ese valor de pH el componente de entrada que opera fundamentalmente es la difusión pasiva de ácido nitroso. El paso limitante del consumo de nitrito a pH 7,2 en *A. nidulans* parece localizarse en la reducción intracelular del anión, puesto que, en estas condiciones, el suministro del sustrato se encuentra asegurado por la difusión pasiva del ácido nitroso al interior celular. En

consecuencia, la estimación del consumo de nitrito a pH 7,2 puede utilizarse como ensayo "in vivo" de la actividad nitrito reductasa de células de este organismo.

Se ha estudiado el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción catalizada por la nitrito reductasa de células de *A. nidulans* determinada tanto "in situ" (en células permeabilizadas con el detergente MTA) como "in vivo" (estimada a través del consumo de nitrito a pH 7,2 por células sin tratar). En el primero de los casos se obtuvo un valor de K_m para el nitrito de aproximadamente 120 μM , que es del mismo orden que el encontrado en extractos de células de este microorganismo (53). En el caso en que se medía consumo de nitrito a pH 7,2, se obtuvieron dos diferentes valores para la K_m aparente para el nitrito -de aproximadamente 300 μM y 6 μM - lo que indica la existencia de dos sistemas de consumo con distinta afinidad por el sustrato. Este hecho confirma la idea de que existan dos componentes de entrada de nitrito al interior de las células de *A. nidulans*. El componente de alta afinidad (identificable con el componente activo) sería responsable de la K_m más baja exhibida por el sistema global. El otro, de menor afinidad, (identificable con el sistema pasivo) actuaría a concentraciones altas de nitrito y sería responsable del valor de K_m más alto observado. Esta última es del mismo orden de magnitud que la que manifiesta la nitrito reductasa en extractos de células (53) o en células permeabilizadas (que se ha indicado corresponde a 120 μM) por lo que podría suponerse que, en este caso, la afinidad de las células por el nitrito viene marcada por la correspondiente al enzima nitrito reductasa, que cataliza la primera reacción de metabolización intracelular del nitrito.

En estos estudios del efecto de la concentración de nitrito sobre el consumo de nitrito a pH 7,2 por células de *A. nidulans*, además de encontrarse dos valores de K_m , se evidencian también dos diferentes valores para la velocidad máxima de consumo, correspondiendo al sistema de mayor afinidad la menor velocidad máxima (2 nmol de nitrito consumido por μl de células por min) y al de menor afinidad la velocidad máxi-

ma más alta (18 nmol de nitrito consumido por μ l de células por min). Como los valores de velocidad de consumo que rutinariamente se han obtenido a ese valor de pH y a concentración inicial de nitrito de 200 μ M, son de 7-8 nmol de nitrito consumido por μ l de células por minuto, resulta evidente el funcionamiento prioritario del sistema pasivo de captura de nitrito en estas condiciones, lo que confirma la idea expresada anteriormente de que el transporte pasivo de ácido nitroso sea el que opera preferentemente en las condiciones del ensayo "in vivo".

Utilizando los sistemas de ensayo "in vivo" e "in situ" desarrollados, se ha llevado a cabo una serie de estudios acerca de la influencia de la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada para el cultivo, sobre el establecimiento de los niveles celulares de actividad nitrito reductasa en *Anacystis nidulans*. Los resultados que se han obtenido ponen de manifiesto que la presencia de amonio en el medio determina el establecimiento de niveles muy bajos de esta actividad enzimática, y que, en medios que no contienen amonio, el nitrato y el nitrito parecen influir positivamente sobre los mismos. El que en ausencia de amonio se obtenga generalmente mayor desarrollo de actividad en medios con nitrato que en los que contienen nitrito como únicos nutrientes nitrogenados, podría deberse a algunos de los efectos negativos que, sobre el metabolismo general, parece provocar este último compuesto nitrogenado (45, 76).

El desarrollo de actividad nitrito reductasa en respuesta a la transferencia de células de *Anacystis* desde medios con amonio a medios con nitrato, no tiene lugar en presencia de inhibidores de síntesis de ARNm ó proteínas (rifampicina y cloranfenicol respectivamente). Puede pues deducirse que la naturaleza de la fuente de nitrógeno controla el nivel de nitrito reductasa celular regulando la síntesis de nuevas moléculas de esta proteína. Ha de concluirse, por tanto, que el amonio actúa como represor nutricional de la nitrito reductasa de *A. nidulans* y que el nitrato y el nitrito favorecen la síntesis de este enzima, sin que la presencia de ninguno de esos aniones sea requerimiento obligatorio para que dicho proceso tenga lugar.

La represión nutricional por amonio de la nitrito reductasa de *A. nidulans* no se manifiesta en células de este microorganismo tratadas con MSX, por lo que la operatividad de la misma parece requerir la metabolización de dicho nutriente a través de la glutamina sintetasa. Por otra parte, se ha presentado evidencia de que el efecto positivo del nitrato no requiere su previa transformación intracelular en nitrito, como indica el hecho de que se manifieste en células de *Anacystis* que, al haber sido tratadas con volframio, son incapaces de llevar a cabo reducción de nitrato hasta nitrito por carecer de actividad nitrato reductasa. El desarrollo de nitrito reductasa siguiente a la transferencia de células desde amonio hasta nitrato, es algo menor en las células que habían sido tratadas con volframio que en los correspondientes controles mantenidos con molibdeno. Tales diferencias pueden explicarse teniendo en cuenta que las células que carecen de nitrato reductasa no podrían asimilar el nitrato del medio (único nutriente nitrogenado presente en el mismo), por lo que su situación nitrogenada sería equivalente a la de aquellas que se incuban en medio carente de fuente de nitrógeno, lo que, en principio, supone una limitación de precursores nitrogenados para la síntesis de cualquier proteína, que se traduciría en una síntesis proteica general disminuida. En apoyo de esta consideración está el hecho de que la relación entre la absorbancia a 628 nm (debida a ficocianinas) y a 678 nm (debida a clorofilas), indicativa del estado nitrogenado celular, presentaba, tras unas 7 h de incubación en el medio con nitrato, un valor normal para la suspensión que contenía molibdeno y un valor bajo (y similar al que se observa en células incubadas en ausencia de nutrientes nitrogenados) para la suspensión tratada con volframio. Por tanto, a pesar de la pequeña diferencia en el nivel de actividad nitrito reductasa alcanzado en presencia de nitrato entre células tratadas y no con volframio, en ambas situaciones parece mantenerse inalterado el efecto positivo del nitrato, deduciéndose en consecuencia que la operatividad del mismo no requiere su previa reducción intracelular a nitrito catalizada por la nitrato reductasa.

Es interesante subrayar la importancia que presenta el sistema puesto a punto, para disponer de células que no desarrollen nitrato reductasa alguna al transferirlas a condiciones nitrogenadas permisivas. Este sistema puede ser utilizado en el estudio de otros procesos en *Anacystis* que resulten influenciados por la presencia de nitrato, tal como el consumo de nitrito, en condiciones en las que se excluye la operatividad del proceso de su reducción a nitrito.

Por último, resulta interesante considerar conjuntamente las características de la regulación por la naturaleza de la fuente de nitrógeno disponible, de los dos enzimas del sistema reductor del nitrato, esto es nitrato reductasa y nitrito reductasa, en *Anacystis nidulans*. Ambos enzimas son fundamentalmente reprimibles a nivel nutricional por amonio, mediante mecanismos que requieren la metabolización de este compuesto a través de la glutamina sintetasa, y se sintetizan conjuntamente al eliminar el amonio del medio, con un desarrollo más acusado si el nitrato se encuentra presente. Estas características son compatibles con la existencia en *Anacystis nidulans* de un esquema común de regulación para nitrato reductasa y nitrito reductasa.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se han identificado dos modelos de regulación del nivel celular de nitrato reductasa en función de la fuente nitrogenada para una serie de estirpes de cianobacterias. Uno de ellos es aplicable a las estirpes incapaces de fijar nitrógeno atmosférico y se basa fundamentalmente en una represión nutricional ejercida por el amonio. El otro modelo es característico de cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno y consiste en una respuesta negativa a la presencia de amonio y otra positiva a la de nitrato, el cual actúa como inductor nutricional del enzima.

- 2.- La represión nutricional por amonio de la nitrato reductasa de *Anacystis nidulans* requiere su incorporación en compuestos orgánicos nitrogenados a través del enzima glutamina sintetasa, habiéndose propuesto varios modelos mediante los cuales podría operar el mecanismo de represión. En las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno, el efecto negativo del amonio sobre la síntesis de nitrato reductasa requiere igualmente su metabolización a través de glutamina sintetasa, pudiendo operar a través de represión del enzima o de inhibición de la entrada del inductor nitrato en la célula.

- 3.- La nitrato reductasa de *Anacystis nidulans* es más estable en presencia de nitrato, nitrito o amonio que en ausencia de nutrientes nitrogenados, sufriendo en estas últimas condiciones una rápida inactivación que podría responder a una modificación del enzima de carácter oxidativo inducida por productos de la reducción fotosintética del oxígeno. El recambio celular de la nitrato reductasa de *A. nidulans* parece aumentar en respuesta a la situación de privación de nitrógeno.

Las diferencias en estabilidad aparecen, junto con las encontradas en la velocidad de síntesis, como un factor determinante de los niveles celulares de nitrato reductasa en células de *A. nidulans* sometidas a diferentes situaciones nutricionales nitrogenadas.

4.- La nitrito reductasa de *Anacystis nidulans*, cuya actividad se ha podido estimar mediante procedimientos originales desarrollados en este trabajo, se reprime nutricionalmente por amonio, afectándose positivamente su nivel celular por la presencia de nitrato o de nitrito en el medio de cultivo. Los dos enzimas del sistema reductor del nitrato en este organismo parecen estar sujetos a mecanismos comunes de regulación.

6. BIBLIOGRAFIA

1. M.M.Allen y A.S.Smith. 1969. Nitrogen chlorosis in blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 69:114-120.
2. N.K.Amy y R.G.Garrett. 1980. Repression of nitrate reductase activity and loss of antigenically detectable protein in *Neurospora crassa*. J.Bacteriol. 144:232-237.
3. D.I.Arnon, B.D.McSwain, H.Y.Tsujimoto y W.Keishiro. 1974. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I.Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. Biochim. Biophys. Acta 357:231-245.
4. M.Bahns y R.H.Garrett. 1980. Demonstration of *de novo* synthesis of *Neurospora crassa* nitrate reductase during induction. J. Biol. Chem. 255:690-693.
5. J.L.Bailey. 1967. Techniques in protein chemistry, 2ª ed., p. 340. Elsevier, Amsterdam.
6. H.U.Bergmeyer. 1974. Methoden der enzymatischen analyse, 2ª ed. Verlag Chemie, Weinheim.
7. T.Bornefeld. 1977. The quantum requirement of photophosphorylation and its stoichiometric relation to reduction in *Anacystis in vivo*. Z. Pflanzenphysiol. 85:393-401.
8. T.D.Brock. 1973. Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. En "The biology of blue-green algae", ed. por N.G.Carr y B.A.Whitton, pp. 487-500. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
9. P.Candau. 1979. Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrate reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
10. P.Candau, C.Manzano y M.Losada. 1976. Bioconversion of light energy into chemical energy through reduction with water of nitrate to ammonia. Nature 262:715-717.
11. F.Castillo, F.J.Caballero y J.Cárdenas. 1981. Nitrate photoassimilation by the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* E₁F₁. Z. Naturforsch. 36c:1025-1029.
12. P.A.Cawse. 1967. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. Analyst 92:311-315.
13. H.C.P.Chang y G.J.Sorger. 1976. Effect of ammonium ions on the induction of nitrite reductase in *Neurospora crassa* J.Bacteriol. 126:1002-1004.

14. N.H.Chua. 1971. The methyl viologen-catalyzed Mehler reaction and catalase activity in blue-green algae and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 245:277-287.
15. B.Colman, K.H.Cheng y R.K.Ingle. 1976. The relative activities of PEP carboxylase and RuDP carboxylase in blue-green algae. *Plant Sci. Lett.* 6:123-127.
16. M.Cramer y J.Myers. 1949. Nitrate reduction and assimilation in *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.* 32:93-102.
17. R.C.Cresswell y P.J.Syrett. 1979. Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Sci. Lett.* 14:321-325.
18. G.Döhler. 1976. Photosynthetische carboxylierungsreaktionen verschieden pigmentierter *Anacystis*-Zellen. *Planta* 131:129-133.
19. N.S.Dunn-Coleman, A.B.Tomsett y R.H.Garrett. 1979. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: effect of the gln-1a locus. *J. Bacteriol.* 139:697-700.
20. E.Flores. 1982. Utilización de nitrato por la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Mecanismo y regulación. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
21. E.Flores, M.G.Guerrero y M.Losada. 1980. Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 128:137-144.
22. E.Flores, M.G.Guerrero y M.Losada. 1983. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 722:408-416.
23. E.Flores, A.Herrero y M.G.Guerrero. 1982. Production of ammonium dependent on basic L-amino acids by *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 131:91-94.
24. E.Flores, J.L.Ramos, A.Herrero y M.G.Guerrero. 1983. Nitrate assimilation by cyanobacteria. En "Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function", ed. por G.C.Papageorgiou y L.Packer, pp. 363-387. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
25. S.Funayama, J.M.Gancedo y C.Gancedo. 1980. Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur.J. Biochem.* 109:61-66.

26. A.L.Goldberg y A.C.St.John. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 747-803.
27. G.Gottschalk. 1979. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag, Berlin.
28. G.Grove y G.A.Marzluf. 1981. Identification of the product of the major regulatory gene of the nitrogen control circuit of *Neurospora crassa* as a nuclear DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 256:463-470.
29. M.G.Guerrero, C.Manzano y M.Losada. 1974. Nitrite photoreduction by a cell-free preparation of *Anacystis nidulans*. *Plant Sci. Lett.* 3:273-278.
30. M.G.Guerrero, J.M.Vega, E.Leadbetter y M. Losada. 1973. Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Arch. Mikrobiol.* 91:287-304.
31. M.G.Guerrero, J.M.Vega y M.Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:169-204.
32. A.Hattori. 1962. Adaptive formation of nitrate reducing system in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* 3:371-377.
33. A.Hattori y J.Myers. 1967. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. II. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Cell Physiol.* 8:327-337.
34. B.A.Hemmings. 1980. Phosphorylation and proteolysis regulate the NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 122:297-302.
35. J.Herrera, A.Paneque, J.M.Maldonado, J.L.Barea y M.Losada. 1972. Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 996-1003.
36. A.Herrero. 1981. Nitrate reductase levels in *Anacystis nidulans*. *EMBO Workshop sobre "Gene cloning and molecular biology of cyanobacteria"*, Orsay (Paris).
37. A.Herrero, E.Flores y M.G.Guerrero. 1979. Papel del amonio en la regulación de la síntesis de la nitrato reductasa en la cianobacteria *Anacystis nidulans*. VIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Murcia. Resúmenes, 36.

38. A.Herrero, E.Flores y M.G.Guerrero. 1980. Regulation of nitrate reductase activity level in *Anacystis nidulans*. II Congreso de la Federation of European Societies of Plant Physiology, Santiago de Compostela. Resúmenes, 129.
39. A.Herrero, E.Flores y M.G.Guerrero. 1981. Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. J. Bacteriol. 145:175-180.
40. A.Herrero, E.Flores y M.G.Guerrero. 1983. Regulation of the nitrate reductase level in *Anacystis nidulans*: enhanced decay of the enzyme under nitrogen stress. Enviado para su publicación a J.Bacteriol.
41. M.J.A.Ihlenfeldt y J.Gibson, 1975. CO₂ fixation and its regulation in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). Arch. Microbiol. 102:13-21.
42. E.R.Jansz y F.I.MacLean. 1973. CO₂ fixation by the blue-green alga *Anacystis nidulans*. Can. J. Microbiol. 19:497-504.
43. W.M.Kaiser. 1979. Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated chloroplasts by hydrogen peroxide. Planta 145:377-382.
44. W.A.Kratz y J.Myers. 1955. Nutrition and growth of several blue-green algae. Amer. J. Bot. 42:282-287.
45. C.M.Larsson y M.Andersson. 1981. Uptake and photoreduction of NO₃⁻ and NO₂⁻ in *Scenedesmus*: interactions with CO₂ fixation. En "Photosynthesis", ed. por G.Akoyonoglou, vol.4, pp. 741-750. Balaban International Science Services, Philadelphia.
46. C.K.Leach y M.Herdman. 1973. Structure and function of nucleic acids. En "The biology of blue-green algae", ed. por N.G.Carr y B.A.Whitton, pp. 186-200. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
47. M.Lehmann y G.Wöber. 1978. Light dark modulation of glycogen phosphorylase activity in the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. Plant, Cell & Environment 1:155-160.
48. A.G.Lenz y H.Holzer. 1980. Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. FEBS Lett. 109:271-274.
49. R.L.Levine, C.N.Oliver, R.M.Fulks y E.R.Stadtman. 1981. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2120-2124.

50. H.Lieth y R.H.Whittaker. 1975. Primary productivity of the Biosphere. Springer-Verlag, Berlin.
51. M.Losada, M.G.Guerrero y J.M.Vega. 1981. The assimilatory reduction of nitrate. En "Biology of inorganic nitrogen and sulfur", ed. por H.Bothe y A.Trebst, pp. 30-63. Springer-Verlag, Berlin.
52. G.Mackinney. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140:315-322.
53. C.Manzano. 1977. La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde-azulada *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
54. C.Manzano, P.Candau, C.Gómez-Moreno, A.M.Relimpio y M.Losada. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. Mol. Cell. Biochem. 10:161-169.
55. C.Manzano, P.Candau y M.G.Guerrero. 1978. Affinity chromatography of *Anacystis nidulans* ferredoxin-nitrate reductase and NADP reductase on reduced ferredoxin-sepharose. Anal. Biochem. 90:408-412.
56. G.A.Marzluf. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbiol. Rev. 45:437-461.
57. J.C.Meeks, C.P.Wolk, W.Lockau, N.Schilling, P.W.Shaffer y W.S.Chien. 1978. Pathways of assimilation of (^{13}N) N_2 and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. J. Bacteriol. 134: 125-130.
58. J.C.Meeks, C.P.Wolk, J.Thomas, W.Lockau, P.W.Shaffer, S.M.Austin, W.S.Chien y A.Galonsky. 1977. The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. J. Biol. Chem. 252:7894-7900.
59. A.Meister. 1980. Catalytic mechanism of glutamine synthetase; overview of glutamine metabolism. En "Glutamine: metabolism, enzymology and regulation", ed. por J.Mora y R.Palacios, pp. 1-40. Academic Press, New York.
60. J.M.Méndez, A.Herrero y J.M.Vega. 1981. Characterization and catalytic properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. Z. Pflanzenphysiol. 103:305-315.

61. J.M.Méndez y J.M.Vega. 1981. Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Physiol. Plant.* 52: 7-14.
62. I.Morris y P.J.Syrett. 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Microbiol.* 47: 32-41.
63. A.H.Neilson y T.Larsson. 1980. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* 48: 542-553.
64. K.Ohmori y A.Hattori. 1970. Induction of nitrate and nitrite reductases in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell Physiol.* 11:873-878.
65. M.Ohmori, K.Ohmori y H.Strotmann. 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 114:225-229.
66. T.Ortega, F.Castillo y J.Cárdenas. 1976. Photolysis of water coupled to nitrate reduction by *Nostoc muscorum* subcellular particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:885-891.
67. C.O.P.Patterson y J.Myers. 1973. Photosynthetic production of hydrogen peroxide by *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* 51:104-109.
68. R.A.Pelroy y J.A.Bassham. 1972. Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 86: 25-38.
69. R.A.Pelroy, R.Rippka y R.Y.Stanier. 1972. Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 87:303-322.
70. G.A.Peschek, 1979. The role of the Calvin cycle for anoxygenic CO₂ photoassimilation in *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 106:34-38.
71. G.A.Peschek. 1979. Anaerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans* H₂-dependent photoreduction and related reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 548:187-202.
72. E.K.Pistorius, E.A.Funkhouser y H.Voss. 1978. Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. *Planta* 141:279-282.
73. R.Premakumar, G.J.Sorger y D.Gooden. 1979. Nitrogen metabolite repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 137:1119-1126.

74. R.Premakumar, G.J.Sorger y D.Gooden. 1980. Repression of nitrate reductase in *Neurospora* studied by using L-methionine-D,L-sulfoximine and glutamine auxotroph *gl_n-1b*. J. Bacteriol. 143:411-415.
75. S.Prusiner y E.R.Stadtman. 1973. The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press, New York.
76. P.Purczeld, C.J.Chon, A.R.Portis Jr., H.W.Heldt y U.Heber. 1978. The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with nitrite-mediated proton transfer across the envelope. Biochim. Biophys. Acta 501, 488-498.
77. A.K.Rai, A.P.Kashyap y S.L.Gupta. 1981. ATP-Dependent uptake of nitrate in *Nostoc muscorum* and inhibition by ammonium ions. Biochim. Biophys. Acta 674:78-86.
78. J.L.Ramos. 1981. Bioconversión de energía solar en energía química: fotoproducción de amoníaco por algas verde-azuladas. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
79. J.L.Ramos, M.G.Guerrero y M.Losada. 1981. Photoproduction of ammonia from dinitrogen by whole cells of blue-green algae. En "Photosynthesis", ed. por G.Akoyonoglou, vol. 6, pp. 707-717. Balaban International Science Services, Philadelphia.
80. R.Rippka, J.Deruelles, J.B.Waterbury, M.Herdman y R.Y.Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111:1-61.
81. M.Rodríguez-López, M.L.Muñoz y D.Vázquez. 1970. The effects of the rifamycin antibiotics on algae. FEBS Lett. 9:171-174.
82. J.M.Romero, A.Herrero, E.Flores y M.G.Guerrero. 1982. Efecto de aminoácidos sobre la utilización de nitrito y la síntesis de nitrato reductasa en la cianobacteria *Anacystis nidulans*. X Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Santander. Resúmenes, 133.
83. P.Rowell, S.Enticott y W.D.P.Stewart. 1977. Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. New Phytol. 79:41-54.
84. A.Serrano, J.Rivas y M.Losada. 1981. Nitrate and nitrite as "in vivo" quenchers of chlorophyll fluorescence in blue-green algae. Photosynth. Res. 2:175-184.
85. A.Serrano, J.Rivas y M.Losada. 1982. Changes in fluorescence spectra by nitrate and nitrite in a blue-green alga. Photobiochem. Photobiophys. 4:257-264.

86. B.M.Shapiro y E.R.Stadtman. 1970. Glutamine synthetase (*E.Coli*). Methods Enzymol. 17A:910-922.
87. A.J.Smith, J.London y R.Y.Stanier. 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. J. Bacteriol. 94:972-983.
88. F.D.Snell y C.T.Snell. 1949. Colorimetric methods of analysis, vol. 3, pp.804-805. Van Nostrand, New York.
89. G.J.Sorger, M.T.Debanne y J.Davies. 1974. Effect of nitrate on the synthesis and decay of nitrate reductase of *Neurospora*. Biochem. J. 140:395-403.
90. F.M.Sosa, T.Ortega y J.L.Barea. 1978. Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* affected in the nitrate assimilation capability. Plant Sci. Lett. 11:51-58.
91. R.Y.Stanier y G.Cohen-Bazire. 1977. Photosynthetic prokaryotes: the cyanobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 34:497-536.
92. S.E.Stevens y C.Van Baalen. 1974. Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effects of inhibitors, blue light and ammonia. Arch. Biochem. Biophys. 161:146-152.
93. W.D.P.Stewart. 1980. Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 34:497-536.
94. W.D.P.Stewart y P.Rowell. 1975. Effect of L-methionine-D,L-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. Biochim. Biophys. Res. Commun. 65:846-856.
95. K.N.Subramanian y G.J.Sorger. 1972. Regulation of nitrate reductase in *Neurospora crassa*: stability *in vivo*. J. Bacteriol. 110:538-546.
96. P.J.Syrett y C.R.Hipkin. 1973. The appearance of nitrate reductase activity in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii*. Planta 111:57-64.
97. P.J.Syrett y J.W.Leftley. 1976. Nitrate and urea assimilation by algae. En "Perspectives in experimental biology", ed. por N. Sunderland, vol. 2, pp. 221-234. Pergamon Press, Oxford.
98. P.J.Syrett y I.Morris. 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta. 67:566-575.

99. A.Thacker y P.J.Syrett. 1972. The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. New Phytol. 71:423-433.
100. R.Tischner y H.Lorenzen. 1979. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146:287-292.
101. B.Tyler. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annu. Rev. Biochem. 47:1127-1162.
102. J.Udvardy, A.Balogh y G.L.Farkas. 1982. Modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans* by glutathione. Arch. Microbiol. 133:2-5.
103. J.Udvardy, M.Godeh y G.L.Farkas. 1982. Regulatory properties of fructose 1,6-bisphosphatase from the cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. 151:203-208.
104. J.M.Vega, J.Herrera, P.J.Aparicio, A.Paneque y M.Losada. 1971. Role of molibdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. Plant. Physiol. 48:294-299.
105. B.Vennesland y M.G.Guerrero. 1979. Reduction of nitrate and nitrite. En "Encyclopedia of plant physiol, New Series", vol. 6, ed. por M. Gibbs y E.Iatzko, pp. 425-444. Springer, Berlin.
106. A.Villalobo, J.M.Roldan, J.Rivas y J.Cárdenas. 1977. Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch. Microbiol. 112:127-132.
107. R.Whittenburgy. 1978. Bacterial nutrition. En "Essays in Microbiology", ed. por J.R.Norris y M.H.Richmond, cap. 16, John Wiley & Sons, Chichester.
108. C.P.Wolk. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. Bacteriol. Rev. 37:32-101.
109. C.P.Wolk. 1981. The cyanobacteria. En "The biochemistry of plants" ed. por P.K.Stumpf y E.E.Conn, vol. 1, pp. 659-686. Academic Press, New York.
110. C.P.Wolk, J.Thomas, W.Lockau, P.W.Shaffer, S.M.Austin, W.S.Chien y A.Galonsky, 1976. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. J.Biol. Chem. 251:5027-5034.
111. R.A.Wolosiuk y B.B.Buchanan. 1977. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. Nature 266:565-567.

112. W.Zevenboom, G.J. de Groot y L.R.Mur. 1980. Effects of light on nitrate-limited *Oscillatoria agardhii* in chemostat cultures. Arch. Microbiol. 125:59-65.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

D^o Antonia Herrero Moreno
"Regulación de los niveles celulares de
los enzimas del sistema de oxidación del
nitrato en bacterias"

"cum laude" Sobresaliente

27

Abril

83

~~Wilson~~

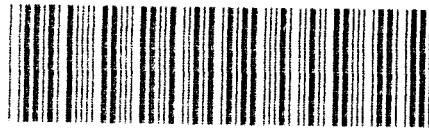
~~J. J. J.~~

~~Autoladeg~~

~~ULL~~

JRM

A. Herrero



500293307

FBI E TO 076

293107