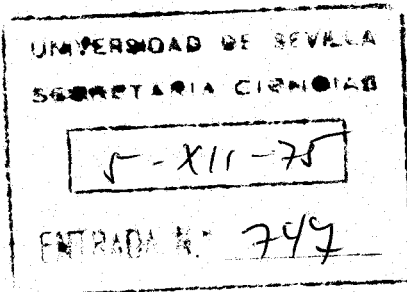


REDUCCION ENZIMATICA DE NITRATO A NITRITO EN
Azotobacter chroococcum DEPENDIENTE DE FERREDOXINA



Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Licenciada Dña. María Dolores Tortolero García.

Sevilla, Diciembre, 1975

María Tortolero García

Director

Antonio Paneque

Ponente

Manuel Losada

Dr. Antonio Paneque Guerrero
Prof. de Investigación del CSIC

Prof, Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica



TS
192

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral "Reducción de nitato dependiente de ferredoxina en *Acetobacter chrooococcum*"

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios. *todos*
- Otros términos. *cualquiera!*

Firmado:

Laura Patolew

Sevilla, a 3 de Octubre de 1992



A D. Antonio Paneque

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias y CSIC de Sevilla.

En primer lugar, quiero expresar al Prof. D. Manuel Losada Villasante, de quien durante los cursos de mi Licenciatura y de la realización de este trabajo he recibido grandes enseñanzas, mi agradecimiento por acoger me en su Departamento.

Al Prof. D. Antonio Paneque Guerrero mi más profundo y sincero agradecimiento por su constante dedicación a mi formación científica y por su continuo apoyo y estímulo en los momentos más difíciles. Su indiscutible calidad humana ha sido una de mis mayores satisfacciones a lo largo de mi estancia en esta Universidad.

A los doctores J. Rivas, M.G. Guerrero, C. Gómez-Moreno, E. Palacián, P.J. Aparicio, A.M. Relimpio, J.M. Maldonado y J.L. Barea les agradezco su colaboración así como su labor de discusión y crítica.

Quiero hacer constar mi agradecimiento a mis compañeros F. Castillo, F.F. de la Rosa, J.M. Roldán, J.M. Mendez, F. Calero, P. Candau, J. Díez y especialmente a R. Vila quien ha contribuido de manera muy directa a la realización de esta Tesis.

A mis amigos Alicia, Carlos, Trini, Paco, Antonio, Juan, Pepa, Maribel, Pepe y Carmen les agradezco su sinceridad, amistad y comprensión. Ellos han sido para mí un estímulo de constante superación.

A J. Pérez de León e I. Carretero les doy las gracias por su inestimable ayuda en la confección de esta Tesis.

Por último quiero agradecer su apoyo económico y material a las siguientes Instituciones: Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Comisaría Asesora de Investigación Científica y Técnica y National Science Foundation.

INDICE

ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCION	11
I.A. REDUCCION RESPIRATORIA DE NITRATO	14
I.B. REDUCCION ASIMILATIVA DE NITRATO	17
I.B.1. <i>Nitrato reductasa de plantas superiores,</i> <i>algas verdes y hongos</i>	19
I.B.2. <i>Nitrato reductasa de algas verdes azula-</i> <i>das y bacterias fotosintéticas</i>	20
I.B.3. <i>Nitrato reductasa de bacterias</i>	23
II. MATERIALES Y METODOS	32
II.A. CULTIVO DE CELULAS	33
II.B. ENZIMAS	34
II.B.1. <i>Preparación de extractos libres de célu-</i> <i>las</i>	34
II.B.2. <i>Preparación de la ferredoxina</i>	35
II.B.3. <i>Preparación de la ferredoxina NADP -reduc</i> <i>tasa</i>	36
II.B.4. <i>Preparación de cloroplastos</i>	36
II.B.5. <i>Ensayo de actividades enzimáticas</i>	37
II.C. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS .	38
II.C.1. <i>Cromatografía de filtración en gel</i>	38
II.C.2. <i>Diálisis</i>	38

II.C.3. Determinaciones espectrofotométricas	38
II.C.4. Determinación de nitrito	39
II.C.5. Determinación de proteína	39
II.C.6. Determinación de clorofila	39
II.C.7. Medidas de pH	40
II.D. REACTIVOS	41
III. RESULTADOS	42
III.A. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DEPENDIENTE DE NAD(P)H	43
III.A.1. Cofactores y donadores de electrones para la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u> . .	43
III.A.2. Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa dependiente de piridín-nucleótidos	46
III.A.3. Separación de las actividades NAD)P _o H-bencil viológeno diaforasa y nitrato reductásica	49
III.B. EFECTO DEL CIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. chroococcum</u>	53
III.B.1. Inhibición por cianuro de la nitrato reductasa reducida de <u>A. chroococcum</u>	53
III.B.2. Localización del efecto del cianuro sobre la actividad NAD)P _o H-nitrato reductasa . .	55
III.B.3. Protección por nitrato de la inhibición producida por cianuro sobre el enzima . . .	56
III.B.4. Efecto de la concentración de cianuro en inhibición del enzima reducido	60

III.C. EFECTO DEL FERRICIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. chroococcum</u>	61
III.C.1. <i>Inactivación reversible de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u> por ferricianuro</i>	61
III.C.2. <i>Irreversibilidad de la inactivación de la nitrato reductasa reducida de <u>A. chroococcum</u> por el cianuro</i>	64
III.D. COMPORTAMIENTO DE LA NITRATO REDUCTASA ANTE EL TRATAMIENTO TERMICO	68
III.D.1. <i>Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrato reductasa</i>	68
III.D.2. <i>Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa previamente sometida a tratamiento térmico</i>	68
III.E. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. chroococcum</u>	72
III.E.1. <i>Efecto de la temperatura en la inactivación por hidrosulfito de la nitrato reductasa de <u>A. chroococcum</u></i>	72
III.E.2. <i>Efecto de la concentración de hidrosulfito en la inactivación de la nitrato reductasa</i>	72
III.E.3. <i>Relación entre el tiempo de preincubación con hidrosulfito y el grado de inactivación de la nitrato reductasa</i>	74
III.E.4. <i>Caracterización de la inactivación de la nitrato reductasa con hidrosulfito</i>	77

III.E.5. <i>Efecto de la concentración de metil violetógeno en la protección de la inactivación por hidrosulfito</i>	77
III.F. DONADOR FISIOLÓGICO DE ELECTRONES DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. chroococcum</u>	82
III.F.1. <i>Ferredoxina reducida en la luz</i>	82
III.F.2. <i>Ferredoxina reducida en la oscuridad</i> ...	84
IV. DISCUSION	86
V. CONCLUSIONES	114
VI. BIBLIOGRAFIA	118

ABREVIATURAS

ADP.....	Difosfato de adenosina
ATP.....	Trifosfato de adenosina
BV	Bencil viológeno
BVH.....	Bencil vológeno reducido
DEAE-celulosa.....	Dietilaminoetil celulosa
D.O.	Densidad óptica
DPIP.....	2,6-diclorofenolindofenol
DTE.....	Ditioeritritol
EDTA.....	Ácido etilen diaminotetraácetico
FAD.....	Flavín-adenín-dinucleótido
FADH ₂	Flavín-adenín-dinucleótido reducido
FeCy.....	Ferricianuro
Fd.....	Ferredoxina
FMN.....	Flavín-mononucleótido
FMNH ₂	Flavín-mononucleótido reducido
g.....	Aceleración de la gravedad
MV.....	Metil viológeno
MVH.....	Metil viológeno reducido
NAD.....	Nicotinamín-adenín-dinucleótido
NADP.....	Nicotinamín-adenín-dinucleótido fosfato

NADH.....Nicotinamín-adenín-dinucleótido reducido
NADPH.....Nicotinamín-adenín-dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H.....NADH ó NADPH indistintamente
NNEDA.....N-naftil-etilendiamina
NO₃Rasa.....Nitrate reductase
pHMB.....para- hidroximercuribenzoato
Tris.....Tri-(hidroximetil)-aminometano

I. INTRODUCCION

Las reacciones y estructuras de las moléculas que contienen nitrógeno juegan un papel esencial en Bioquímica. Realmente la importancia de los ácidos nucleicos, proteínas, muchas coenzimas y otros compuestos nitrogenados no puede subestimarse.

Debido a que la Tierra contiene una atmósfera rica en oxígeno y, por consiguiente, proporciona un entorno oxidante, muchos elementos tienden a combinarse con el oxígeno. Así, el carbono es oxidado a CO_2 , el nitrógeno a NO_3^- , el azufre a SO_4^{2-} . La incorporación de estos elementos oxidados a la materia viviente requiere previamente su conversión a formas reducidas asimilables. La fuente última de poder reductor es la energía de la luz solar. Esta energía es capturada por las plantas verdes y por ciertos microorganismos, a través de la fotosíntesis, para liberar oxígeno molecular del agua y sintetizar compuestos orgánicos a partir del anhídrido carbónico, nitrato y sulfato. Los compuestos así sintetizados, proteínas, grasas, ácidos nucleicos y otra gran variedad de compuestos -entre los que cabe destacar los carbohidratos- serán utilizados después por el reino animal y microorganismos no fotosintéticos para ser oxidados y liberar energía.

De la misma forma que el carbono pasa a través de un ciclo de oxidación, CO_2 parcialmente a carbohidratos en plantas y posterior conversión a CO_2 en animales, también los compuestos de nitrógeno son reducidos para conservar energía y después oxidados para proporcionar poder metabólico. En algunos microorganismos, estas reacciones de óxido-reducción del nitrógeno constituyen de hecho los pilares fundamentales de su existencia.

Las plantas en general y determinadas bacterias asimilan su nitrógeno en forma de nitrato. Este ión procede del proceso de la nitrificación y, en parte, de la acción del ozono sobre diversos óxidos de nitrógeno durante las tormentas.

La gran importancia del metabolismo del nitrógeno inorgánico radica en el hecho de que es, en último término, la fuente de nitrógeno para todas las formas de vida existentes. El metabolismo del nitrógeno inorgánico en todas sus facetas, ha sido objeto de amplias revisiones (54,89). En este trabajo solo consideraremos el aspecto de la reducción biológica del nitrógeno nítrico, como caso particular del amplio campo del metabolismo del nitrógeno.

El nitrato constituye, por su abundancia en el suelo, la fuente principal de nitrógeno que utilizan las plantas y algas verdes, así como otros microorganismos que poseen la capacidad de reducirlo. La otra forma oxidada de nitrógeno inorgánico, el nitrógeno molecular, solo es utilizado por un número más reducido de plantas y microorganismos.

Existen dos tipos de reducción del nitrato (54, 89): a) reducción respiratoria del nitrato y b) reducción asimilativa de nitrato o asimilación de nitrato. Las características de los enzimas que intervienen en ambos procesos difieren en varios aspectos (61).

I.A. REDUCCION RESPIRATORIA DE NITRATO

En la reducción respiratoria de nitrato, que tiene lugar en diversos microorganismos en condiciones anaerobias o semianaerobias, el nitrato se utiliza como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria, sustituyendo al oxígeno en este papel; los distintos productos resultantes de su reducción (nitrito, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nitroso, etc.) no son utilizados por las células y normalmente se excretan al medio.

El rendimiento energético alcanzado en la transferencia de un equivalente molar de electrones desde un compuesto orgánico al oxígeno es de 26,5 Kcal, al nitrato es aproximadamente 18 Kcal, al sulfato 3,4 Kcal y al CO_2 2,4 Kcal. Considerando que estos son los principales oxidantes inorgánicos que intervienen en la respiración bacteriana, es de esperar que el número y variedad de microorganismos que utilizan el nitrato como aceptor de electrones sea mayor que los que utilizan el sulfato o el dióxido de carbono.

La reducción de nitrato a nitrito, cuando aquel está actuando como aceptor de electrones de la cadena respiratoria, está catalizada por la nitrato reductasa respiratoria o disimilativa.

La nitrato reductasa respiratoria de bacterias ha sido estudiada muy profundamente (61). Salvo una excepción (18) se presenta asociada a membranas. Los piridín nucleótidos, flavinas, quinonas y citocromos b y c intervienen en el transporte de electrones hasta el nitrato.

Los trabajos realizados por Pichinoty (62-71) han contribuido en una gran medida al conocimiento de este

tipo de nitrato reductasa, así como de sus diferencias con respecto al enzima que interviene en la reducción asimilativa de nitrato a nitrito, si bien muchos aspectos quedan aún por clarificar. Según Pichinoty la nitrato reductasa tipo A, o respiratoria, cataliza la reducción de clorato y bromato además de la reducción del nitrato y es sensible a la azida; mientras que la nitrato reductasa tipo B, o asimilativa, no reduce al clorato y no es sensible al tratamiento con azida.

En época muy reciente, la nitrato reductasa respiratoria de Escherichia coli está siendo objeto de un detallado estudio por parte de varios grupos de trabajo y los resultados obtenidos han arrojado mucha luz sobre la porción terminal del complejo enzimático que utiliza nitrato como aceptor final de electrones. Son de destacar los trabajos de McGregor (46-48), Enoch y Lester (14) y Ruiz de Herrera y col. (81,82) entre otros. El mayor logro ha sido la purificación hasta homogeneidad de la nitrato reductasa una vez solubilizada de las membranas por tratamiento térmico a pH alcalino ó mediante agentes tensioactivos. El enzima contiene tres clases de subunidades diferentes: la subunidad A, de 142.000 daltons, contiene el sitio

catalítico; la subunidad B, de 60.000 daltons, parece que funciona en la unión del enzima a la membrana y la subunidad C, de 195.000 daltons, es la apoproteína del citocromo b. El peso molecular del enzima nativo es de aproximadamente 10^6 daltons y consta de 4 subunidades A, 4 subunidades B y 8 subunidades C.

I.B. REDUCCION ASIMILATIVA DE NITRATO

En la reducción asimilativa de nitrato, el nitrato se reduce hasta amoniaco, que es utilizado posteriormente para la síntesis de los constituyentes celulares nitrogenados, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos.

El proceso de la reducción asimilativa de nitrato en organismos fotosintéticos está en una fase muy avanzada de estudio (36). La reducción de nitrato a amoniaco, en tejidos fotosintéticos, ocurre solo en dos pasos, ninguno de los cuales requiere ATP ni compuestos de carbono. En primer lugar el nitrato se reduce a nitrito en una reacción que implica la transferencia de dos electrones y está catalizada por la nitrato reductasa, y en segundo lugar el nitrito se reduce a amoniaco en una reacción que implica la

transferencia de seis electrones y está catalizada por la nitrito reductasa. Posteriormente volveremos a tratar con más detalle la nitrato reductasa asimilativa de tejidos fotosintéticos.

De manera idéntica tiene lugar la asimilación de nitrato por hongos y levaduras (10,13,15,16,53,57,60,72, 79,85).

La ruta asimilativa de nitrato en bacterias, a pesar de que ha sido objeto de varios estudios (54,89,25), no ha sido aún dilucidada y solo contados aspectos de la misma se han estudiado con algún detalle. De los estudios realizados en nuestro laboratorio con las bacterias Azotobacter chroococcum (19) y Acinetobacter calcoaceticus (96) se deduce un mecanismo análogo al anteriormente descrito, lo que supone la existencia de un modelo universal para todos los organismos que utilizan el nitrato con fines asimilativos.

En este trabajo vamos a abordar solo el primer paso de la asimilación del nitrato en bacterias, es decir, la reducción de nitrato a nitrito en la reacción catalizada por la nitrato reductasa.

I.B.1. NITRATO REDUCTASA DE PLANTAS SUPERIORES, ALGAS VERDES Y HONGOS

La nitrato reductasa de plantas superiores, algas verdes y hongos es una molibdoflavoproteína de elevado peso molecular (500.000 daltons), que también contiene hierro y que cataliza la transferencia de electrones desde el NAD(P)H al nitrato en una reacción en que participan secuencialmente dos actividades. La primera es una NAD(P)H-diaforasa dependiente de FAD para la expresión de su actividad, y que puede utilizar diferentes compuestos oxidados como aceptores de electrones. La segunda es la molibdo-proteína nitrato reductasa terminal, también denominada FNH₂-nitrato reductasa por su capacidad para utilizar flavín nucleótidos (o viológenos) reducidos como donadores de electrones (4,6,25,26,32,36,49,73,80). Ambas actividades se afectan de distinto modo por diferentes tratamientos e inhibidores selectivos; en general la actividad diaforásica es muy sensible al calentamiento y a la acción de los reactivos que se unen a los grupos -SH, mientras que la actividad terminal puede ser inhibida por acomplejantes de metales (4,8,73,95,103).

Una de las propiedades más interesantes de este enzima del sistema reductor del nitrato es la existencia

de dos formas interconvertibles. La mitad terminal del complejo enzimático nitrato reductasa, tanto en células fotosintéticas (2,3,26,43,49) como en organismos no fotosintéticos (79) se presenta en dos formas, activa e inactiva, que son interconvertibles. El paso de la forma activa a la inactiva requiere esencialmente la reducción del enzima, mientras que la reversión de este proceso (la conversión de la forma inactiva en activa) esta sujeta a la reoxidación de la proteína (39).

I.B.2. NITRATO REDUCTASA DE ALGAS VERDES AZULADAS Y BACTERIAS FOTOSINTETICAS

La reducción de nitrato en bacterias fotosintéticas ha sido muy poco estudiada. Los trabajos realizados por Katoh (30) con Rhodospirillum rubrum descubren la presencia de una nitrato reductasa, asociada a los cromatóforos, cuando dicho organismo se cultiva en la luz, bien aeróbica o anaerobicamente, en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno. El enzima utiliza NADH o viologenos reducidos como donadores de electrones y aparentemente está relacionado con flavinas, con un citocromo del tipo b y con hierro no hemínico.

Recientemente se ha descrito una nitrato reductasa en la bacteria sulfurosa Ectothiorhodospira shaposhnikovii (44), que depende de ferredoxina como fuente de electrones. Tendremos ocasión de aludir de nuevo a esta referencia por la casi simultaneidad de esta publicación con nuestro trabajo.

Los estudios sobre la asimilación de nitrato en algas procariotas son también escasos. A este respecto caben destacar las referencias de Hattori y Myers (20-23,58) sobre la nitrato reductasa del alga verde azulada Anabaena cylindrica. Preparaciones particuladas, obtenidas mediante un procedimiento de rotura muy suave -deseccación con acetona- catalizaban la reducción de nitrato a nitrito con ferredoxina reducida o con NADH. Cuando las células eran sometidas a un procedimiento de rotura más enérgico -sonicación- la actividad dependiente de ferredoxina se conservaba, pero se perdía la actividad dependiente de NADH, debido -discutían los autores- a la pérdida o inactivación de algún factor, presumiblemente una NADH-diaforasa, que interviene en el proceso. La ferredoxina era activa como donadora de electrones de la nitrato reductasa, cuando se reducía fotosintéticamente ó con NADPH y NADP⁺ reductasa, pe

ro totalmente inactiva cuando se reducía con ditionito. Una vez solubilizada la nitrato reductasa solo las flavinas reducidas actuaban como donadores de electrones.

Pomiluiiko y Ochkivskaya (104) han descrito una nitrato reductasa dependiente de NADH en Mycrocistis aeruginosa.

La reducción de nitrato hasta amoníaco en el alga verde azulada Anacystis nidulans, está siendo actualmente investigada en nuestro laboratorio mostrándose como uno de los ejemplos más simples y relevantes de la fotosíntesis. Por lo que respecta a la reducción de nitrato a nitrito los trabajos realizados hasta ahora (45) indican que la nitrato reductasa de este organismo es una proteína de bajo peso molecular (aproximadamente 100.000 daltons), unida a partículas fotosintéticas y que puede ser fácilmente solubilizada mediante sonicación. Ambas preparaciones, particulada y soluble, catalizan la reducción de nitrato a nitrito en presencia de ferredoxina como donador de electrones, sólo cuando esta se reduce fotosintéticamente o enzimáticamente pero no cuando se utiliza hidrosulfito. Los piridín nucleótidos, directamente o en presencia de flavinas, no actúan como donadores de elec-

trones. El metil viológeno químicamente reducido es, al contrario, muy efectivo. La cinética de la reacción cuando se utiliza este donador artificial de electrones es muy semejante a la encontrada en la bacteria A. chroococcum (19). Así, la velocidad de reacción es proporcional al tiempo solo durante los 3 ó 4 primeros minutos de la reacción, a partir de este momento el enzima sufre una rápida inactivación. El cianato protege contra dicha inactivación y reactiva al enzima una vez que este ha sido inactivado. Debemos indicar que el efecto del cianato es dependiente del pH, comportándose como un inhibidor a un pH por encima de 9,5 y como un activador por debajo de este pH.

1.B.3. NITRATO REDUCTASA DE BACTERIAS

En contraste con el alto nivel de conocimiento que está alcanzando el estudio de la nitrato reductasa respiratoria de bacterias, la nitrato reductasa asimilativa en estos procariotas esta muy poco estudiada. A este respecto, Nicholas y Nason (55), purificaron una nitrato reductasa soluble a partir de células de E. coli. El enzima catalizaba la reducción de nitrato a nitrito utilizando NADH y no NADPH, como donador de electrones. Mediante análisis fluorométricos y estudios de reactivación identificaron el FAD como grupo prostético. El efec

to inhibidor provocado por agentes quelantes de metales, así como la disminución de la actividad enzimática que se observaba cuando se cultivaban las células en condiciones deficientes de molibdeno, hacia pensar en este elemento como posible componente metálico.

Cheniae y Evans (11) y Taniguchi y Ohmachi (90) han descrito una NADH-nitrato reductasa, asociada a fragmentos de membranas, de Rhizobium japonicum y Azotobacter vinelandii, respectivamente, y cuyas actividades consiguieron separar químicamente de otras actividades enzimáticas dependientes de NADH del complejo enzimático.

La nitrato reductasa asociada a partículas, descrita en A. vinelandii utilizaba además el azul de Nilo reducido como fuente de electrones. La actividad dependiente de NADH se veía estimulada con la adición de FAD ó FMN a muy bajas concentraciones, mientras que la actividad dependiente de azul de Nilo reducido no se afectaba con la adición de flavinas. El cianuro y la azida eran fuertes inhibidores de ambas actividades, sugiriendo la existencia de algún metal pesado como constituyente del enzima. El EDTA y el pCMB afectaba solo a la actividad dependiente de NADH.

Lowe y Evans (41) y Kennedy y colaboradores (31) han estudiado una nitrato reductasa soluble de R. japonicum incapaz de utilizar piridín-nucleótidos, requiriéndose viológenos reducidos como donadores de electrones para el ensayo de su actividad. Ambos grupos de trabajo han llegado a la conclusión de que la nitrato reductasa soluble y la porción terminal del complejo particulado son el mismo enzima.

Chiba e Ishimoto (12) han encontrado una nitrato reductasa soluble en Clostridium perfringens. El extracto crudo preparado a partir de este anaerobio estricto, cataliza la reducción de nitrato a nitrito utilizando metilviológeno reducido ó NADH como donador de electrones. Cuando la preparación cruda se somete a una cromatografía en DEAE-celulosa, la actividad nitrato reductasa dependiente de NADH se pierde, conservándose la actividad dependiente de metil viológeno. La pérdida de la actividad NADH-nitrato reductasa se debe a que dicho tratamiento elimina un cofactor necesario para el transporte de electrones desde el piridín nucleótido reducido hasta el nitrato que ha sido identificado como ferredoxina. Dichos autores proponen un esquema para el sistema reductor de nitrato, en el que el NADH suministra los electrones a la ferredoxina, en una reacción catalizada por una ferredoxina-NAD⁺ reductasa, y ésta a la nitrato reductasa propiamente dicha.

Precisamente en una bacteria del mismo genero, en Clostridium pasteurianum, fué de donde en 1962 el grupo de Du Pont (50) aisló una proteína pequeña que contenía hierro y que jugaba un papel de transportador en el sistema de la piruvato deshidrogenasa y que se denominó ferredoxina. Posteriormente Tagawa y Arnon (88) establecieron la similitud funcional y química entre la proteína de Clostridium y la "piridín-nucleótido reductasa fotosintética", nombre con el que en 1958 San Pietro y Lang designaron a un factor proteico que intervenia en la transferencia de electrones desde la clorofila hasta el NADP^+ en cloroplastos iluminados de espinaca. Desde entonces han sido aisladas de diversos organismos un extenso número de proteínas que pueden ser clasificadas como ferredoxinas y estudiado sus propiedades químicas con gran detalle. Puesto que la ferredoxina va a jugar un papel importante en nuestro trabajo vamos a ver, brevemente, algunas de sus características y propiedades más relevantes.

Con el nombre de FERREDOXINAS se denominan un grupo de proteínas transportadoras de electrones que contienen uno o más sitios activos por molécula. El sitio activo está constituido por dos o cuatro átomos de hierro unido covalentemente por un lado a una cantidad equivalenen

te de sulfuros inorgánicos y por otro a cuatro restos sulfhidrilos de cisteína (40). En general son proteínas solubles, de bajo peso molecular (6.000 a 20.000), con potenciales standard de óxido reducción muy electronegativos (alrededor de -420 mV) y con una señal de EPR de 1,94 g. Se han clasificado en dos grupos atendiendo al número de átomos de hierro que contiene el sitio activo en: Ferredoxinas con centro activo formado por dos átomos de hierro, entre ellas se encuentran las ferredoxinas de plantas -y Ferredoxinas con centro activo formado por cuatro átomos de hierro- a este tipo pertenecen las ferredoxinas de bacterias.

Tanto en un tipo de ferredoxinas como en otro abundan los aminoácidos de tipo ácido, pero aún no se conoce el papel específico que en la actividad biológica juegan estos residuos. Puesto que estas proteínas tienen que interaccionar con otras moléculas protéicas, es probable que estas cargas negativas intervengan en los procesos de orientación que conduzcan a asegurar la eficiencia en el transporte de electrones.

La importancia que, desde un punto de vista biológico, tienen estas proteínas deriva del gran número y diversidad de procesos en los que intervienen: son componen-

tes esenciales de los sistemas fotosintéticos; intervienen en la reducción del nitrógeno atmosférico en amonio, en los organismos fijadores de nitrógeno; en la reducción de nitrato a amoníaco en organismos fotosintéticos y, como hemos mencionado con anterioridad, en la reducción de nitrato a nitrito en determinados organismos. Son constituyentes esenciales de multitud de reacciones metabólicas que tienen lugar en todas las formas de vida existentes, desde los más primitivos organismos hasta en plantas y animales.

En la bacteria A. vinelandii (102) han sido descritas dos tipos de ferredoxina a las que se les ha denominado ferredoxina I y ferredoxina II, igualmente efectivas en el transporte de electrones en el sistema que interviene en la fijación de nitrógeno y en la reducción del NADP^+ con cloroplastos iluminados. Ambas ferredoxinas difieren en el espectro de absorción (la ferredoxina I muestra un hombro entre 380 y 420 nm, mientras que la ferredoxina II presente un pico a 388 nm) y en los potenciales de óxido-reducción (ferredoxina I = -420 mV, ferredoxina II = -460 mV). La ferredoxina I ha sido cristalizada y caracterizada (101) encontrándose que excepto en el peso molecular, dos veces más elevado, se asemeja a la ferredoxina de Clostridium, conteniendo 8 átomos de hierro no hemínico y ocho

grupos de sulfuros lábiles por molécula.

Volviendo de nuevo a la nitrato reductasa de bacterias debemos destacar los trabajos realizados en nuestro Departamento. Guerrero et al. (19) han puesto de manifiesto la presencia de una nitrato reductasa soluble en la bacteria fijadora de nitrógeno A. chroococcum, cuando se cultiva en un medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno. La nitrato reductasa de esta bacteria no sigue el mecanismo descrito en plantas superiores, algas verdes y hongos para la reducción de nitrato a nitrito. Esta reacción no es catalizada, aparentemente, por un complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa, puesto que los piridín nucleótidos reducidos no son capaces de donar directamente los electrones necesarios para la reducción de nitrato. Tampoco las flavinas reducidas actúan como donadores de electrones. Solo el metil- ó bencil-viológeno, mantenido en estado reducido con hidrosulfito, funciona eficientemente como fuente de poder reductor para la reducción enzimática del nitrato a nitrito. La nitrato reductasa de esta bacteria es una molibdo protefna (19), de naturaleza adaptativa, de 100.000 daltons de peso molecular; su actividad se inhibe por pHMB y cianuro y se estimula notablemente por la presencia de cianato. Se presenta, in vitro, en dos formas interconverti-

bles, activa e inactiva. El nitrato a bajas concentraciones y en presencia de hidrosulfito provoca la inactivación de este enzima. El metil viológeno y el cianato evitan dicha inactivación, revirtiéndola este último una vez que ha tenido lugar.

En la bacteria asimiladora de nitrato pero no fijadora de nitrógeno A. calcoaceticus, se ha descrito recientemente una nitrato reductasa (96) cuyas características son muy similares a las encontradas en A. chroococcum. El estudio realizado en nuestro Departamento ha puesto de manifiesto que la nitrato reductasa de esta bacteria es una proteína de bajo peso molecular que carece de actividad diaforásica asociada a la nitrato reductasa en cuanto que es incapaz de utilizar los piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones- y que presenta un interesante comportamiento de inactivación y reactivación en determinadas condiciones.

Dado el interés que presenta el estudio de la nitrato reductasa asimilativa de bacterias que, como hemos visto, difiere en muchos aspectos del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de organismos más evolucionados, hemos abordado en este trabajo una investigación más detallada de la nitrato reductasa de la bacteria fijadora de nitró-

geno A. chroococcum, prestando una especial importancia al problema del donador fisiológico inmediato de electrones. Nuestros resultados han demostrado que el enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito en A. chroococcum depende de ferredoxina como donador de electrones. Por otra parte, se han reinvestigado las condiciones que afectan al estado activo o inactivo de la nitrato reductasa de esta bacteria.

Parte del trabajo objeto de esta tesis ha sido publicado (91) y presentado en Congresos nacionales (92, 93).

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. CULTIVO DE CELULAS

El organismo utilizado en este trabajo es la bacteria fijadora de nitrógeno Azotobacter chroococcum A.T.C.C. 4412, procedente de la colección de cultivos tipo de la Universidad de Salamanca.

Las células se cultivaron en frascos erlenmeyer de dos litros de capacidad, con un litro de medio esterilizado que contenía, en milimoles: Manitol, 39; NO_3K , 8; $\text{SO}_4\text{Mg} \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,8; $\text{Cl}_2\text{Ca} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,34; $\text{SO}_4\text{Fe} \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,19; ClNa , 3,4; MoO_4Na_2 , 0,01; EDTA Na_2 , 0,02 y tampón fosfato potásico, pH 7,3, 10.

El crecimiento se llevó a cabo bajo atmósfera de aire a la temperatura de 27°C en un incubador New Brunswick G-25, que suministraba a los cultivos una agitación constante de 300 r.p.m.

Cuando se precisó cultivar grandes cantidades de células se utilizaron frascos de 20 litros de capacidad, consiguiéndose la aireación necesaria mediante bombas de aire tipo Reciprotor.

II.B. ENZIMAS

II.B.1. *Preparación de extractos libres de células*

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento a baja velocidad en una centrífuga Sorvall RC 2-B y se lavaron con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0. Cuando fué necesario recoger grandes volúmenes de medio de cultivo de células, se utilizó una centrífuga Sorvall SS-1 provista de sistema de centrifugación continua "SZENT GYORGY y BLUM".

Para proceder a su rotura se mezclaron con el mismo tampón y perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro en la proporción de 0,2 ml de tampón y 10 ml de perlas por cada gramo de peso húmedo de células, obteniéndose una pasta que se sometió a fuerte vibración durante cinco minutos a la temperatura de 2°C en un homogeneizador por vibración Bühler. Otros métodos de rotura empleados fueron: sonicación, en un sonicador ultrasónico BRANSON, modelo Sonifier B-12, durante cinco minutos a 70 W, y rotura en un mortero con alúmina. El material roto se extrajo con 10 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0

por cada gramo de peso húmedo de células y se centrifugó durante veinte minutos a $40.000 \times g$. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó el extracto crudo exento de células utilizado para la determinación de actividades enzimáticas o para la preparación de enzimas.

11.B.2. *Preparación de la nitrato reductasa*

El extracto crudo se aplicó a una columna conteniendo un lecho de DEAE-celulosa (100 mm de altura y 20 mm de diámetro), que se había equilibrado previamente con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0. La nitrato reductasa se eluyó entonces de la columna con el mismo tampón suplementado con ClNa 200 mM. Finalmente se separaron las sales de la preparación enzimática filtrándola por una columna de Sephadex G-25. Todos los pasos indicados se realizaron a la temperatura de $4^{\circ}C$.

11.B.3. *Preparación de la ferredoxina*

La ferredoxina de Azotobacter se preparó siguiendo el método descrito por Yoch y col. (100), sin fraccionar en ferredoxina I y II, y fue medida por su capacidad

de transportadora de electrones en la reducción fotoquímica del NADP^+ (101).

11.B.4. *Preparación de la ferredoxina NADP^+ -reductasa*

La ferredoxina NADP^+ -reductasa de espinaca fue preparada siguiendo el método descrito por Shin y col. (83).

11.B.5. *Preparación de cloroplastos*

Los fragmentos de cloroplastos de espinaca se prepararon según el método descrito por Whatley y Arnon (98): extracción de los cloroplastos con una solución de ClNa al 2%, lavados en la misma solución y por último, rotura de los cloroplastos por choque osmótico en una solución de ClNa al 0,2%, separándose los fragmentos de cloroplastos por centrifugación. Estos fragmentos de cloroplastos fueron calentados a 55°C durante cinco minutos para destruir el fotosistema II (59).

11.B.6. *Ensayo de actividades enzimáticas*

a) El ensayo standard de la actividad nitrato reductasa se llevó a cabo al aire en tubos de ensayo de 10 ml. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante cinco minutos y contenía en un volumen final de 1 ml: tampón fosfato potásico pH 7,0, 100 μ moles; metil violetógeno, 0,15 μ moles; NO_3K , 10 μ moles; $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$, en 0,1 ml de CO_3HNa 95 mM, 0,8 mg y una cantidad adecuada de preparación enzimática. Los demás detalles experimentales fueron los descritos en cada caso.

b) Actividad NAD(P)H-diaforasa se midió espectrofotométricamente, a 600 nm, el cambio de color que acompaña a la reducción del DPIP. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2,5 ml lo siguiente; en micromoles: tampón fosfato potásico, 0,5 M, pH 7,0, 200; DPIP, 0,2; NAD(P)H, 0,3; y preparación enzimática en cantidad conveniente. El ensayo se realizó a temperatura ambiente.

II.C. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

II.C.1. *Cromatografía de filtración en gel*

Los tipos de gel utilizados en este trabajo han sido: Sephadex G-25 y G-100, suministrados por PHARMACIA, Upsala, Suecia. Para la recogida de fracciones se utilizó un colector automático LKB, modelo Ultrorac.

II.C.2. *Diálisis*

Se han utilizado sacos de diálisis de celulosa de 10" x 0,62 suministrados por SIGMA, San Luis, USA. La agitación necesaria se consiguió merced a un agitador de tipo magnético.

II.C.3. *Determinaciones espectrofotométricas*

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DK-2A para la determinación de cinética enzimática y medidas de absorbancia a longitudes de onda correspondientes al ultravioleta. Alternativamente, las medidas de compues-

tos coloreados se realizaron en espectrofotómetros Bausch & Lomb, Spectronic 20 o Spectronic 700.

Los coeficientes de extinción molar considerados han sido, para cubetas de 1 cm de paso de luz, NAD(P)H, $6,3 \times 10^3$ a 340 nm; y DPIP 21×10^3 a 600 nm.

11.C.4. *Determinación de nitrito*

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación Griess-llosway, según la técnica propuesta por Snell y Snell (86).

11.C.5. *Determinación de proteína*

Para la determinación de proteína se empleó el método de Lowry y col. (42) utilizando ovoalbúmina patrón.

11.C.6. *Determinación de clorofila*

La concentración de clorofila en los fragmentos de cloroplastos determinó por su absorbancia a 652 nm des

pués de extraer con acetona al 80%, según el método descrito por Arnon (1), considerando que el coeficiente de extinción ($E_{1\text{ cm}}^1 \text{ mg/ml}$) de la clorofila a esta longitud de onda, es de 34,5.

II.C.7. *Medidas de pH*

El pH de las soluciones tampones empleadas se determinó con un medidor de pH Beckman modelo Expandomatic ó con un medidor de pH Methrom modelo E-512 con escala expandida.

II.D. REACTIVOS

Los siguientes compuestos: FAD, FMN, NADH, NADPH, NADP⁺, Tris y DEAE-celulosa se adquirieron a SIGMA, San Luis, U.S.A. Bencil viológeno y metil viológeno, procedían por MANN, New York, U.S.A. y de SERVA, Heidelberg, Alemania. PHARMACIA de Upsala, Suecia, fue el proveedor de los diferentes tipos de Sephadex empleados. El resto de los productos utilizados se adquirieron a las firmas: SIGMA, MERCK, RIEDEL y FISCHER.

Los gases argón y nitrógeno de alta pureza, fueron suministrados por la S.E.U.

III. RESULTADOS

III.A. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DEPENDIENTE DE NAD(P)H.

III.A.1. *Cofactores y donadores de electrones para la nitrato reductasa de A. chroococcum*

Los resultados que se presentan en la Tabla I muestran que cuando el ensayo de actividad se realiza en condiciones anaeróbicas, el NADH puede actuar como donador de electrones en la reducción de nitrato a nitrito en presencia de metil o bencil viológenos. El BV parece un intermediario más efectivo que el MV en la reducción del nitrato.

La Tabla II revela que también el NADPH actúa como donador de electrones y, como en el caso anterior, únicamente cuando se utiliza el metil viológeno o el bencil viológeno como cofactores. Los flavín nucleótidos no actúan como intermediarios.

Debemos señalar que el ensayo de actividad se realiza en condiciones anaeróbicas debido a que en las

TABLA I

EFFECTO DE DIVERSOS COFACTORES EN LA REDUCCION DE NITRATO
 A NITRITO CON NADH POR UNA PREPARACION DE NITRATO REDUC-
 TASA DE A. chroococcum

Cofactor	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Ninguno	0
FMN (FAD)	2
MV	20
BV	70

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml: nitrato reductasa, 0,8 mg; y lo siguiente en micro moles: tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150; metil (o bencil) viológeno, 3; FMN (FAD), 0,4; NO₃K, 10; NADH, 0,6. La reacción se llevó a cabo a 28°C durante 10 minutos en vasijas de Warburg bajo una atmósfera de nitrógeno. El nitrito formado se determinó según se indica en Métodos analíticos.

TABLA II

EFFECTO DE DIVERSOS COFACTORES EN LA REDUCCION DE NITRATO
 A NITRITO CON NADPH POR UNA PREPARACION DE NITRATO REDUC
 TASA DE A. chroococcum

Cofactor	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Ninguno	1
FMN (FAD)	2
MV	40
BV	90

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las
 descritas en la Tabla I, excepto que el NADH se sustituyó
 por el NADPH.

preparaciones enzimáticas solubilizadas existe una gran cantidad de oxidasas que interfieren en la medida de la actividad nitrato reductásica dependiente de NAD(P)H cuando se lleva a cabo en aerobiosis.

III.A.2. *Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa dependiente de piridín nucleótidos*

Al estudiar la cinética de la reducción de nitrato utilizando NADPH como fuente de electrones y los viológenos como cofactores se observó que la velocidad de formación de NO_2^- permanece constante al menos durante los veinte primeros minutos de la reacción.

En la Fig. 1 se presenta la cantidad de NO_2^- formado con respecto al tiempo de reacción, utilizando NADPH como donador de electrones y MV como cofactor.

Los datos representados en la Fig. 2, ponen de manifiesto que, del mismo modo que en el caso anterior, cuando se utiliza BV como intermediario en el transporte de electrones desde el NADPH al nitrato la cantidad de

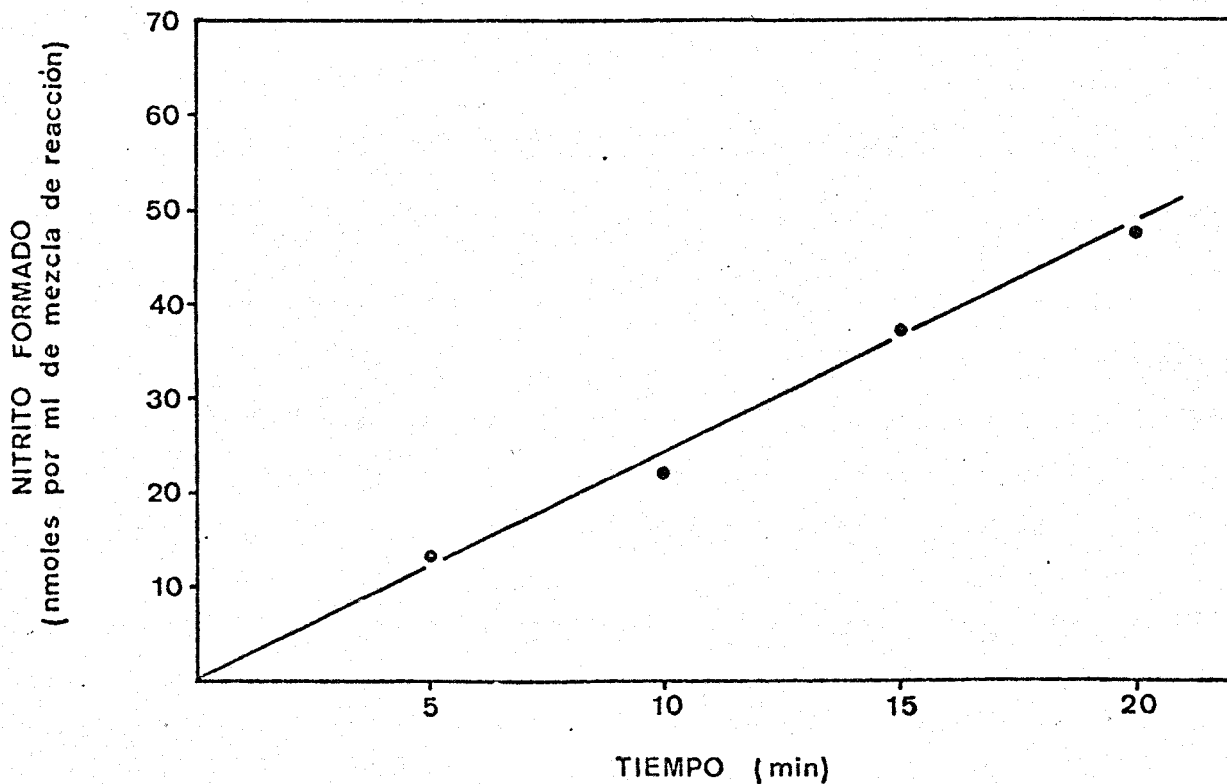


Fig. 1. Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa de *A. chroococcum* dependiente de NADPH y MV. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: nitrato reductasa, 0,5 mg y lo siguiente en micromoles: tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150; metil viológeno, 3; NADPH, 0,6; NO_3K , 10. La reacción se llevó a cabo a 27°C en vasijas de Warburg bajo atmósfera de argón. A los tiempos indicados se analizó el nitrato como se especifica en Métodos Analíticos.

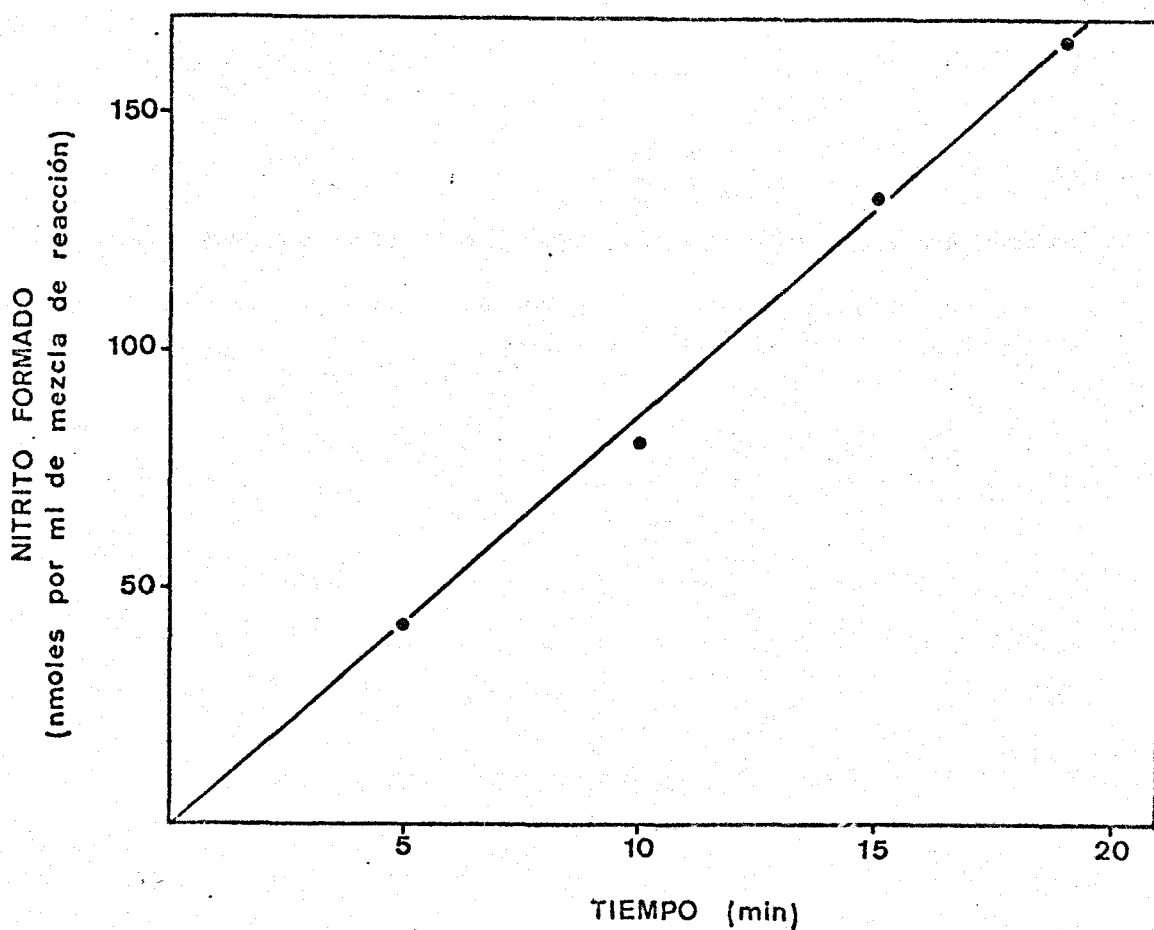


Fig. 2. Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa de *A. chroococcum* dependiente de NADPH y bencil viológeno. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la Fig. 1, excepto que el metil viológeno se sustituyó por bencil viológeno.

producto aparecido presenta una relación lineal con respecto al tiempo de reacción.

III.A.3. *Separación de las actividades NAD(P)H-bencil viológeno diaforasa y nitrato reductásica.*

Los resultados que se exponen a continuación revelan que en la reducción de nitrato a nitrito dependiente de NAD(P)H en la bacteria A. chroococcum intervienen dos actividades enzimáticas distintas: Una NAD(P)H bencil viológeno-diaforasa y una nitrato reductasa propiamente dicha, las cuales han sido físicamente separadas. Como se muestra en la Fig. 3 después de pasar la preparación enzimática, parcialmente purificada, a través de una columna de Sephadex G-100, la NAD(P)H bencil viológeno diaforasa y metil viológeno reducido-nitrato reductasa aparecen en volúmenes diferentes de elución. Mientras que la NAD(P)H bencil viológeno diaforasa sale en el volumen vacío de la columna, la metil viológeno reducido-nitrato reductasa sale después.

En la Tabla III se representan los valores obtenidos al reconstruir el sistema reductor del nitrato

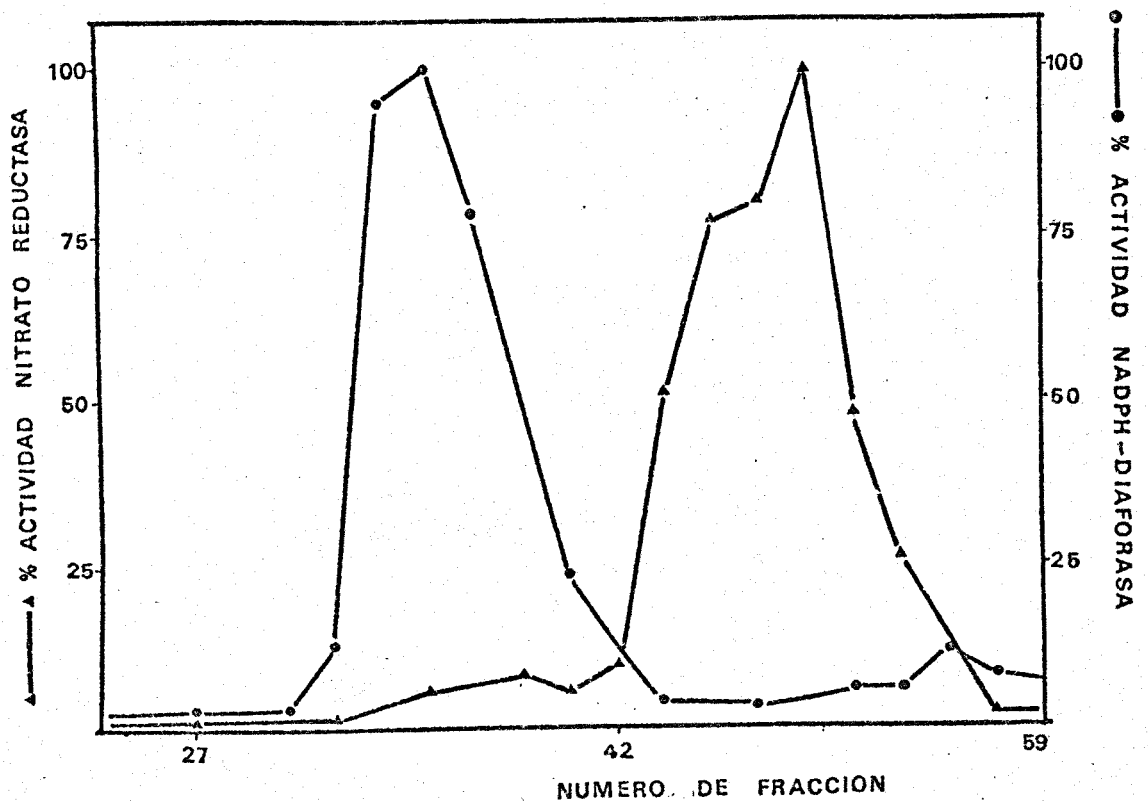


Fig. 3. Separación de las actividades NADPH-diaforasa y nitrato reductasa de *A. chroococcum*. 25 mg de extracto crudo se pasaron por una columna de Sephadex G-100 (40 cm x 2,5 cm) previamente equilibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0. La actividad NADPH-diaforasa sa lió en el volumen vacío de la columna, mientras que la nitrato reductasa lo hacía posteriormente. Las fracciones recogidas eran de 2 ml.

TABLA III

REDUCCION DE NITRATO POR LA NITRATO REDUCTASA DE A. chroococcum CON BENCIL VIOLOGENO REDUCIDO CON EL SISTEMA NADPH-NADPH-DIAFORASA

Sistema	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Completo	189
menos NADPH-diaforasa	1
menos nitrato reductasa	10
menos bencil viológeno	3

La mezcla de reacción completa contenía en un volumen final de 2 ml: nitrato reductasa, 1 mg; preparación de NADPH diaforasa, 0,8 mg; y lo siguiente en micromoles: tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150; bencil viológeno, 3; NO₃K, 10; NADPH, 0,3. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 15 minutos, bajo atmósfera de argón.

dependiente de NAD(P)H combinando las dos fracciones. Se observa que la reducción de nitrato a partir de NAD(P)H tiene lugar en dos pasos independientes, catalizado cada uno de ellos por una proteína diferente, y requiere la presencia de bencil viológeno como cofactor.

III.B. EFECTO DEL CIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE

A. chroococcum

III.B.1. *Inhibición por cianuro de la nitrato reductasa reducida de A. chroococcum*

En trabajos previos de nuestro laboratorio (73, 80,95) que han sido corroborados por otros grupos de investigación (105), se ha encontrado que la nitrato reductasa de plantas y hongos es muy sensible, en su forma reducida, a la inhibición por el cianuro. Y puesto que al contrario de la nitrato reductasa de plantas en general, la de A. chroococcum no utiliza directamente los piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones -como hemos demostrado en el apartado anterior-, resultaba interesante estudiar el efecto del cianuro sobre la nitrato reductasa objeto de este trabajo.

En la Tabla IV se muestra el efecto producido al preincubar la nitrato reductasa con cianuro a baja concentración, en diversas condiciones. Como puede apreciarse, cuando el enzima se preincuba con NADH, con NADH y

TABLA IV

INACTIVACION POR CIANURO DE LA NITRATO REDUCTASA REDUCIDA

Adición	Actividades específicas relativas (%)
Nada	100
NADH	100
BV, NADH	99
CNK	70
BV, CNK	70
NADH, CNK	60
NADH, BV, CNK	10

La nitrato reductasa (0,35 mg/ml) se preincubó durante 5 min a 24°C con tampón fosfato potásico pH 7,0, 150 mM y en presencia de los compuestos indicados a las siguientes concentraciones finales: NADH, 0,3 mM; BV, 0,75 mM; CNK, 0,1 mM. Transcurrido el periodo de preincubación se añadieron los reactivos necesarios para completar el ensayo standard de la actividad nitrato reductasa dependiente de NAD(P)H. Tanto la preincubación como el ensayo de actividad se realizaron bajo una atmósfera de argón en vasijas de Warburg. El tiempo de reacción fue de 15 min.

bencil viológeno ó con NADH y CNK no hay disminución de la actividad. La preincubación en presencia de cianuro a la concentración utilizada provoca una disminución de un treinta por ciento con respecto al control, disminución que es mucho más drástica cuando en la mezcla de preincubación se encuentran simultáneamente presentes el NADH, el CN^- y el bencil viológeno, actuando este último como cofactor en el transporte de electrones hasta la nitrato reductasa. Resultados idénticos se obtuvieron cuando se usó NADPH en lugar de NADH.

III.B.2. *Localización del efecto del cianuro sobre la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa*

Para tratar de localizar sobre cual de las dos actividades, la NAD(P)H-metil viológeno o bencil viológeno reductasa ó la metil viológeno reducido-nitrato reductasa, ejercía el cianuro su efecto inhibitor, se prepararon dos mezclas de preincubación, una control con el enzima sin ninguna adición y otra en la que se adicionaba

a la preparación enzimática el NAD(P)H, CN^- y BV. Tras cinco minutos de preincubación en anaerobiosis, las mezclas de preincubación se dializaron a través de una columna de Sephadex G-25 con objeto de eliminar el BV, CN^- y NAD(P)H. Se midieron las actividades diaforásicas y metil viológeno reducido-nitrato reductasa obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla V. De ella se deduce que la inhibición por cianuro sobre el enzima previamente reducido tiene lugar sobre la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno reducido como era de esperar dado el requerimiento de viológeno en dicha inhibición. La diálisis del enzima previamente reducido y tratado con cianuro no es capaz de restaurar su actividad original.

III.B.3. *Protección por nitrato de la inhibición producida por cianuro sobre el enzima reducido*

La Tabla VI recoge los datos obtenidos al preincubar la nitrato reductasa de A. chroococcum con cianuro en diversas condiciones. La presencia de nitrato en la preincubación con NAD(P)H y BV y CN^- protege muy eficaz-

TABLA V

LOCALIZACION DE LA INHIBICION POR CNK SOBRE EL ENZIMA REDUCIDO EN LA ACTIVIDAD NO_3^- RASA DEPENDIENTE DE NADH

Adición	Actividades específicas relativas (%)	
	NADH \longrightarrow DPIP	MVH \longrightarrow NO_3^-
Nada	100	100
NADH, BV, CN^-	100	13

El enzima (0,7 mg/ml) se preincubó durante 5 min a 24°C, en una atmósfera de argón con tampón fosfato potásico y en presencia de los compuestos señalados a las concentraciones indicadas en el experimento de la Tabla IV. Transcurrido el periodo de preincubación, las preparaciones se dializaron a través de una columna de Sephadex G-25 (1,5 x 10 cm), ensayándose la actividad diaforásica y nitrato reductasa según los ensayos standard descritos en Materiales y Métodos.

TABLA VI

PROTECCION POR NITRATO DE LA INACTIVACION PRODUCIDA POR
CNK SOBRE LA NITRATO REDUCTASA REDUCIDA

Adición	Actividades específicas relativas (%)
CN ⁻	100
NADH, CN ⁻ , BV	20
NADH, CN ⁻ , BV, NO ₃ ⁻	90

La nitrato reductasa (0,35 mg/ml) se preincubó durante 5 min a 24°C en presencia de los compuestos señalados a las concentraciones indicadas en la Tabla IV. Transcurrido este tiempo, se estimó la actividad nitrato reductasa (corregida cuando fue necesario, teniendo en cuenta el nítrito formado durante el tratamiento de preincubación) después de suplementar con los reactivos del ensayo standard de la actividad nitrato reductasa dependiente de NAD(P)H. El tiempo de reacción fue de 15 min. Tanto la preincubación como el ensayo se realizaron bajo atmósfera de argón en vasijas de Warburg.

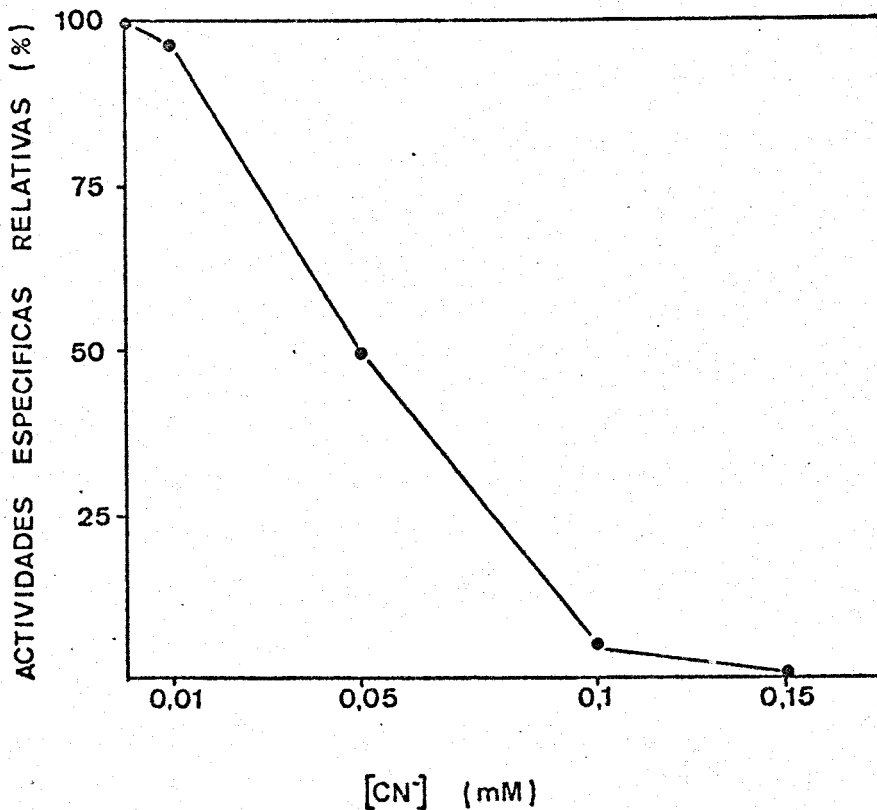


Fig. 4. Efecto de la concentración de cianuro en la inactivación de la nitrato reductasa reducida de A. chroococcum. La preparación de nitrato reductasa (0,35 mg/ml) se preincubó durante 5 min a 24°C en presencia de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM; NADH, 0,3 mM; BV, 0,75 mM; y CNK a las concentraciones indicadas. Transcurrido el periodo de preincubación, se procedió según se ha descrito en la Tabla IV.

mente contra la acción ejercida por el cianuro.

III.B.4. *Efecto de la concentración de cianuro en la inhibición del enzima reducido*

En la Fig. 4 se representan los resultados obtenidos al preincubar el enzima en presencia de distintas concentraciones de cianuro y en condiciones reductoras. El efecto inactivante aumenta con la concentración de cianuro, siendo prácticamente total a una concentración 0,1 mM.

III.C. EFECTO DEL FERRICIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE A. chroococcum

III.C.1. *Inactivación reversible de la nitrato reductasa de A. chroococcum por ferricianuro*

En la Tabla VII se representan los datos obtenidos al preincubar el enzima en presencia de ferricianuro. Se analizó la actividad enzimática de una muestra previamente tratada con el oxidante y dializada a través de Sephadex G-25. Como se desprende de dicha tabla la actividad nitrato reductásica dependiente de metil viológeno reducido disminuye marcadamente; ni el nitrato ni el metil viológeno protegen contra la drástica pérdida de actividad que tiene lugar.

La actividad diaforásica no se vé afectada por el tratamiento con ferricianuro como se observa en dicha Tabla.

El efecto del ferricianuro es prácticamente instantáneo, llegando a ser máximo en un minuto de preincubación a cero grado centígrados. Fig. 5.

TABLA VII

EFFECTO DEL FERRICIANURO SOBRE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA
DE A. chroococcum

Adición	Actividades específicas relativas	
	NADPH-diaforasa	MVH-NO ₃ ⁻ Rasa
Ninguna	100	100
FeCy	100	10
FeCy, NO ₃ ⁻	100	8
FeCy, MV	100	10

La nitrato reductasa (0,3 mg/ml) se preincubó durante 1 min a 0°C con tampón fosfato potásico 150 mM, pH 7,0, y en presencia de los compuestos indicados a las siguientes concentraciones finales: FeCy 0,3 mM, NO₃⁻K 10 mM, MV 150 mM. Transcurrido el periodo de preincubación las preparaciones se dializaron a través de una columna de Sephadex G-25 (1,5 x 10 cm) y se ensayaron las actividades diaforasa y MVH-NO₃⁻Rasa según se indica en Materiales y Métodos. Las actividades se expresan en tanto por ciento de la actividad enzimática de la preparación sin tratar con ferricianuro.

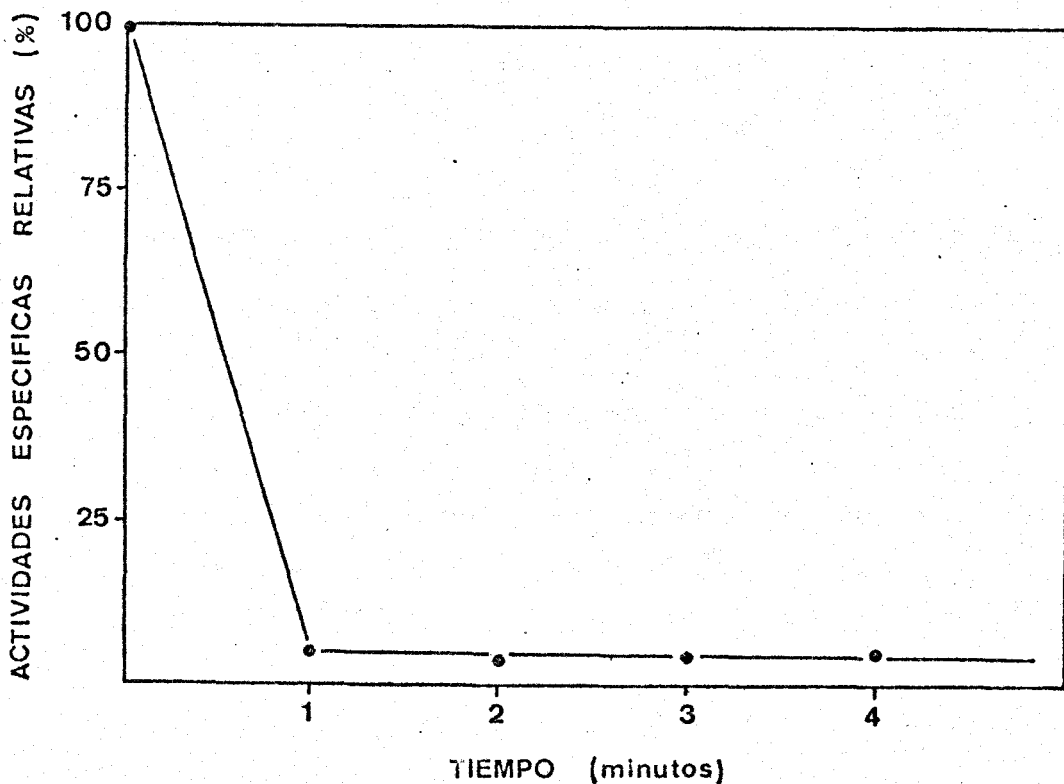


Fig. 5. Estudio cinético de la inactivación por ferricianuro de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*. La nitrato reductasa (0,3 mg/ml) se preincubó durante los tiempos indicados a 0°C, en presencia de ferricianuro 0,3 mM y tampón fosfato potásico 150 mM, pH 7,0. Transcurrido el tiempo de preincubación se añadieron los reactivos necesarios para completar el ensayo standard de la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno reducido. Las actividades se expresan en tanto por ciento de la actividad enzimática de la preparación sin tratar con ferricianuro.

Se investigó el efecto de diversos tioles sobre el enzima previamente tratado con ferricianuro. Los datos recogidos se representan en la Tabla VIII. Como se observa en dicha tabla, el DTE revierte el efecto del ferricianuro recuperándose hasta un 70% de la actividad inicial. Ni la cisteína ni el glutatión reducido ejercen efecto alguno.

III.C.2. *Irreversibilidad de la inactivación de la nitrato reductasa reducida de A. chroococcum por el cianuro*

Los resultados anteriormente descritos referentes al alto grado de sensibilidad exhibido por la nitrato reductasa de A. chroococcum hacia el cianuro y al efecto inactivante que el ferricianuro ejerce sobre la nitrato reductasa -así como su reversión por DTE- ofrecían la posibilidad de emplear el ferricianuro (bajo condiciones experimentales específicas) como agente oxidante para intentar revertir la inactivación del enzima por el cianuro, como se ha descrito que ocurre con la nitrato reductasa

TABLA VIII

REVERSION POR DITIOERITRITOL DE LA INACTIVACION CAUSADA POR EL FERRICIANURO EN LA NITRATO REDUCTASA DEPENDIENTE DE METIL VILOGENO REDUCIDO

Adición	Actividades específicas relativas (%)
Nada	15
Glutación reducido	25
Cisteína	28
Ditioeritritol	75

La nitrato reductasa (0,3 mg/ml) previamente inactivada por ferricianuro se trató con los compuestos señalados a una concentración final de 0,5 mM, ensayándose a continuación la actividad enzimática según se indica en Materiales y Métodos. El tiempo de ensayo fue de 10 min. Las actividades se expresan en tanto por ciento de la actividad enzimática de la preparación sin tratar con ferricianuro.

do otras fuentes.

Los datos de la Tabla IX revelan que, incluso en las condiciones experimentales utilizadas, el efecto inactivante del cianuro es de naturaleza irreversible. Aunque no se muestra en la tabla la adición de DTE a una vasija que contenía nitrato reductasa tratada con FeCy recuperó el 75% de la actividad del control sin tratar con FeCy.

Aparentemente, el cianuro no se disocia de la proteína aún después del tratamiento con el oxidante en las condiciones elegidas, ó, alternativamente, el cianuro determina un cambio de conformación de la nitrato reductasa que la hace incapaz para unirse al sustrato.

Resultados que no se recogen en la tabla mostraron que el cianato, si bien protege contra la inhibición provocada por el cianuro, tampoco revierte dicha inhibición.

TABLA IX

IRREVERSIBILIDAD DEL EFECTO DEL CIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA REDUCIDA DE
A. chroococcum

Tratamiento I	Adición		Actividades específicas relativas (%)
	Tratamiento II	Tratamiento III	
Nada	-	-	100
CN ⁻	-	-	70
NADH, BV, CN ⁻	-	-	10
NADH, BV, CN ⁻	FeCy	-	8
NADH, BV, CN ⁻	FeCy	DTE	8

La nitrato reductasa (0,3 mg/ml) se preincubó durante 5 min a 24°C en anaerobiosis en presencia de los compuestos señalados, a las concentraciones indicadas en la Tabla IV. A este primer tratamiento siguió un segundo periodo de 1 min después de añadir FeCy, donde se indica y en condiciones aeróbicas. Transcurrido este periodo se llevó a cabo un tercer tratamiento de 1 min en condiciones aeróbicas consistente en añadir DTE a una concentración final de 0,5 mM. Trás este tratamiento se suplementó con los reactivos del ensayo standard de la actividad nitrato reductasa dependiente de NAD(P)H. El tiempo de reacción fue de 10 min, bajo una atmósfera de argón.

III.D. COMPORTAMIENTO DE LA NITRATO REDUCTASA ANTE EL TRATAMIENTO TERMICO

III.D.1. *Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrato reductasa*

Se estudió el comportamiento de la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno reducido frente al tratamiento térmico. Los resultados que se representan en la Fig. 6 muestran que el enzima de A. chroococcum no solo es bastante resistente al calor, sino que experimenta un incremento considerable en su actividad cuando se preincuba previamente a temperaturas crecientes. La máxima actividad se alcanza tras preincubar el enzima a 40°C durante 5 minutos. El ensayo de actividad se realiza a 30°C.

III.D.2. *Estudio cinético de la actividad nitrato reductasa previamente sometida a tratamiento térmico*

Se investigó la cinética de la actividad nitrato reductasa frente al tiempo de reacción cuando el enzi

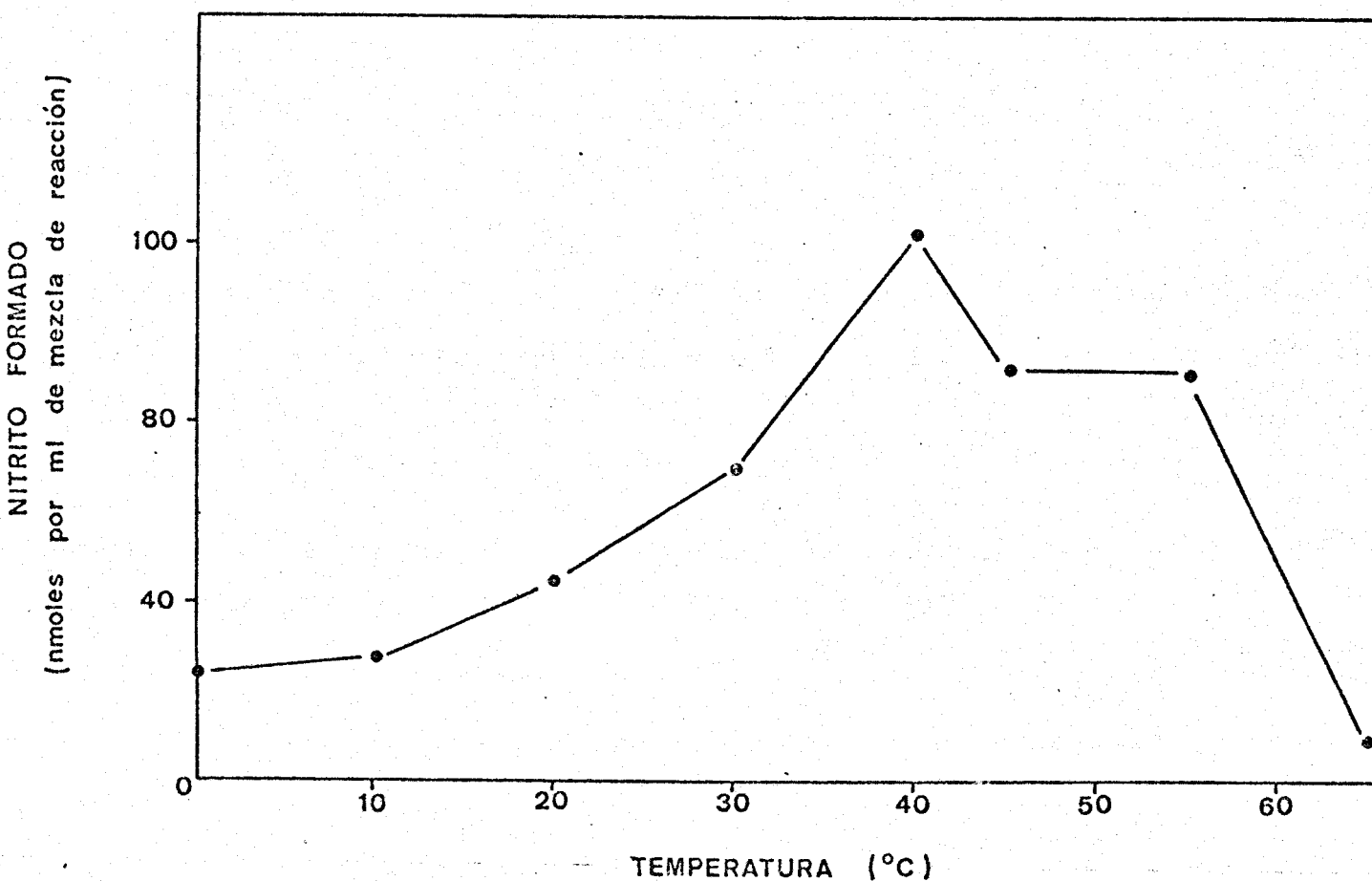


Fig. 6. Efecto del tratamiento térmico en la actividad MVH-nitrato reductasa. El enzima (0,25 mg/ml), se preincubó durante 5 min en presencia de tampón fosfato potásico 150 mM, pH 7,0, a las temperaturas que se indican. Transcurrido el periodo de preincubación se añadieron los reactivos necesarios para completar el ensayo standard de la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno reducido. El ensayo de actividad se realizó a 30°C durante 5 min.

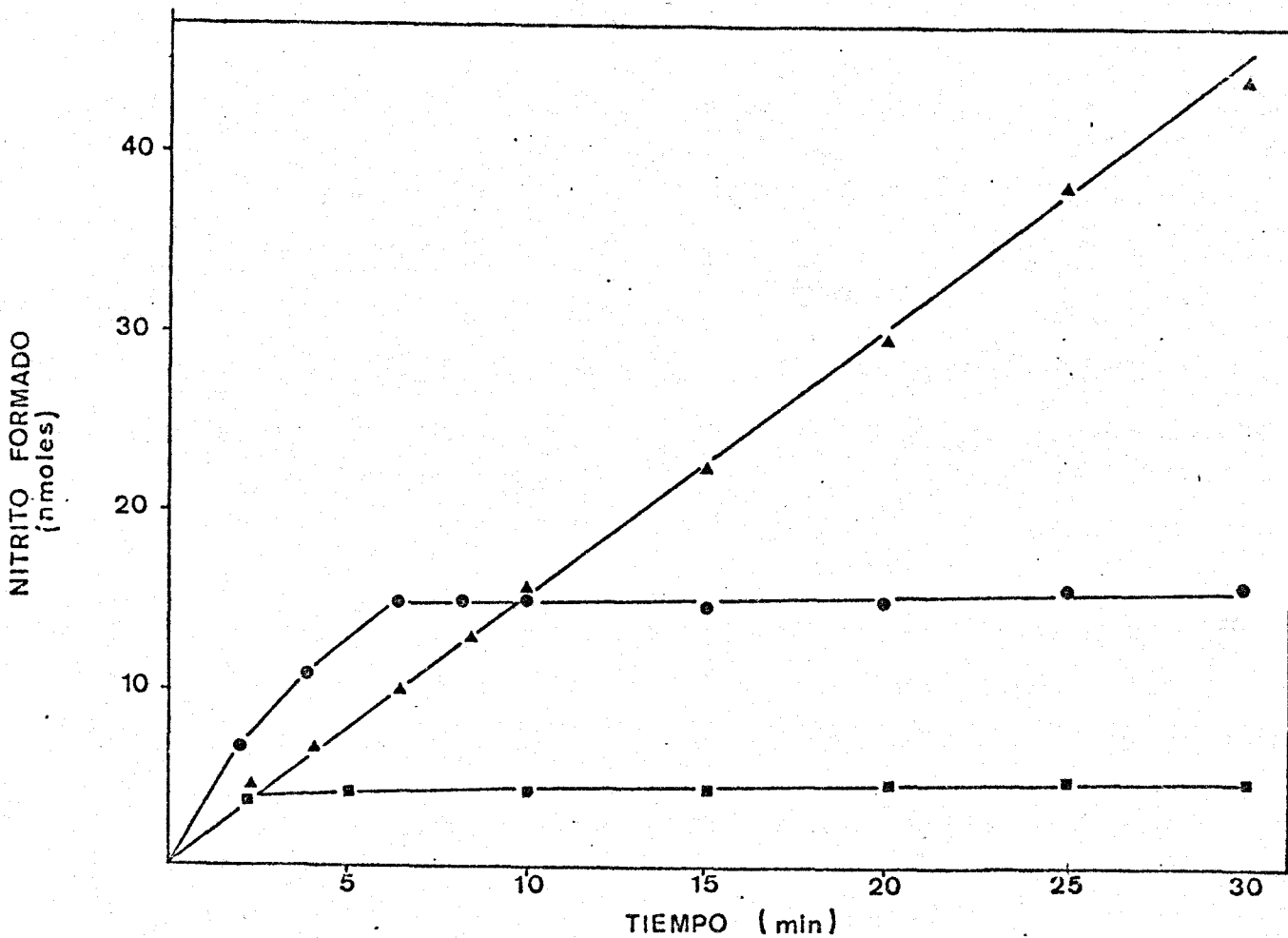


Fig. 7. Estudio cinético del efecto del tratamiento térmico sobre la actividad MVH-nitrato reductasa. La nitrato reductasa (2,5 mg/ 10 ml) se calentó durante 5 min a 40°C, en presencia de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM. Transcurrido este periodo se añadieron los reactivos necesarios para completar el ensayo de actividad standard. A los tiempos señalados se tomaron alícuotas de 1 ml y se analizó el nitrito según se describe en Métodos analíticos. ■—■ Control de enzima sin calentar; ●—● Enzima calentado; ▲—▲ Enzima calentado y valorado en presencia de cianato potásico.

ma había sido sometido previamente a una incubación a 40°C durante 5 minutos.

Como se observa en la Fig. 7 aún cuando la velo cidad de reacción permanece constante varios minutos más que la del enzima que no ha sido tratado, al cabo de trans curridos diez minutos de ensayo la velocidad decrece rá- pidamente hasta hacerse prácticamente cero. La presencia de cianato desde el principio de la reacción mantiene cons tante la velocidad original de reacción del enzima trata- do.

III.E. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA

DE A. chroococcum

Los resultados que exponemos a continuación, demuestran que la nitrato reductasa de A. chroococcum se inactiva por la acción del hidrosulfito y que esta inactivación depende de la temperatura.

III.E.1. *Efecto de la temperatura en la inactivación por hidrosulfito de la nitrato reductasa de A. chroococcum*

El enzima se incubó durante 5 minutos en presencia de hidrosulfito a distintas temperaturas. En la Fig. 8 se representan los resultados obtenidos. Como se desprende de dicha figura, a 0°C el hidrosulfito prácticamente no ejerce efecto. A medida que la temperatura de preincubación aumenta, se observa una creciente pérdida de actividad, que se hace máxima a 30°C.

III.E.2. *Efecto de la concentración de hidrosulfito en la inactivación de la nitrato reductasa.*

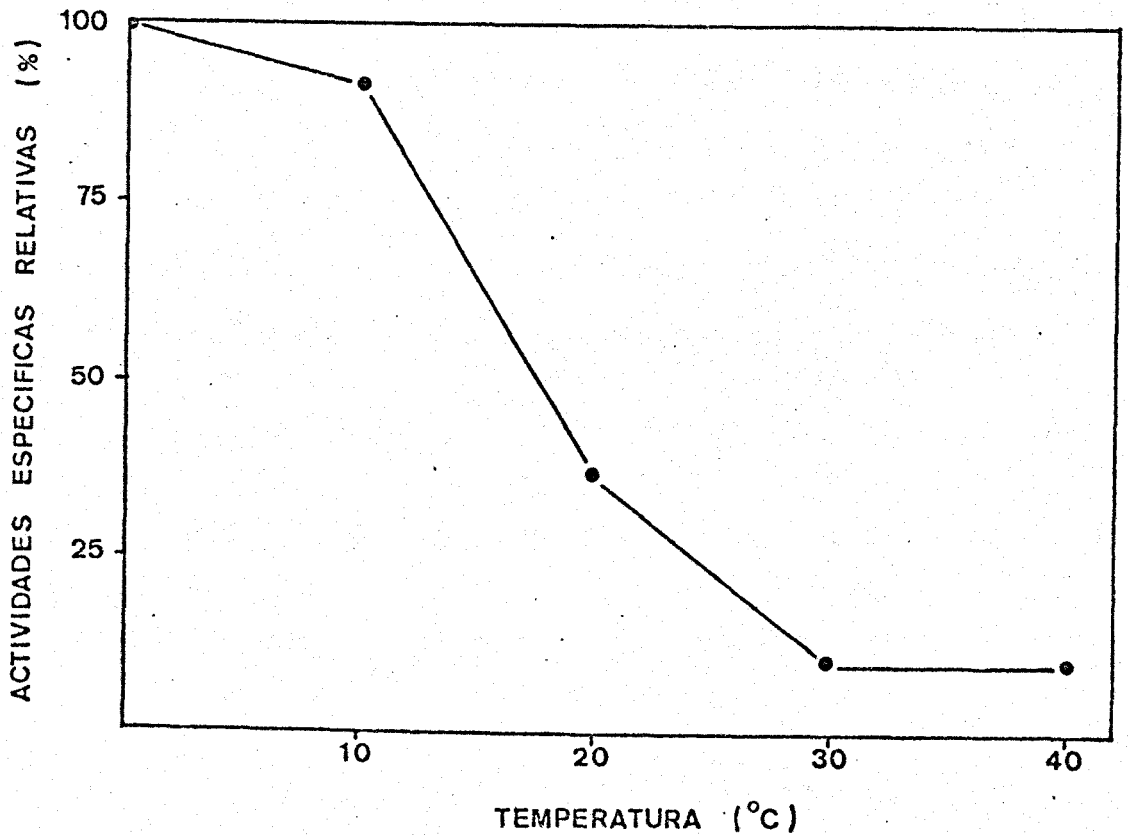


Fig. 8. Efecto de la temperatura en la inactivación por hidrosulfito de la MVH-nitrato reductasa de A. chroococum. La nitrato reductasa (0,4 mg/ml) se preincubó durante 10 minutos en presencia de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM y ditionito, 4,6 mM, a las temperaturas indicadas. Una vez transcurrido el periodo de preincubación se añadieron los reactivos necesarios para completar el ensayo standard de la actividad nitrato reductasa, determinándose el nitrito formado en cada caso. El ensayo de actividad se llevó a cabo a 30°C durante 5 min.

Se estudió la relación que existe entre la concentración de hidrosulfito en la mezcla de preincubación y la inactivación de la nitrato reductasa. Como se muestra en la Fig. 9 la pérdida de actividad está directamente relacionada con la concentración de hidrosulfito. A medida que la concentración de hidrosulfito aumenta la actividad enzimática disminuye, llegándose a la máxima inactivación a una concentración final de 3,6 mM de hidrosulfito.

III.E.3. *Relación entre el tiempo de preincubación con hidrosulfito y el grado de inactivación de la nitrato reductasa*

El efecto inactivante que el hidrosulfito ejerce sobre la nitrato reductasa es muy rápido. En la Fig. 10 se representan los resultados obtenidos al preincubar a 30°C el enzima en presencia de hidrosulfito. Como se observa, se alcanza una pérdida casi total de la actividad transcurridos tres minutos de preincubación.

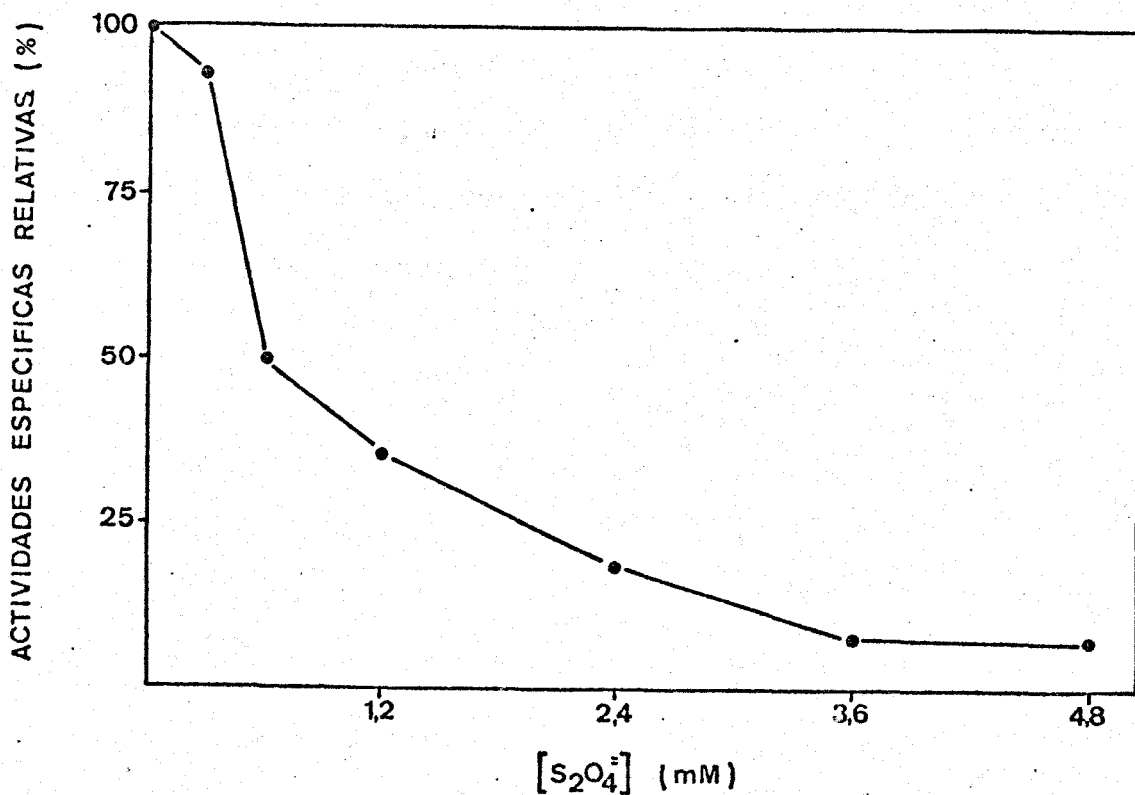


Fig. 9. Efecto de la concentración de ditionito sobre la inactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum. La nitrato reductasa (0,4 mg/ml) se preincubó durante 10 minutos a 30°C en presencia de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM, y ditionito a las concentraciones señaladas. Transcurrido el periodo de preincubación se procedió según se indica en la Fig. 8.

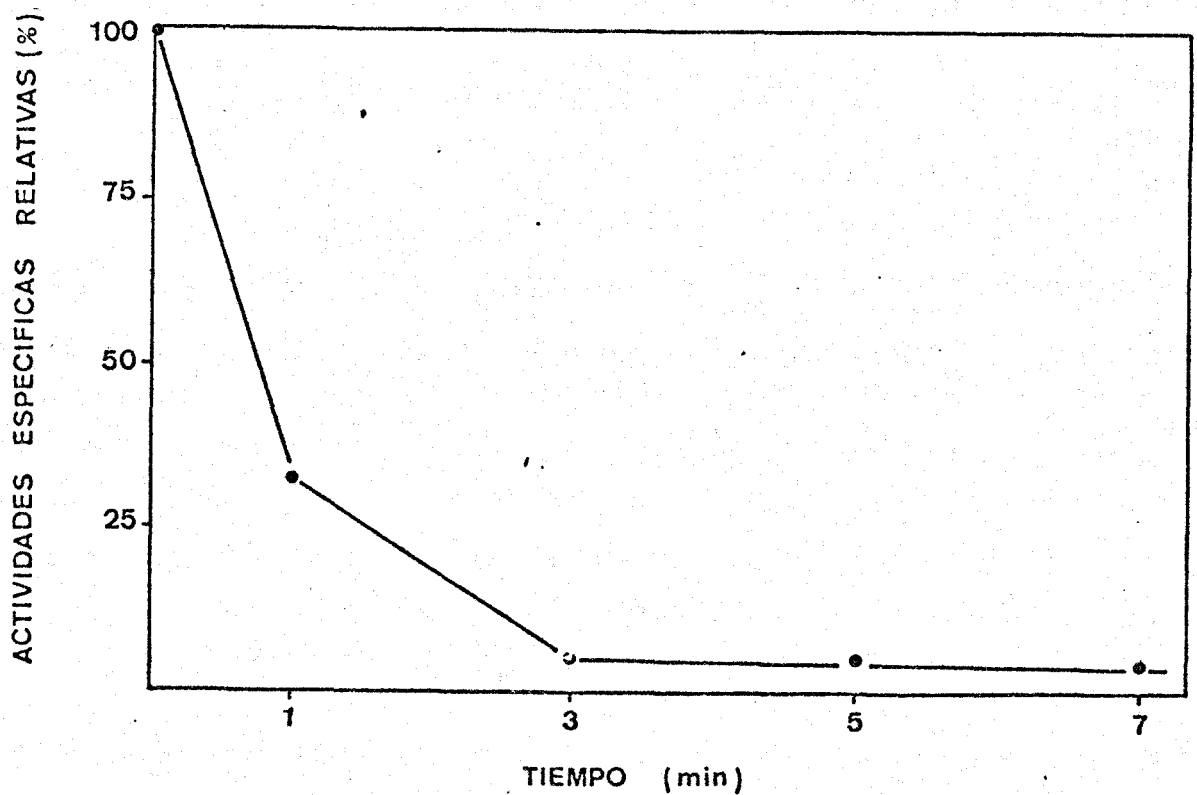


Fig. 10. Efecto del tiempo de preincubación sobre la inactivación por ditionito de la nitrato reductasa. La nitrato reductasa (0,4 mg/ml) se preincubó a 30°C, en presencia de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM, y ditionito 4,6 mM durante los tiempos señalados. Transcurrido el periodo de preincubación se procedió según se indica en la fig. 8.

III.E.4. *Caracterización de la inactivación de la nitrato reductasa con hidrosulfito*

La preincubación del enzima durante 5 minutos a 30°C en presencia de hidrosulfito, producía una inactivación del 95%. El metil viológeno y el cianato evitaban dicha inactivación, mientras que el nitrato no presentaba prácticamente ningún efecto protector. Tabla X.

El enzima inactivado por tratamiento con hidrosulfito a 30°C no recobraba su actividad inicial al añadirle MV. El cianato, sin embargo, se comportaba como un eficaz reactivante de la nitrato reductasa inactivada en las condiciones anteriormente descritas, como se observa en la Tabla XI.

III.E.5. *Efecto de la concentración de metil viológeno en la protección de la inactivación por hidrosulfito.*

La Fig. 11 muestra la protección frente a la inactivación de la nitrato reductasa en función de la con -

TABLA X

PROTECCION POR METIL VIOLOGENO Y POR CIANATO CONTRA LA
 INACTIVACION POR HIDROSULFITO DE LA NITRATO REDUCTASA
 DE A. chroococcum

Adición	Actividades específicas relativas (%)
Nada	100
$S_2O_4^{=}$	5
$S_2O_4^{=} + NO_3^-$	23
$S_2O_4^{=} + MV$	83
$S_2O_4^{=} + MV + NO_3^-$	100
$S_2O_4^{=} + CNO^-$	110

El enzima (0,4 mg/ml) se preincubó durante 10 min a 30°C con tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM y los compuestos señalados a las siguientes concentraciones: hidrosulfito, 4,6 mM; nitrato potásico, 10 mM; metil violetógeno, 0,15 mM; cianato, 1 mM. En cada caso se estimó la actividad nitrato reductasa (corregida cuando fue necesario, teniendo en cuenta el nitrito formado durante el tratamiento de preincubación). El tiempo de reacción fue de 2 min.

TABLA XI

INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. chroo-
cum POR HIDROSULFITO

Adición		Actividades específicas relativas (%)
Tratamiento I	Tratamiento II	
$S_2O_4^{=}$	Nada	8
$S_2O_4^{=}$	MV	10
$S_2O_4^{=}$	CNO^-	263

La nitrato reductasa (0,4 mg/ml) se preincubó durante 10 min a 30°C con tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM y ditionito 4,6 mM. A este primer tratamiento siguió un segundo periodo de 5 min después de añadir metil viológeno, 0,15 μ moles ó cianato potásico, 1 μ mol según se indica (Tratamiento II). Transcurrido este tiempo se ensayó la actividad nitrato reductasa, después de suplementar con los reactivos del ensayo standard de la nitrato reductasa. El tiempo de reacción fue de 5 min. Las actividades se expresan en tanto por ciento de la actividad enzimática de la preparación sin tratar con hidrosulfito.

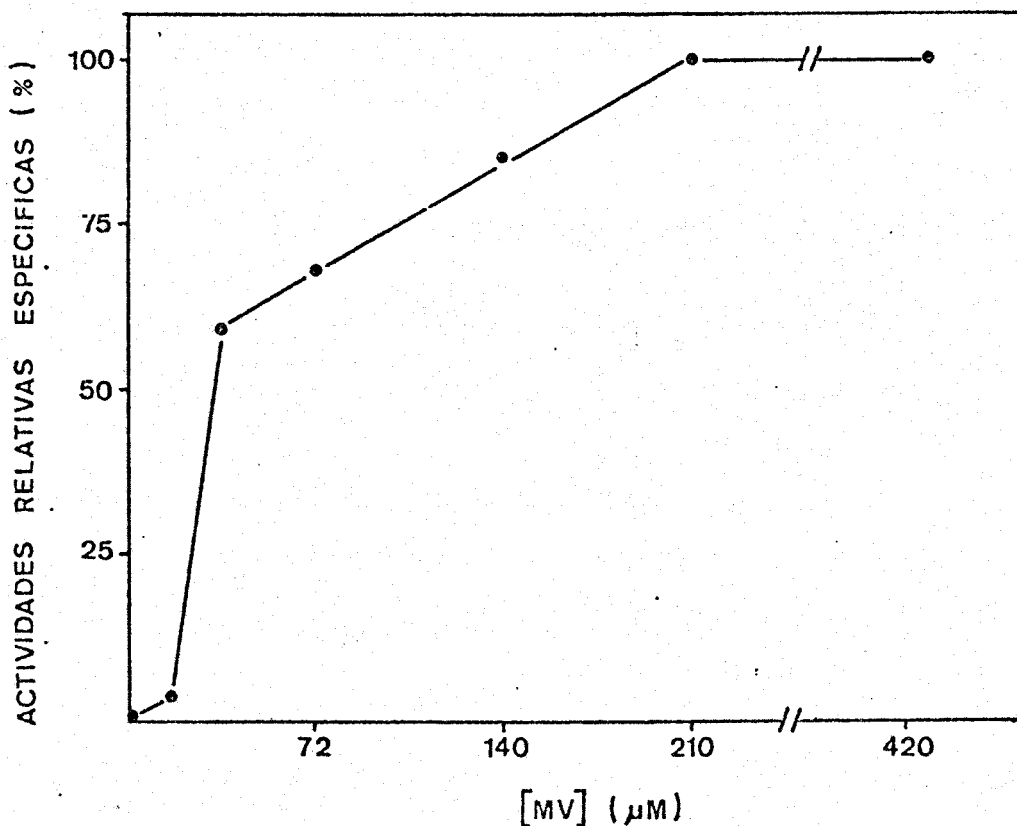


Fig.11. Efecto de la concentración de MV en la protección de la nitrato reductasa contra la inactivación por hidrosulfito. La nitrato reductasa (0,4 mg/ml) se preincubó durante 10 min, a 30°C con tampón fosfato potásico, pH 7,0, 150 mM, ditonito 4,6 mM y metil viológeno a las concentraciones que se indican. Transcurrido el periodo de preincubación se procedió como se señala en la Fig. 8.

centración de metil viológeno. La máxima protección se alcanza a una concentración 0,21 mM de metil viológeno.

III.F. DONADOR FISIOLÓGICO DE ELECTRONES DE LA NITRATO
REDUCTASA DE A. chroococcum

III.F.1. *Ferredoxina reducida en la luz*

Acoplado el poder reductor, generado en cloroplastos de espinacas iluminados, a la nitrato reductasa, la ferredoxina reducida de esta bacteria fijadora de nitrógeno actúa como donador de electrones para la conversión enzimática de nitrato a nitrito.

En la Tabla XII se representan los resultados obtenidos al acoplar el poder reductor formado en el transporte de electrones fotosintético a la nitrato reductasa de A. chroococcum. Como se observa en dicha tabla, los cloroplastos iluminados donan los electrones a la nitrato reductasa solo a través de la ferredoxina, la cual actúa como transportador de electrones. En ausencia de ferredoxina o en la oscuridad la reacción no tiene lugar. El metil viológeno efectúa el mismo papel que la ferredoxina, sirviendo de intermediario en el transporte de electrones generados en los cloroplastos, hasta

TABLA XII

REDUCCION DE NITRATO POR LA NITRATO REDUCTASA DE A. chroococcum CON FERREDOXINA REDUCIDA POR FRAGMENTOS DE CLORO -
PLATOS DE ESPINACA ILUMINADOS

Sistema	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Completo	38
Menos ferredoxina	4
Menos nitrato reductasa	1
Completo, en la oscuridad	0
Completo, sustituyendo la Fd por MV	25

La mezcla de reacción completa contenía, en un volumen final de 2,5 ml: fragmentos de cloroplastos calentados conteniendo 0,3 mg de clorofila; nitrato reductasa, 3 mg; ferredoxina de Azotobacter, 2 mg; y lo siguiente en micromoles: tampón Tris-ClH, pH 7,5, 150; ascorbato, 20; DPIP, 0,2; Cl₂Mg, 5; NO₃K, 10. La reacción se llevó a cabo a 25°C durante 20 minutos bajo atmósfera de argón. La iluminación fue de 20.000 lux.

la nitrato reductasa.

III.F.2. *Ferredoxina reducida en la oscuridad*

Utilizando el método descrito por el grupo de San Pietro (106) para la reducción de ferredoxina, hemos podido demostrar que la ferredoxina de A. chroococcum puede ser reducida de manera apreciable con NADPH y ferredoxina-NADP⁺ reductasa de hojas de espinaca. Como revela la Tabla XIII, la actividad NADPH-nitrato reductasa depende de la presencia de ferredoxina, en ausencia de ésta o de NADP⁺-reductasa, la reducción de nitrato a nitrito no tiene lugar.

TABLA XIII

REDUCCION DE NITRATO POR LA NITRATO REDUCTASA DE A. chroococcum CON FERREDOXINA REDUCIDA POR EL SISTEMA NADPH-NADP⁺ REDUCTASA

Sistema	NO ₂ ⁻ formado (nmoles)
Completo	10
Menos ferredoxina	1
Menos ferredoxina-NADP ⁺ -reductasa	1
Menos nitrato reductasa	0

La mezcla de reacción completa contenía en un volumen final de 3 ml: nitrato reductasa, 2 mg; ferredoxina de Azotobacter, 3 mg; ferredoxina-NADP⁺-reductasa de espinaca, 2 mg; y lo siguiente en micromoles: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 150; NO₃K, 10; NADPH, 0,6. La reacción se llevó a cabo a 25°C durante veinte minutos bato atmósfera de argón.

IV. DISCUSSION

Resultados previos obtenidos en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo habían demostrado que el enzima nitrato reductasa de A. chroococcum no podía utilizar ni NADH ni NADPH como donadores de electrones. Tanto el metil como el bencil viológeno-mantenidos en estado reducido con hidrosulfito- funcionaron eficientemente como donadores de electrones para la reducción enzimática del nitrato a nitrito, mientras que los flavín nucleótidos reducidos químicamente con el mismo reductor fueron prácticamente inefectivos a este propósito (19).

Análogos resultados fueron encontrados posteriormente en la bacteria A. calcoaceticus, donde también los piridín nucleótidos fueron incapaces de actuar como donadores de electrones en la reducción del nitrato (96).

La nitrato reductasa asimilativa de bacterias, aunque todavía no ha sido estudiada en profundidad y muchas de sus características se desconocen o presentan una gran confusión, parece ser un enzima que difiere en muchos aspectos del complejo enzimático descrito en organismos eucariotas. La nitrato reductasa de plantas superiores, algas verdes y hongos ha sido descrita como un com-

plejo enzimático de elevado peso molecular (500.000 daltons), en el que van asociadas dos actividades, una actividad diaforásica y una actividad nitrato reductasa propiamente dicha, que pueden ser ensayadas independientemente utilizando aceptores o donadores de electrones artificiales (4,6,25,26,32,36,49,73,80).

En el caso de bacterias la nitrato reductasa asimilativa, soluble, es una proteína de menor peso molecular (100.000 daltons) y en la que solo se puede ensayar la actividad nitrato reductasa terminal, utilizando para ello un donador de electrones artificial. Parece pues, lógico pensar que la nitrato reductasa de estos microorganismos sea una proteína más sencilla, que equivalga al componente final del sistema enzimático reductor del nitrato en organismos más avanzados en la evolución.

Permanecía abierta la cuestión de cual sería el donador que in vivo actuaría como fuente de electrones para el enzima en la reducción de nitrato a nitrito.

En relación con este problema hay que destacar los resultados presentados por Nagay et al. (51). Purifi

caron una NAD(P)H-bencil viológeno reductasa soluble, a partir de partículas de Azotobacter vinelandii el sistema completo resultó muy efectivo como donador de electrones para la reducción de nitrato a nitrito catalizada por extractos de la bacteria nitrificante Nitrobacter agilis (97) ó por una nitrato reductasa purificada de Micrococcus denitrificans (52). El enzima catalizaba específicamente la reducción de bencil viológeno a partir de NADH ó de NADPH, ya que el metil viológeno no actuaba como aceptor de electrones, y la reacción era reversible, pudiéndose reducir NAD^+ a partir de bencil viológeno previamente reducido. El enzima descrito como NAD(P)H-bencil viológeno diaforasa no se afectaba ni por tratamiento con agentes oxidantes -como el ferricianuro- ni con agentes reductores -como el ditionito-.

Nosotros hemos encontrado que en extractos preparados a partir de la bacteria A. chroococcum se presenta actividad diaforásica, que es capaz de acoplar con el sistema reductor del nitrato propiamente dicho. Cuando el ensayo de actividad se realiza en condiciones anaeróbicas, tanto el NADH como el NADPH pueden actuar como donadores

de electrones, pero para ello se precisa un cofactor que actúe como intermediario de electrones entre el piridín nucleótido reducido y la nitrato reductasa. Tanto el metil como el bencil viológeno cumplen este papel. El hecho de que los niveles de nitrito formado utilizando bencil viológeno como cofactor sean más elevados que los alcanzados cuando se emplea metil viológeno, se puede atribuir a una mayor afinidad de la diaforasa hacia el bencil viológeno más que a una diferencia de afinidad de la nitrato reductasa hacia estos donadores artificiales, puesto que en el ensayo con hidrosulfito el metil viológeno actúa también como un donador eficiente.

Al contrario de lo que ocurre en organismos superiores, las actividades diaforásica y nitrato reductasa no se presentan asociadas en un complejo enzimático, sino que corresponden a dos proteínas enzimáticas distintas, físicamente separables, una NAD(P)H-bencil ó metil viológeno diaforasa y una nitrato reductasa. La reducción de nitrato a partir de NAD(P)H en la bacteria A. chroococcum tiene lugar en dos pasos independientes, catalizado cada uno de ellos por una proteína diferente y que requiere

re la presencia de metil ó bencil viológeno como cofactor.

Guerrero et al. (19) encontraron que la nitrato reductasa de A. chroococcum sufría una rápida inactivación en las condiciones de ensayo, o sea, a 30°C cuando se utilizaba ditionito y metil viológeno como fuente de poder reductor. Observaron que la velocidad de formación de nitrito es proporcional al tiempo sólo durante los dos o tres primeros minutos de reacción, a partir de ese momento la reacción se detenía. Como estos mismos autores encontraron también que, cuando la preparación de nitrato reductasa se incubaba a 0°C durante 5 minutos con ditionito y en presencia de concentraciones crecientes de nitrato, la inactivación total del enzima ocurría a 0,1 mM de nitrato, aunque no a concentraciones superiores (1 a 10 mM), concluyeron que la inactivación de la nitrato reductasa era debida a la acción cooperativa del ditionito y del nitrato.

En nuestro caso, cuando utilizamos los piridín nucleótidos como donadores de electrones y bencil violó-

geno como cofactor, el enzima no experimenta ningún proceso de inactivación. La velocidad de reacción permanece constante con respecto al tiempo, al menos los primeros veinte minutos de reacción. A la luz de estos datos se pueden interpretar los resultados obtenidos por Guerrero et al. como un caso concreto limitado a las condiciones de ensayo en las que se utiliza hidrosulfito para la reducción del cofactor, metil ó bencil viológeno.

Relimpio et al. (73), Vega et al. (94) y Barea (3), encontraron que la nitrato reductasa de espinaca, Chlorella y Chlamydomonas, respectivamente, poseía diferente sensibilidad hacia el cianuro, según se encontrase la proteína en forma oxidada o reducida. El cianuro ejercía un efecto fuertemente inhibitor sólo cuando el enzima se encontraba reducido por preincubación con NADH (ó con un donador de electrones de su segunda mitad, como por ejemplo, flavín nucleótido reducido). El nitrato protegía contra la inhibición, total ó parcialmente, dependiendo de su concentración. Sin embargo una vez que el enzima reducido había sido inhibido por el cianuro, el nitrato no revertía dicha inhibición. El efecto del cianuro sobre el enzima reducido se podía revertir mediante oxidación

del enzima con ferricianuro.

El grupo de Vennesland ha encontrado resultados similares en la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris (87), lo cual, junto a la existencia de pequeñas cantidades de cianuro analizadas en extractos libres de células, ha llevado a dichos autores a elaborar una teoría según la cual, una sustancia tal como el cianuro debe estar presente para que la nitrato reductasa pueda inactivarse in vivo por reducción.

Garrett y Greenbaum (17) han estudiado el efecto inhibitor de los agentes complejantes de metales, como el cianuro, sulfuro y tiourea, sobre la nitrato reductasa de Neurospora crassa, demostrando que el grado de sensibilidad del enzima hacia estos inhibidores depende del estado redox de la proteína, concluyendo que este efecto se debe a que el molibdeno del complejo enzimático tiene una mayor afinidad por el agente complejante de metales cuando está reducido.

Rivas et al. (80) ha estudiado el efecto del cianuro sobre el enzima nitrato reductasa de la levadura

Torulopsis nitratophila, observando que la acción inactivante que ejercen el cianuro y el NADPH requiere la presencia de FAD en la mezcla de preincubación, posiblemente para que el enzima pueda reducirse de manera efectiva. El nitrato protege de la inhibición y el ferricianuro la revierte una vez que ésta ha tenido lugar.

Dado que la nitrato reductasa de A. chroococcum no utiliza directamente los piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones, resultaba interesante estudiar el efecto del cianuro sobre este enzima una vez preincubado en presencia de estos reductores. Los resultados que se han obtenido confirman lo descrito en otros organismos: el enzima reducido es más sensible al cianuro que el enzima oxidado y, además, corroboran los resultados obtenidos previamente: para que la reducción del enzima con piridín nucleótidos tenga lugar se requiere la presencia de un transportador de electrones, tal como el metil ó el bencil viológeno. El efecto inactivante que se observa cuando el enzima se preincuba conjuntamente con los piridín nucleótidos en su forma reducida, bencil ó metil viológeno y cianuro, es en nuestro caso irreversible, al contrario de lo que ocurre en otros organismos. El tratamien

to con ferricnuro una vez que el enzima ha sido inacti
vado no logra reactivar al enzima. La unión del cianuro
al enzima es bastante fuerte, la diálisis del enzima pre
viamente reducido y tratado con cianuro no es capaz de
restaurar su actividad original, lo que indica que el en
zima ha sufrido una modificación permanente que no se
revierte por diálisis.

Como en la actividad nitrato reductasa dependien
te de piridín nucleótidos en A. chroococcum intervienen
dos actividades enzimáticas que corresponden a dos proteí-
nas distintas, tratamos de averiguar en cual de las dos
actividades se localizaba el efecto del cianuro, observán-
dose que el tratamiento con cianuro en condiciones reduc-
toras afectaba tan solo a la actividad nitrato reductasa
propriamente dicha.

Hemos estudiado el efecto de las condiciones
oxidantes sobre la nitrato reductasa de A. chroococcum.
La nitrato reductasa de este organismo se comporta ante
las condiciones oxidantes de muy distinto modo a como lo
hacen las nitrato reductasas de otros organismos, tanto

fotosintéticos como no fotosintéticos (2,3,24,35,37,43, 72,79,87). La preincubación del enzima en presencia de ferricianuro provoca una inactivación casi instantánea de la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno reducido. Esta inactivación es reversible mediante la adición de ditioeritritol; otros tioles ensayados tales como la cisteína y el glutatión reducido, no tienen ningún efecto reactivante.

En relación con estos resultados están los descritos por Rivas (78) en la levadura T. nitratophila, donde las condiciones oxidantes producían una fuerte inactivación de la nitrato reductasa, inactivación que era reversible por por la adición de tioles.

Se ha descrito que la actividad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa de plantas superiores y algas verdes, es sensible al tratamiento térmico. El calentamiento a 45°C durante 5 min del enzima de Chlorella, inactiva completamente la NADH-diaforasa sin afectar a la FNH₂-nitrato reductasa (103).

Idéntica sensibilidad a este tratamiento exhiben la NADH diaforasa de espinaca (34,73) y de Chlamydomonas reinhardtii (3,5), lo cual da lugar a la pérdida de la capacidad de reducción del nitrato por el NADH, catalizada por el complejo enzimático en conjunto. La inactivación por el calor de la nitrato reductasa puede prevenirse si el tratamiento se hace en presencia de concentraciones muy pequeñas de FAD (3,103).

Resultados similares se han obtenido en la levadura T. nitratophila. El tratamiento térmico a 35°C durante 5 min provocaba la pérdida de la actividad dependiente de NADPH. El FAD protegía de dicha inactivación. El calentamiento afectaba a la actividad diaforasa, mientras que la actividad dependiente de metil viológeno reducido resistía temperaturas de hasta 50°C. En contraste con la nitrato reductasa terminal, la segunda mitad del complejo NADPH-nitrito reductasa era termolábil. La inactivación sufrida por tratamiento a 40°C durante 5 min, se protegía mediante agentes reductores, tales como el ditionito y el ascorbato (78).

Los resultados que nosotros hemos obtenido al investigar los efectos del tratamiento térmico sobre la nitrato reductasa de A. chroococcum, demuestran que la actividad nitrato reductasa dependiente de metil viológeno experimenta un incremento notable de su actividad cuando se preincuba a temperaturas crecientes. La máxima reactivación se alcanza una vez preincubado el enzima durante 5 min a 40°C. A la vista de estos resultados era interesante estudiar si una vez sometido el enzima a dicho tratamiento presentaría una cinética lineal con respecto al tiempo, porque se hubiera desensibilizado su capacidad de inactivación. Los resultados fueron negativos, el enzima una vez calentado a 40°C, aunque era más activo, seguía presentando el mismo tipo de cinética que el enzima no tratado, es decir, al cabo de los primeros minutos de reacción la velocidad de formación de nitrito se detiene.

La posibilidad de que dicho efecto se debiera a la destrucción de la nitrito reductasa que interfiriera en el ensayo, fué descartada ya que las preparaciones enzimáticas utilizadas, parcialmente purificadas, carecían de actividad nitrito reductasa.

La actividad diaforasa, aunque en los resultados no se presenta, es también muy resistente al calor, y si bien no experimenta un incremento en su actividad, resiste temperaturas de hasta 50°C.

El efecto de la temperatura sobre la nitrato reductasa se puede explicar como debido a un cambio de conformación que hace más accesible el sitio de unión de los sustratos a la molécula de enzima.

Un efecto similar fue el descrito por Rigano (75) en la bacteria termofílica Cyanidium caldarium. La nitrato reductasa latente de dicho organismo se reactivaba mediante tratamiento a 42°C durante 5 min. La reactivación se localizaba en la actividad dependiente de bencil viológeno, mientras que la actividad diaforasa se perdía después de dicho tratamiento.

Recientemente McGregor (47,48) ha observado como el tratamiento térmico a pH alcalino provoca un aumento de la actividad de la nitrato reductasa respiratoria de Escherichia coli. Dicha activación podía ser debida a dos factores según el autor : a que en las condi

ciones descritas el enzima se solubiliza de las membranas por acción de una proteasa, haciendo más accesible el sitio activo al donador de electrones, ó a que el sitio donde el metil viológeno se une al enzima se encuentra bloqueado por la subunidad C, subunidad cuya unión al complejo enzimático es sensible a la temperatura y se libera tras el tratamiento a 60°C, permitiendo el acceso al metil viológeno.

Uno de los problemas más interesantes y que más está siendo objeto de estudio dentro del amplio campo del metabolismo del nitrógeno nítrico, es el de la regulación de los enzimas que intervienen en dicho proceso. Es lógico pensar que una senda metabólica de la importancia de la ruta de la asimilación del nitrato, deba estar controlada en la célula por unos mecanismos de regulación muy eficaces que aseguren su economía, tanto de energía como de materiales.

En relación con este problema se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos realizados en nuestro Departamento que el amoníaco, producto final de la ruta

catalizada por el sistema reductor del nitrato, provoca in vivo la inactivación reversible de la segunda mitad del complejo NADH-nitrato reductasa en las algas verdes Chlorella (35) y Chlamydomonas (24). Este efecto del amoníaco parece ser indirecto, en el sentido de que este derivado inorgánico de nitrógeno actúa como un desacoplante de la fotofosforilación, dando lugar a una elevación de los niveles celulares de piridón nucleótido reducido y de ADP (37). En apoyo de esta hipótesis, la carencia de oxígeno en los cultivos de Chlamydomonas también se traduce en la inactivación de la nitrato reductasa (37). La conversión in vitro de la nitrato reductasa activa de Chlorella en su forma inactiva depende de su reducción por NADH en la presencia de ADP, y se protege por el nitrato a alta concentración (43). En el caso del alga verde Chlamydomonas, la inactivación de la nitrato reductasa in vitro se consigue mediante preincubación del enzima en presencia de NAD(P)H y de ADP, aunque el efecto de este último no es específico: el efecto potenciador que el ADP ejerce sobre la inactivación por NADH o NADPH, se consigue de igual manera con otros nucleótidos, de purina y pirimidina, con distintos grados de fosforilación (3).

La transformación es reversible, ya que, si el enzima inactivo -extraído en esta forma de las células o conseguido por tratamiento in vitro- se somete a reoxidación vuelve a ser activo (3,26,43,49).

Rigano (74) ha encontrado que la nitrato reductasa del alga Cyanidium caldarium se inactiva reversiblemente por amoniaco, sugiriendo que dicho efecto pudiera ser debido a una acción directa del amoniaco, ó de algún compuesto derivado del mismo, sobre el enzima (76,77).

Este fenómeno de interconversión parece ser una propiedad general de la nitrato reductasa, más que una particularidad de células fotosintéticas, ya que se ha observado también en los enzimas de las levaduras Hansenula anomala (72) y Torulopsis nitratophila (79).

Por lo que respecta a la regulación del sistema asimilador de nitrato en organismos procarióticos se ha comunicado que, a nivel celular, tanto en A. vinelandii como en E. coli estirpe Jamagutchi, se requiere oxígeno como cofactor esencial tanto para la reducción de nitrato a nitrito como para la reducción de nitrito a amoniaco (89).

A nivel subcelular Guerrero et al (19) han descrito que la nitrato reductasa de A. chroococcum puede ser inactivada rápidamente por el agente reductor hidrosulfito en presencia de bajas, pero no de altas, concentraciones de nitrato. Por otra parte, durante el ensayo de la nitrato reductasa, la inactivación del enzima tiene lugar en presencia de concentración alta de nitrato en muy pocos minutos, bien por la acción directa del nitrato sobre el enzima reducido, o indirectamente a través de la formación en la mezcla de reacción de un derivado del nitrato. Esta última posibilidad parecía poco probable pues al ensayar, como agentes inactivantes del enzima, posibles derivados de la interacción del nitrato con el enzima y el hidrosulfito, los resultados fueron negativos. En sus trabajos discutían las posibles actuaciones del nitrato, el cual no se limitaría al de simple sustrato del enzima, sino que podría actuar como posible efector ó modulador de la actividad nitrato reductasa. La inactivación por hidrosulfito, en condiciones en las que el enzima y demás componentes de la mezcla se preincubaban a 0°C, requería la presencia de nitrato en pequeñas concentraciones. Daban al nitrato un papel de efector negativo en las mencionadas condiciones. Dicha inac-

tivación implicaría la unión del nitrato al enzima en un sitio diferente de donde lo hace cuando actúa como sustrato; este diferente sitio activo presentaría una afinidad variable por el nitrato, afinidad que sería muy alta para el enzima reducido; ó alternativamente, la unión del nitrato a la molécula de enzima, tanto al actuar de sustrato como de inactivante, se haría en un único sitio, teniendo lugar la inactivación al producirse la unión cuando el enzima se halle en estado reducido.

También Guerrero et al., en el trabajo que estamos refiriendo, encontraron que el cianato -un inhibidor de tipo competitivo con el nitrato de la nitrato reductasa de otros organismos (73,87,95), protege a la nitrato reductasa de A. chroococcum contra la inactivación por hidrosulfito y nitrato y puede revertir el proceso una vez que éste ha tenido lugar. Su efecto podría resultar debido a una acción sobre la molécula de enzima de manera que posibilite su reoxidación por el nitrato, reoxidación que el nitrato por sí solo no podría efectuar. El metil viológeno, si bien no revertía la inactivación, protegía contra la misma si se añadía en la

mezcla de preincubación (19).

Con objeto de estudiar el papel del nitrato en la inactivación de la nitrato reductasa de A. chroococcum, hemos abordado el problema sometiendo al enzima a tratamientos distintos de los descritos por Guerrero et al. Hemos encontrado que la inactivación por hidrosulfito de la nitrato reductasa es dependiente de la temperatura. Cuando el enzima se preincuba a 30°C la inactivación por hidrosulfito no requiere la presencia de nitrato a bajas concentraciones. También en este caso el metil viológeno protege contra la inactivación que tiene lugar durante la preincubación. El cianato no solo protege, sino que revierte el efecto inactivante del hidrosulfito. Sin embargo, el nitrato aún en concentraciones elevadas, no es capaz de proteger al enzima contra la inactivación.

Teniendo en cuenta estos nuevos resultados, podríamos explicar el efecto del nitrato a bajas concentraciones, descritas por Guerrero et al. análogo al efecto que puede ejercer la temperatura y que nosotros hemos encontrado ahora. Posiblemente el nitrato se une al enzima provocando un cambio conformacional que hace el sitio

activo más accesible al agente reductor, teniendo lugar de esta manera, la inactivación del enzima. El mismo cambio conformacional puede ser provocado mediante tratamiento térmico, siendo entonces innecesario el nitrato para que se lleve a cabo la inactivación. Por otra parte, ya hemos visto cómo el tratamiento térmico daba lugar a un incremento en la actividad del enzima, debido, aparentemente, a un cambio en la conformación de la molécula que la hace más accesible a los sustratos. El hecho de que el nitrato no proteja en estas condiciones se podría explicar asumiendo que los cambios conformacionales provocados por la temperatura hacen accesible el agente reductor no solo al sitio activo, sino a otros grupos que sin formar parte del sitio catalítico juegan un papel importante en la estructura enzimáticamente activa.

La protección ejercida por el metil viológeno contra la inactivación de la nitrato reductasa durante la preincubación con hidrosulfito es difícil de interpretar. Una explicación posible es que el metil viológeno desvíe los electrones del hidrosulfito al oxígeno, química o enzimáticamente, protegiendo parcialmente

contra la inactivación.

La inactivación por ditionito de la nitrato reductasa explica la dificultad encontrada por Lowe y Evans (41) en la purificación en condiciones reductoras de la nitrato reductasa de Rhizobium japonicum cuando no se añadía bencil viológeno, probablemente el papel del viológeno sea el de proteger contra la inactivación provocada por el ditionito.

Recientemente, Kennedy y col. (31) han purificado una nitrato reductasa de bacteroides de R. japonicum que se inactiva en presencia de ditionito. El metil viológeno protege totalmente contra dicha inactivación, manteniéndose la velocidad de reacción lineal con respecto al tiempo. La inactivación no es reversible mediante la oxidación en una atmósfera de oxígeno, ni se protege por la presencia del nitrato.

Como es sabido, la ferredoxina reducida es el donador de electrones de la nitrito reductasa de plantas, algas verdes y algas verde-azuladas (6,38,39,45). Por otra parte, existe evidencia experimental de que en otros

organismos la ferredoxina es requerida tambien para la reducci3n de nitrato a nitrito. Los primeros trabajos que describen a la ferredoxina como fuente de electrones para la reducci3n enzimática del nitrato proceden de Hattori y Myers (20,22,58). Encontraron que en preparaciones particuladas de Anabaena cylindrica que contenían actividad nitrato reductasa, ésta podía aceptar los electrones de la ferredoxina reducida por acci3n del fotosistema I ó por NADPH y NADP⁺-reductasa. La ferredoxina reducida con ditionito no actuaba como fuente de electrones.

Posteriormente Hattori (23) encontró que una vez que la nitrato reductasa es solubilizada de las membranas mediante tratamiento con Trit3n X-100, no podía utilizar la ferredoxina como reductor, solo las flavinas o los viol3genos reducidos actuaban como donadores de electrones.

Recientemente Chiba et al. (12) y Manzano et al. (45) han demostrado la existencia de una nitrato reductasa dependiente de ferredoxina en la bacteria anaer3bica estricta Clostridium perfringens y en el alga verde

azulada Anacystis nidulans, respectivamente.

Por último, y precisamente cuando parte de este trabajo estaba en prensa, Malofeeva et al. (44) han descrito una nitrato reductasa dependiente de ferredoxina en la bacteria sulfurosa Ectothiorhodospira shaposhnikovii.

Dado que hasta ahora se desconocía cual era el donador de electrones que in vivo intervendría en la reacción catalizada por la nitrato reductasa de A. chroococcum, nos pareció interesante abordar este problema como paso fundamental en la comprensión de cual es el mecanismo de reducción de nitrato en esta bacteria. Se sabía que los viológenos reducidos, compuestos no fisiológicos, actuaban como donadores eficaces. Del mismo modo, y como se ha descrito anteriormente en este trabajo, encontramos que los piridín nucleótidos reducidos actuaban como fuente de poder reductor con la intervención indispensable de un eslabón intermedio, metil ó bencil viológeno. Esto nos llevó a investigar el papel que podría jugar en la reducción del nitrato la ferredoxina, compuesto fisioló-

gico presente en las células de A. chroococcum, que había sido descrita como requerimiento para la fijación del nitrógeno en este organismo y que, como hemos visto, en otros organismos interviene en la reducción de nitrato a nitrito.

Nuestros resultados demuestran que la nitrato reductasa de A. chroococcum depende de ferredoxina como donador inmediato de electrones. Acoplando el poder reductor, generado en cloroplastos de espinaca iluminados, a la nitrato reductasa, la ferredoxina de esta bacteria fijadora de nitrógeno, actúa como donador de electrones para la conversión enzimática de nitrato a nitrito. La ferredoxina reducida enzimáticamente en la oscuridad, con NADPH y NADP^+ reductasa de hojas de espinaca, también interviene como fuente de electrones, si bien el rendimiento es bastante más pobre.

Con estos resultados era presumible que podríamos acoplar el sistema NAD(P)H-NADPH diáforasa y la actividad nitrato reductasa a través de la ferredoxina, sustituyendo a los viológenos. Sin embargo, la reducción de nitrato no se consiguió en el sistema constituido por NAD(P)H-diaforasa ,

ferredoxina y nitrato reductasa de A. chroococcum.

Varias hipótesis podrían explicar los resultados infructuosos de este experimento:

1º La reducción de la ferredoxina por la NAD(P)H-diaforasa está sujeta a algún tipo de control metabólico, como ocurre en Clostridium pasteurianum (29) y en Clostridium kluyveri (27,28). Así, el grupo de Thauer en Alemania ha encontrado que, la reducción de ferredoxina por NADH en C. pasteurianum y C. kluyveri es estrictamente dependiente de Acetil CoA. La reducción de metil viológeno a partir de NADH no precisa, sin embargo, ningún efector, como es el caso estudiado por nosotros en A. chroococcum. Por otra parte, la formación de H₂ a partir de NADPH en C. kluyveri es una reacción que depende de ferredoxina. El sistema requiere específicamente NAD, siendo el NADH un efector negativo.

2º La actividad nitrato reductasa dependiente de NAD(P)H requiere, además de la NADPH-diaforasa, ferredoxina y nitrato reductasa, otro(s) factor(es)

presente(s) en las células de A. chroococcum. En relación con esto hay que señalar que existen precedentes que demuestran la necesidad de la acción combinada de la azotoflavina y ferredoxina en la fijación del nitrógeno por la nitrogenasa de A. chroococcum (99) y A. vinelandii (100).

3º La reducción de la ferredoxina tiene lugar por un mecanismo no ligado a los piridín nucleótidos reducidos. En este contexto hemos de citar que Bothe y Falkenberg (7) y el grupo de Stewart (9), han conseguido detectar una actividad descarboxilante del piruvato, estimulada por ATP, CoA y un protector de grupos -SH, que genera ferredoxina reducida en extractos de A. cylindrica, habiéndose identificado con el enzima piruvato-ferredoxina óxido reductasa. Estos mismos autores han demostrado conclusivamente que la actividad descarboxilante del piruvato es independiente de la catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, y sugerido que el papel fisiológico de aquélla es producir ferredoxina reducida para ser utilizada en la asimilación del nitrógeno a amonio.

Es obvio que Anabaena puede utilizar también el transporte de electrones fotosintéticos para generar ferredoxina reducida, pero en la oscuridad y en los organismos aerobios no fotosintéticos, la piruvato ferredoxina óxidoreductasa puede jugar un papel importante en la transferencia de poder reductor desde el piruvato hasta las reacciones catalizadas por la nitrogenasa y por la nitrato reductasa. De hecho, los datos obtenidos por el grupo de Stewart (9) in vitro confirman la evidencia obtenida previamente in vivo de que la piruvato-ferredoxina óxidoreductasa transfiere electrones desde el piruvato a la nitrogenasa en A. cylindrica.

La verificación de alguna de estas tres hipótesis deberá ser objeto de estudios posteriores que conduzcan al conocimiento del reductor fisiológico de la ferredoxina y, en consecuencia, del sistema reductor de nitrato en la bacteria A. chroococcum.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha encontrado que una preparación de nitrato reductasa parcialmente purificada de Azotobacter chroococcum, puede utilizar los piridín nucleótidos reducidos para la reducción de nitrato a nitrito. La transferencia de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato es estrictamente dependiente de metil o bencil viológeno.
2. Se ha demostrado que la reducción de nitrato con NAD(P)H tiene lugar en dos pasos catalíticos independientes, catalizado cada uno de ellos por una proteína diferente: NAD(P)H metil (bencil)-viológeno diaforasa y metil-viológeno reducido-nitrato reductasa, las cuales han sido separadas físicamente.
3. Nuestros resultados han demostrado que la nitrato reductasa de A. chroococcum carece de la mitad diaforásica presente en el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de plantas superiores, algas verdes y hongos.
4. La cinética de la formación de nitrito cuando se utiliza metil viológeno reducido enzimáticamente con NAD(P)H es lineal con respecto al tiempo. Por el contrario, si el donador de electrones de la nitrato reductasa de A. chroococcum es metil viológeno reducido químicamente con hidrosulfito, la reacción se detiene a los pocos minutos de comenzar, como ya había sido descrito previamente.

5. La nitrato reductasa exhibe un elevado grado de sensibilidad a la inhibición por cianuro cuando el enzima se reduce con la actividad NAD(P)H-metil viológeno diaforasa. El nitrato protege al enzima contra esta inactivación. El cianuro unido a la nitrato reductasa en estas condiciones no se libera de la proteína ni por diálisis ni por tratamiento con agentes oxidantes.
6. El ferricianuro potásico inactiva reversiblemente a la metil viológeno-nitrato reductasa de A. chroococcum. La inactivación se puede revertir mediante tratamiento con ditioeritritol, pero no por otros tioles ensayados, como la cisteína y el glutatión reducido.
7. Cuando la preparación de nitrato reductasa se somete a un tratamiento térmico de 40° durante 5 minutos, la actividad metil viológeno-nitrato reductasa experimenta un aumento considerable.
8. La nitrato reductasa de A. chroococcum se inactiva drásticamente por tratamiento con hidrosulfito sódico a 30°.
9. La inactivación de la nitrato reductasa por hidrosulfito es de naturaleza reversible. El cianato, y en menor proporción el metil viológeno, protegen contra la inac-

tivación por hidrosulfito. El cianato, además, es capaz de revertir el proceso una vez que éste ha ocurrido. El nitrato no evita la inactivación de la nitrato reductasa por el hidrosulfito.

10. Acoplando el poder reductor generado por cloroplastos iluminados de espinaca a la nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum, se ha demostrado que la ferredoxina reducida de esta bacteria aerobia es un donador de electrones para la conversión enzimática de nitrato a nitrito.
11. Utilizando un sistema modelo constituido por ferredoxina-NADP⁺ reductasa de espinacas y las proteínas de Azotobacter ferredoxina y nitrato reductasa, se ha observado una actividad significativa de nitrato reductasa con NADPH y dependiente de ferredoxina.
12. La identificación del enzima o enzimas, que cataliza(n) la transferencia de equivalentes de reducción entre el donador nativo de electrones y la ferredoxina de A. chroococcum para la reducción de nitrato -así como para la fijación de nitrógeno- queda aún por dilucidar.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D.I. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol., 24, 1-15 (1949).
2. BAREA, J.L., SOSA, F.M., ORTEGA, T. Regulación de la NADH-nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi: Inactivación reversible in vivo e in vitro. Ann. Edaf. Agrobiol., 33, 1045-1054 (1974).
3. BAREA, J.L. El sistema reductor de nitrato de Chlamydomonas reinhardi. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1974).
4. BAREA, J.L., y CARDENAS, J. The nitrate reducing system of Chlamydomonas reinhardi. Arch. Microbiol., 105, 21-25 (1975).
5. BAREA, J.L., MALDONADO, J.M., CARDENAS, J. The nitrate reductase complex from Chlamydomonas reinhardi. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca, Resúmenes, d, 102.
6. BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495-522 (1969).
7. BOTHE, H. and FALKENBERG, B. Demonstration and possible role of a ferredoxina-dependent pyruvate decarboxilation in the nitrogen-fixing blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant Sci. Letters, 1, 151-156 (1973).

8. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. and PALACIAN, E. Nitrate reductase from Spinacea oleracea. Effects of sulfhydryl-group reagents on the activities of the complex and the inactivation by NADH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 2 (1975).
9. CODD, G.A., ROWELL, P., STEWART, W.D.P. Pyruvate and nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga Anabaena cylindrica. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61, 424-431 (1974).
10. COOK, K.A., SORGER, G.I. The metabolic control of nitrite reductase in Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta*, (Amst.), 177, 412-420 (1969).
11. CHENIAE, G. and EVANS, H.J. Physiological studies on nodule-nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 35, 454-462 (1960).
12. CHIBA, S. and ISHIMOTO, M. Ferredoxin-linked nitrate reductase from Clostridium perfringens. *J. Biochem.*, 73, 1315-1318 (1973).
13. DOWNEY, R.J. Characterization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase of Aspergillus nidulans. *J. Bacteriol.*, 105, 759-768 (1971).

14. ENOCH, H.G. and LESTER, R.L. The role of a novel Cytochrome b-containing nitrate reductase and Quinone in the in vitro reconstruction of formate-nitrate reductase activity of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 1234-1241 (1974).
15. GARRETT, R.H., NASON, A. Further purification and properties of Neurospora nitrate reductase. J. Biol. Chem., 224, 2870-2882 (1969).
16. GARRETT, R.H. The induction of nitrite reductase in Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta, 264, 481 - 489 (1972).
17. GARRETT, R.H. and GREENBAUM, P. The inhibition of the Neurospora crassa nitrate reductase complex by metal binding agents. Biochim. Biophys. Acta, 302, 24-32 (1973).
18. GAUTHIER, D.K., CLARK-WALKER, G.D., GARRARD, W.T. and LASCELLES, J. Nitrate reductase and soluble Cytochrome c in Spirillum itersonii. J. Bacteriol., 102, 797-803 (1970).
19. GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. and LOSADA, M. Preparation and purification of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Arch. Mikrobiol., 91, 287-304 (1973).

20. HATTORI, A. and MYERS, J. Nitrate and nitrite reduction by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. Plant Physiol., 40, (1965).
21. HATTORI, A. and MYERS, J. Reduction of nitrate by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. I. Reduction of nitrite to ammonia. Plant Physiol., 41, 1031-1036 (1966).
22. HATTORI, A. and MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. II. Reduction of nitrate to nitrite. Plant Cell. Physiol., 8, 327-337 (1967).
23. HATTORI, A. Solubilization of nitrate reductase from the blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant Cell. Physiol., 11, 975-978 (1970).
24. HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. and LOSADA, M. Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003 (1972).
25. HEWITT, E.J. and NICHOLAS, D.J.D. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. En: Modern Methods of Plant Analysis, vol. 7, pp. 67-169 (1964). Berlin: Springer-Verlag.

26. JETSCHMANN, K., SOLOMONSON, L.P., YENNESLAND, B. Activation of nitrate reductase by oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, (Amst.), 275, 276-278 (1972).
27. JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., RUPRECHT, E., OHRLOFF, C. and DECKER, K. Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell free system of Clostridium kluyveri. *FEBS Letters*, 3, 1440146 (1969)
28. JUNGERMANN, K., RUPRECHT, E., OHRLOFF, C., THAUER, R.K. and DECKER, K. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in Clostridium kluyveri. *J. Biol. Chem.*, 246, 960-963 (1971).
29. JUNGERMANN, K., KIRCHIAWY, H., KATZ, N., and THAUER, R.K. NADH, a physiological electron donor in Clostridia nitrogen fixation. *FEBS Letters*, 43, 203-206 (1974).
30. KATOH, T. Nitrate reductase in photosynthetic bacterium, Rhodospirillum rubrum. Purification and properties of nitrate reductase in nitrate adapted cells. *Plant Cell. Physiol.*, 4, 13-28 (1962).
31. KENNEDY, I.R., RIGAUD, J., TRINCHANT, J.C. Nitrate reductase from bacteroids of Rhizobium japonicum: Enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta*, 397, 24-35 (1975).

32. KESSLER, E. IV. Stoffwechsel anorganischer N. Verbindungen. Forst. Bot., 33, 95-103 (1971).
33. LODE, E.T. and COON, M.J. Enzymatic w-oxidation. V. Forms of Pseudomonas oleovorans rubredoxin containing one or two iron atoms: structure and function in w-hydroxylation. J. Biol. Chem., 246, 791-801 (1971).
34. LOSADA, M., APARICIO, P.J. and PANEQUE, A. Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH. En: Progress in Photosynthesis Research, vol. III, editado por H, Metzner, Institut fur Chemische Pflanzenphysiologie, Tubingen (1969), pp. 1504-1509.
35. LOSADA, M. The assimilatory nitrate reducing system and its regulation by ammonia in Chlorella. En: 1st International Symposium on Metabolic Interconversion of Enzymes. Outlines of the paper, pp. 59-64. S. Margherita, Italia (1970).
36. LOSADA, M. La fotosíntesis del nitrógeno nítrico. Real Academia de Ciencias, Madrid 1972.
37. LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M. and PANEQUE, A. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Letters, 1, 31-37 (1973).
38. LOSADA, M. and PANEQUE, A. Nitrite reductase. Methods Enzymol., 23, 487-491 (1971).

39. LOSADA, M. Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. En: 3rd International Symposium of Metabolic Interconversion of Enzymes. Seattle, USA (1973).
40. LOVENBERG, W. En: Ferredoxin and rubredoxin. Microbial Iron Metabolism. A Comprehensive Treatise. pp. 161-182. Edited by J.B. Neidlans. Academic Press, Inc. 1974.
41. LOWE, R.H. and EVANS, H.J. Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from Rhizobium japonicum. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 85, 377-389 (1964).
42. LOWRY, O.H, ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein measurements with the folin phenol reagents. J. Biol Chem., 193, 265-275 (1951).
43. MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. and LOSADA, M. Reversible inactivation by NADH and ADP of Chlorella fusca nitrate reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27-33 (1973).
44. MALOFEEVA, I.V., KONDRATIEVA, E.N. and RUBIN, A.B. Ferredoxin-linked nitrate reductase from the phototrophic bacterium Ectothiorhodospira Shaposhnikovi. FEBS Letters, 53, 2 (1975).
45. MANZANO, C., CANDAU, P., GOMEZ-MORENO, C., RELIMPIO, A.M. and LOSADA, M. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of Anacystis nidulans (Submitted to Mol. Cell. Biol.).

46. MCGREGOR, C.H., SCHNAITMAN, C.A., NORMANSELU, D.E. and HODGINS, M.G. Purification and properties of nitrate reductase from E. coli K 12. J. Biol. Chem., 249, 5321-5327 (1974).
47. MCGREGOR, C.H. Solubilization of Escherichia coli nitrate-reductase by a membrane-bound protease. J. Bacteriol., 121, 1102-1110 (1975).
48. MCGREGOR, C.H. Anaerobic cytochrome b₁ in Escherichia coli: Association with and regulation of nitrate reductase. J. Bacteriol., 121, 111-116 (1975).
49. MORENO, C.G., APARICIO, P.J., PALACIAN, E. and LOSADA, M. Interconversion of the active and inactive forms of Chlorella nitrate reductase. FEBS Letters, 26, 11-14 (1972).
50. MORTENSON, L.E., VALENTINE, R.C. and J.E. CARNAHAM. An electron transport from Clostridium pasterianum. Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 448-452 (1962).
51. NAGAY, Y., ELLEWAY, R.F., NICHOLAS, D.J.D. Some properties of an NADH-benzyl viologen reductase from Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta (Amst), 153, 766-776 (1968).
52. NAIK, M.S. and D.J.D. NICHOLAS. Reduction of viologen dyes and a non-haem iron protein by NADH in particles from Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta, 131, 204-207 (1967).

53. NASON, A., ABRAHAM, R.G. and AUERBACH, B.C. The enzymic reduction of nitrite to ammonia by reduced pyridine nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*, 15, 159-161 (1954).
54. NASON, A. Symposium on metabolism of inorganic compounds II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite and hydroxylamine metabolisms. *Bacteriol. Rev.*, 26, 16-41 (1962).
55. NICHOLAS, D.J.D. and NASON, A. Diphosphopyridine nucleotide nitrate reductase from Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 69, 580-583 (1955).
56. NICHOLAS, D.J.D. and NASON, A. Determination of nitrate and nitrite. En: Methods in Enzymology, vol. 3, pp. 981-984. Edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New York. Academic Press (1957).
57. NICHOLAS, D.J.D., MEDINA, A. and JONES, O.T.G. A nitrite reductase from Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*, 37, 468-476 (1960).
58. OHMORI, K. and HATTORI, A. Induction of nitrate and nitrite reductases in Anabaena cylindrica. *Plant Cell. Physiol.*, 11, 873-878 (1970).
59. PANEQUE, A. and ARNON, D.I. Photoproduction of Hydrogen gas with ascorbate. *Plant Physiol.*, 37, supp. 4 (1962).
60. PATEMAN, J.A., REVER, B.M. and COVE, D.J. Genetic and biochemical studies of nitrate reduction in Aspergillus nidulans. *Biochem. J.*, 104, 103-111 (1967).

61. PAYNE, W.J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 409-452 (1973)
62. PICHINOTY, F. A propos des nitrate-reductases d'une bacterie denitrifiante. *Biochim. Biophys. Acta*, 89, 378-381 (1964).
63. PICHINOTY, F. Les nitrate-reductases bacteriennes. I. Substrats. ét al particulaire et inhibiteurs de l'enzyme A. *Arch. Mikrobiol.*, 68, 51-64 (1969).
64. PICHINOTY, F. Les nitrate reductases bacteriennes. II. Comportement de l'enzyme A envers les donneurs d'electrons. *Arch. Mikrobiol.*, 68, 65-73 (1969).
65. PICHINOTY, F. Les nitrate-reductases bacteriennes. III. Proprietés de l'enzyme B. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 875-890 (1969).
66. PICHINOTY, F. Les nitrate-reductases bacteriennes. IV. Regulation de la biosynthese et de l'activé de l'enzyme B. *Arch. Mikrobiol.*, 71, 116-122.
67. PICHINOTY, F. Les nitrate-reductases bacteriennes. VIII. Eutde preliminaire de l'enzyme de Microccus halodenitrificans, 76, 83-90 (1971).
68. PICHINOTY, F., AZOULAY, E., COUCHOUD-BEAUMONT, P., Le Minor, L., RIGANO, C., BIGLIARDI-ROUVIER, J. and PIECHAUD, M. Recherche des nitrate reductases bacteriennes A et B: results. *Ann. Inst. Pasteur.*, 116, 27-42 (1969).

69. PICHINOTY, F. and D'ORDANO, L. Inhibition by oxygen of biosynthesis and activity of nitrate reductase in Aerobacter aerogenes. Nature (London), 191, 879-881 (1961).
70. PICHINOTY, F. and METENIER, G. Regulation de la biosynthese et localization de la nitrate reductase 'Hansenula anomala. Ann. Inst. Pasteur, 112, 701-711 (1967).
71. PICHINOTY, F. and PIECHAUD, M. Recherche des nitrate-reductases bacteriennes A et B: methodes. Ann. Inst. Pasteur, 114, 77-98 (1968).
72. PICHINOTY, F. and G. METENIER. Contribution a l'etude de la nitrate reductase assimilatrice d' une levure. Annales de L'Institut Pasteur, 111, 282-313 (1966).
73. RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. and LOSADA, M. Specific protection against inhibition of the NADH-nitrate reductase complex from Chlorella. FEBS Letters, 17, 226-230 (1971).
74. RIGANO, C. Studies on nitrate reductase from Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 76, 265-276 (1971).
75. RIGANO, C. and VIOLANTE, V. Effect of heat treatment on the activity in vitro of nitrate reductase from Cyanidium caldarium. Biochim. Biophys. Acta, 256, 524-532 (1972).

76. RIGANO, C. and VIOLANTE, V. Effect of nitrate, ammonia and nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 90, 27-33 (1973).
77. RIGANO, C., ALLIOTA, G. and VIOLANTE, U. Presence of high levels of nitrate reductase activity in Cyanidium caldarium grown on glutamate as the sole nitrogen source. Plant Sci. Letters, 2, 277-281 (1974).
78. RIVAS, J. Caracterización del sistema reductor de nitrato de la estirpe M-14 del alga Chlorella fusca y de la levadura Torulopsis nitratophila. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).
79. RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A. and LOSADA, M. Characterization of the nitrate reducing system of the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 1, 105-113 (1973).
80. RIVAS, J., TORTOLERO, M^a and PANEQUE, A. Metal components of the nitrate reducing system from the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 2, 283-288 (1974).
81. RUIZ-HERRERA, J. and DE MOSS, J.A. Nitrate reductase complex of Escherichia coli K-12: participation of specific formate dehydrogenase and cytochrome b₁ components in nitrate reductase. J. Bacteriol., 99, 720-729 (1969).
82. RUIZ-HERRERA, J. and VILLAREAL MOGUEL, E.I. En Isozymes II. Physiological Function Proceedings of the third International Conference on Isozymes held at Yale Univ.

New Haven, Conn, April 1974. Edited by C.L. Markert.
Academic Press, 1975, pág. 539.

83. SHIN, M. TAGAWA, K and ARNON, D.I. Cristalization of ferredoxin NADP reductase from spinach leaves. *Biochem. Z.*, 338, 84-87 (1963).
84. SIEKER, I.C., ADMAN, E. and JENSEN, L.H. Structure of the Fe-S complex in a bacterial ferredoxins. *Nature (London)*, 40-42 (1972).
85. SILVER, W.S. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from Hansenula anomala, a nitrate reducing yeast. *J. Bacteriol.*, 73, 241-246 (1957).
86. SNELL, F.D. and SNELL, C.T. Colorimetric methods of analysis, p. 804. New York: D. Van Nostrand Company (1949).
87. SOLOMONSON, L.P. and VENNESLAND, B. Properties of a nitrate reductase of Chlorella. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*, 267, 544-557 (1972).
88. TAGAWA, K. and ARNON, D.I. Ferredoxin as electron carriers in Photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature (London)*, 195, 537-543 (1962).
89. TAKAHASHI, H., TANIGUCHI, S. and EGAMI, F. Inorganic nitrogen compounds: distribution and metabolism. En: Comparative Biochemistry, vol. 5, pp. 91-202. Eds. M. Florin y H.S. Mason, New York. Academic Press (1963).

90. TANIGUCHI, S. and OHMACHI, K. Particulate nitrate reductase of Azotobacter vinelandii. J. Biochem., 48, 50-62 (1960).
91. TORTOLERO, M^a, VILA, R. and PANEQUE, A. Ferredoxin-dependent nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Plant Sci. Letters, 5, 141-145 (1975).
92. TORTOLERO, M^a y PANEQUE, A. Reducción del nitrato por la nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum con NAD(P)H. XIII Reunión S.E.B., Madrid (1974)
93. TORTOLERO, M^a, VILA, R. y PANEQUE, A. El cofactor fisiológico de la nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum. VI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica, Sevilla, Abril 1975, Resúmenes pág 76.
94. VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J. PANEQUE, A. and LOSADA, M. Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant. Physiol., 48, 294-299 (1971).
95. VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. and APARICIO, P.J. NADH-nitrate reductase de Chlorella: nouvelle contribution a l'etude de ses propriétés. Physiol. Vég., 10, 637-652 (1972)
96. VILLALOBO, A., ROLDAN, J.M., HERRERA, J. y RIVAS, J. Nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus: Contribución al estudio de algunas de sus propiedades. VI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica. Sevilla, Abril 1975. Resúmenes pág. 76.

97. WALLACE, W. and NICHOLAS, D.J.D. Properties of some reductase enzymes in the nitrifying bacteria and their relationship to the oxidase systems. *Biochem. J.*, 109, 763-773 (1968).
98. WHATLEY, F.R. and ARNON, D.I. Photosynthetic phosphorylation in Plants. *Methods Enzymol.*, 6, 308-313 (1963).
99. YATES, M.G. Electron transport to nitrogenase in *Azotobacter chroococcum*. Purification and some properties of NADH-dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 24, 347-357 (1972).
100. YOCH, D.C., BENAMAN, J.R., VALENTINE, R.C. and ARNON, D.I. The electron transport system in nitrogen fixation by *Azotobacter*. II. Isolation and function of a new type of ferredoxin. *Proc. Nat. Acade. Sci.*, 64, 1404-1410 (1969).
101. YOCH, D.C. and ARNON, D.I. Chromatium nitrogenase activity linked to photochemically generated assimilatory power. *Biochim. Biophys. Acta*, 197, 180-183 (1970).
102. YOCH, D. and ARNON, D.I. Two biologically active ferredoxins from the aerobic nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 247, 4514-4520 (1972).
103. ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. and LOSADA, M. Structural and functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from *Chlorella*. *FEBS Letters*, 9, 157-160 (1970).

104. POMILUIKO, V.P. and OCHKIVSKAYA, M.V. Comparative study of the nitrate reductase activity of Mycrocystis aeruginosa and Chlorella vulgaris under cultural conditions. Gidrobiol. Zh., 6, 98-101 (1970).
105. NOTTON, B.A. and HEWITT, E.J. Reversible inhibition of spinach (Spinacea oleracea L.) nitrate reductase and nonexchangeability in vitro of protein bound molybdenum and tungsten. FEBS Letters, 18, 19-22 (1971).
106. LAZZARINI, R.A. and SAN PIETRO, A. Reduction of cytochrome c by photosynthetic pyridine nucleotide reductase and transhydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, 62, 417-420 (1962).

FACULTAD DE CIENCIAS

Unido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral
D^a M^a DOLORES TORTOLERO GARCIA
titulada "Reducción enzimática de nitro a
nitrito en azotobacteria chroococcum dependiente
de ferredoxina
se acordó otorgarle la calificación de sobresaliente
" cum laude"

Sevilla, 22 de Septiembre 1.975

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

[Signature]

[Signature]

[Signature]

El Presidente,

El Secretario,

El Doctor

[Signature]

[Signature]

[Signature]

