

La asimilación del nitrato y su regulación



LA ASIMILACION DEL NITRATO Y SU REGULACION

Manuel LOSADA
Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias y C. S. I. C.
Universidad de Sevilla

I. INTRODUCCION

Los elementos biogénicos primordiales que en forma inorgánica absorben las plantas de su medio ambiente para sintetizar su propia materia están, en general, oxidados al límite: el carbono, como anhídrido carbónico; el nitrógeno, como nitrato, y el azufre, como sulfato. Por tanto, los vegetales clorofílicos —tanto las algas como las plantas superiores— tienen, en primer lugar, que reducirlos a un nivel directamente asimilable, utilizando para ello el único reductor disponible —el agua— y valiéndose de la única fuente de energía de que también dispone —la luz solar.

Una vez reducidos, los elementos biogénicos son asimilados —también fotosintéticamente— y pasan a constituir el material vegetal, en el que aparecen ya en forma orgánica, en estado de óxido-reducción variable: el carbono a un nivel cuyo promedio puede representarse simplificada como (CH_2O) ; el nitrógeno a nivel amoniacal y el azufre a nivel de sulfuro de hidrógeno.

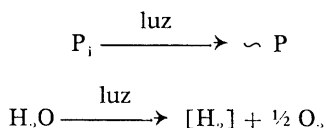
La fotosíntesis consta en esencia de dos fases: 1) La fase luminosa, que consiste en la conversión de la energía física contenida en los cuantos de luz —captados por los pigmentos clorofílicos y auxiliares— en energía química fisiológica, y 2) la fase oscura, que consiste en la reducción de los elementos biogénicos primordiales y en su posterior asimilación.



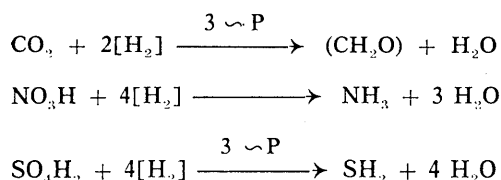
Manuel Losada Villasante nació en Carmona (Sevilla) en 1929. Actualmente es catedrático y director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y, anteriormente, ha trabajado como investigador en Fisiología Celular, Genética y Bioquímica en la Universidad de Munster i.W., Alemania (1954-55); Laboratorio Carlsberg, Copenhague, Dinamarca (1955-56), y Universidad de California, en Berkeley, USA (1958-61). A su regreso de Estados Unidos fue nombrado director del recién creado Instituto de Biología Celular del CSIC en Madrid, puesto que desempeñó hasta su traslado a Sevilla.

Sus campos de investigación son principalmente la fotosíntesis y el metabolismo intermediario y su regulación, en particular en relación con la asimilación del nitrato, habiendo publicado hacia un centenar de trabajos científicos y revisiones sobre estos temas y pronunciado numerosas conferencias en Universidades y Centros de Investigación de Europa y América. El profesor Losada es académico numerario de la Real Academia de Ciencias, Madrid; consejero del CSIC, y miembro de varias sociedades científicas nacionales e internacionales.

Las reacciones luminosas de la fotosíntesis han sido fundamentalmente esclarecidas durante los últimos años por Arnon y su grupo (1), e incluyen no sólo la síntesis de enlaces de fosfato ricos en energía ($\sim P$) —proceso en que el fosfato inorgánico (P_i) se esterifica en forma orgánica, y que se conoce también como fotofosforilación—, sino la fotólisis del agua en sus dos elementos integrantes (hidrógeno y oxígeno), de acuerdo con las ecuaciones:



Los enlaces de fosfato ricos en energía ($\sim P$) y el poder reductor $[H_2]$ son, según Arnon (1), los productos finales de la Fotosíntesis propiamente dicha, que constituyen el poder asimilatorio disponible para la reducción —y subsiguiente asimilación— del anhídrido carbónico (2), nitrato (3) y sulfato (4), según las ecuaciones:

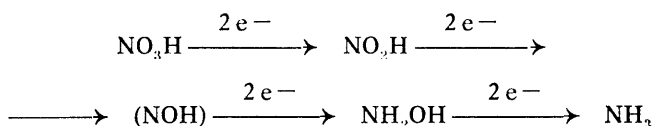


El oxígeno, a pesar de su importancia en la respiración aerobia —que, a lo largo de la evolución biológica, sobrevino más tardíamente que la Fotosíntesis y como consecuencia de ella— es sólo un producto de desecho del proceso fotosintético.

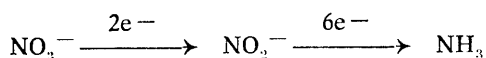
En resumen, y ateniéndonos al nitrógeno, la especial significación de la asimilación del nitrato por las plantas radica no sólo en que el nitrógeno nítrico sea la principal fuente de este elemento que utilizan dichos organismos para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, sino en que su reducción a amoníaco y su posterior asimilación estén estrechamente relacionados con las reacciones fotosintéticas propiamente dichas y maravillosamente reguladas.

II. LA RUTA DE LA REDUCCION DEL NITRATO

Basándose en consideraciones puramente químicas, Meyer y Schulze (5) propusieron a fines del siglo pasado que la reducción biológica del nitrato a amoníaco, proceso que implica la ganancia de ocho electrones, o átomos de hidrógeno, debería tener lugar en cuatro pasos sucesivos de dos electrones cada uno, a través de nitrito, hiponitrito e hidroxilamina, según el siguiente esquema:



Después de largas controversias, ha quedado últimamente bien establecido (3) que la reducción asimilatoria del nitrato a amoníaco ocurre —tanto en bacterias como en hongos, algas y plantas superiores— en sólo dos estadios: primero, el nitrato se reduce a nitrito en una reacción que implica dos electrones y, a continuación, el nitrito se reduce a amoníaco, en una reacción que implica seis electrones, según el esquema:

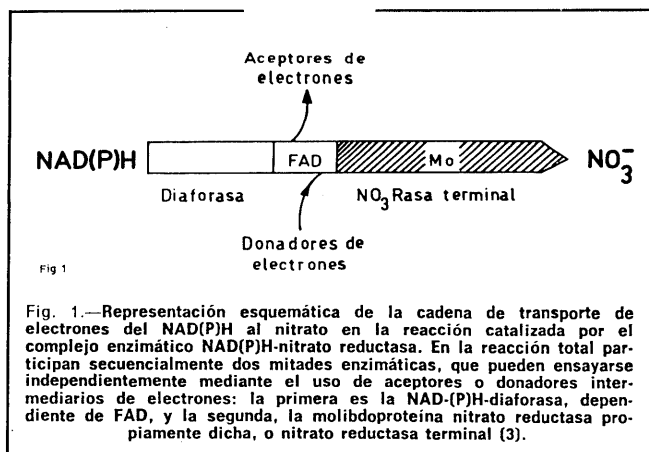


III. EL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO

El sistema reductor de nitrato del tipo asimilatorio está integrado por dos enzimas, conocidos como nitrato reductasa y nitrito reductasa, que catalizan, respectivamente, la reducción del nitrato a nitrito y la de éste a amoníaco (3).

La nitrato reductasa de hongos, algas y plantas superiores es un complejo enzimático de alto peso molecular

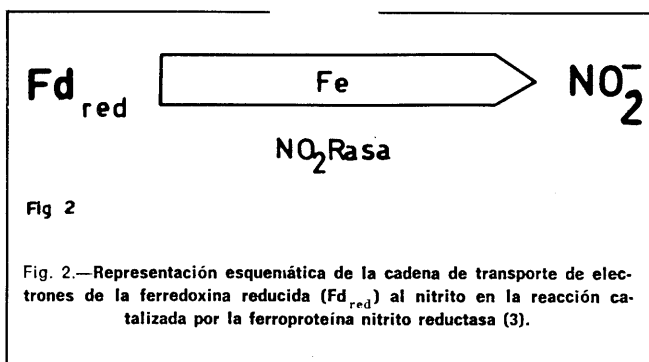
que requiere específicamente piridina-nucleótidos reducidos como donadores fisiológicos de electrones para la reducción del nitrato a nitrito. Según muestra esquemáticamente la figura 1, en la transferencia de electrones del NAD(P)H (nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido) al nitrato participan secuencialmente dos actividades enzimáticas que pueden estudiarse separadamente: la primera es una NAD(P)H diaforasa dependiente de FAD (flavín-adenín-dinucleótido), que puede utilizar diversos compuestos oxidados (tales como el citocromo c, colorantes o vitamina K) como aceptores de electrones; la segunda es la molibdo proteína nitrato reductasa terminal o nitrato reductasa propiamente dicha, que puede utilizar flavín-nucleótidos (o viológenos) reducidos como donadores de electrones, y que se denomina por ello FNH₂-nitrato reductasa. En algunas bacterias asimiladoras de nitrato, el complejo enzimático puede carecer de la mitad diaforásica inicial.



La nitrito reductasa de algas y plantas superiores es una ferroproteína, de peso molecular mucho más bajo que la nitrato reductasa, que utiliza ferredoxina reducida como donador específico de electrones para la reducción del nitrito a amoníaco, según representa esquemáticamente la figura 2. El enzima de bacterias y hongos contiene además —asociado con la mitad terminal— una mitad diaforásica dependiente de FAD, que utiliza NAD (P) H como reductor fisiológico. En este sentido es similar al complejo nitrato reductasa de hongos y plantas clorofílicas.

Algunas de las propiedades moleculares de estos complejos enzimáticos merecen destacarse particularmente. Las actividades diaforásica y terminal se afectan de manera diferente por tratamientos selectivos e inhibidores, y pueden protegerse específicamente contra la inactivación, e incluso reactivarse, por la acción de sus propios sustratos o de compuestos análogos. En general, la mitad diaforasa es especialmente sensible a la inactivación térmica y a la inhibición por reactivos de grupos tiólicos —procesos que previenen, de manera específica, el FAD y NADH, respectivamente—. Por el contrario, la mitad terminal es inhibida por agentes quelantes de metales (cianuro, cianato, azida) y particularmente por el cianuro cuando la proteína se encuentra en estado reducido.

El fenómeno de la inactivación por reducción de los enzimas del sistema reductor de nitrato es de naturaleza reversible, tanto in vitro como in vivo, y constituye en la actualidad uno de los aspectos más fascinantes de la regulación del metabolismo del nitrógeno, que será analizado, en detalle, más adelante.



Especial interés ofrece el efecto del volframio, en competencia con el molibdeno, sobre la nitrato reductasa. Este metal no influye en la síntesis del complejo nitrato reductasa, pero inhibe totalmente su actividad terminal,

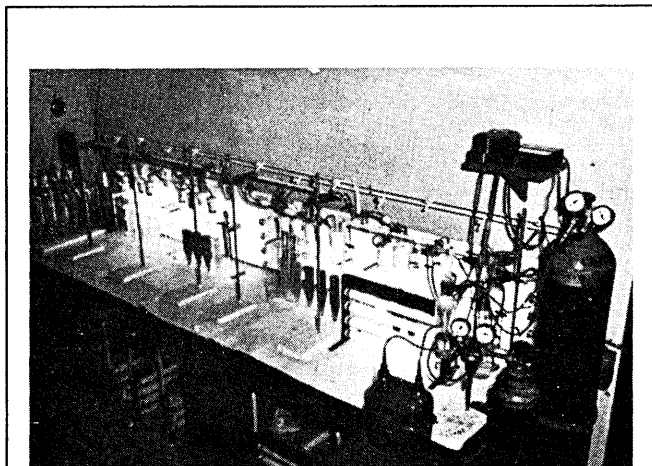


Fig. 3.—Instalación para el cultivo de algas en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla (3).

sin afectar en absoluto a ninguna de las restantes actividades del sistema reductor de nitrato. Por ello, la adición de tungstato al medio de cultivo impide muy eficazmente el crecimiento de las algas cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno (Figuras 3 y 4). En cambio, el volframio es totalmente inocuo cuando se emplea nitrato o amoníaco como nutrientes nitrogenados.

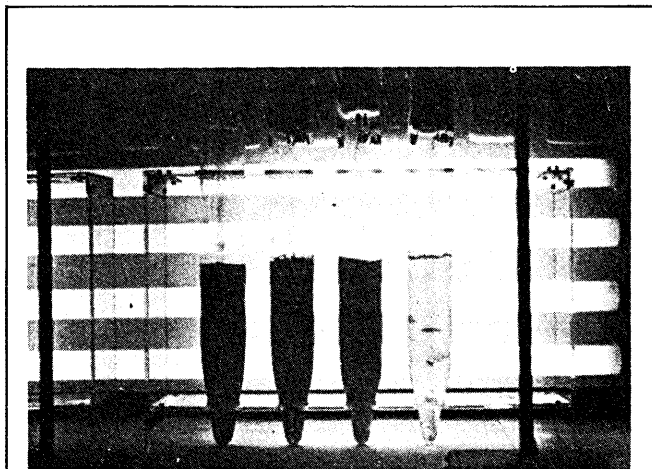
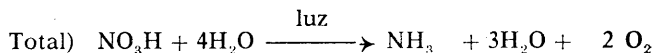
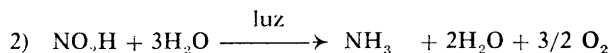
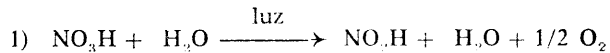


Fig. 4.—Efecto inhibitor del volframio, en competencia con el molibdeno, en el crecimiento del alga *Chlorella*, con nitrato como fuente de nitrógeno. Los cultivos contenían cantidades crecientes (0; 1; 10 y 100 μ M) de volframio (3).

IV. LA REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRATO

Los clásicos trabajos de Warburg (6) demostraron que las células vivas del alga *Chlorella* reducen, en la luz, el nitrato a amoníaco, con el simultáneo desprendimiento de cantidades estequiométricas de oxígeno. El mecanismo íntimo del proceso ha permanecido, sin embargo, desconocido durante mucho tiempo. Recientemente, los experimentos realizados en nuestro Departamento (3) utilizando un sistema reconstruido de cloroplastos han permitido reproducir fuera de la célula viva el proceso completo de la reducción fotosintética del nitrato a amoníaco, acoplado con la oxidación del agua a oxígeno, según las reacciones:



La evidencia actual soporta el mecanismo representado esquemáticamente en la Figura 5, según el cual los electrones del agua activados por la luz fluyen a través de la cadena de transporte característica de la fotofosforilación no-cíclica hasta la ferredoxina y reducen finalmente, con el concurso de los cofactores y enzimas pertinentes, el nitrato a nitrito, y éste a amoníaco.

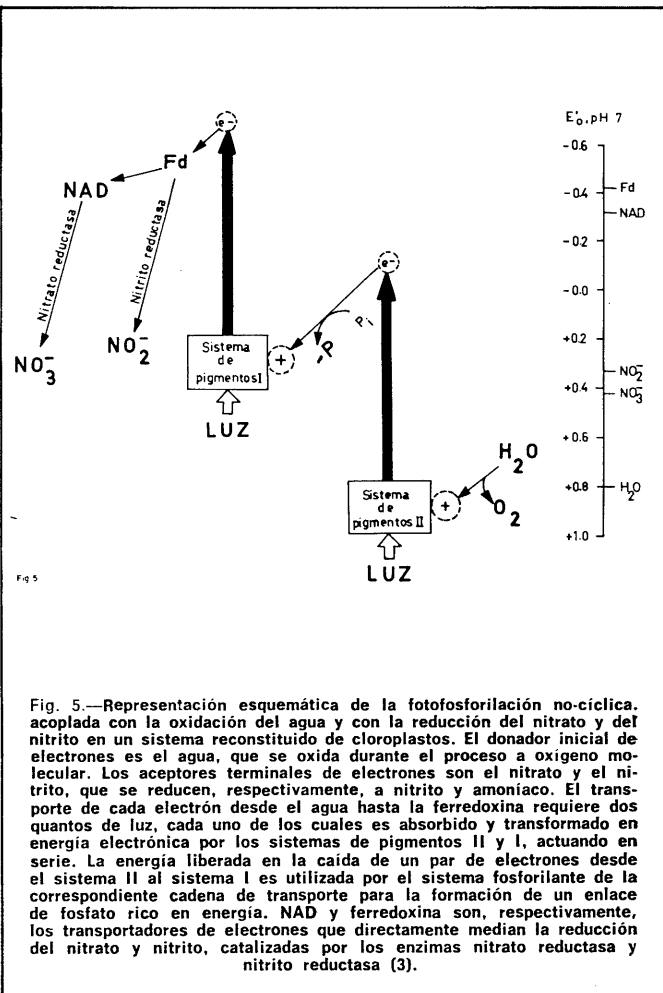


Fig. 5.—Representación esquemática de la fotofosforilación no-cíclica, acoplada con la oxidación del agua y con la reducción del nitrato y del nitrito en un sistema reconstruido de cloroplastos. El donador inicial de electrones es el agua, que se oxida durante el proceso a oxígeno molecular. Los aceptores terminales de electrones son el nitrato y el nitrito, que se reducen, respectivamente, a nitrito y amoníaco. El transporte de cada electrón desde el agua hasta la ferredoxina requiere dos cuantos de luz, cada uno de los cuales es absorbido y transformado en energía electrónica por los sistemas de pigmentos II y I, actuando en serie. La energía liberada en la caída de un par de electrones desde el sistema II al sistema I es utilizada por el sistema fosforilante de la correspondiente cadena de transporte para la formación de un enlace de fosfato rico en energía. NAD y ferredoxina son, respectivamente, los transportadores de electrones que directamente median la reducción del nitrato y nitrito, catalizadas por los enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa (3).

Aunque de momento hay ciertas dudas respecto a la localización intracelular de, al menos, algunos de los enzimas del sistema reductor de nitrato en plantas superiores (3), parece seguro que dichos enzimas están íntimamente ligados a las partículas clorofílicas en el caso de las algas verdes-azuladas. En concreto, en nuestro Departamento se ha encontrado que la nitrito reductasa de *Anacystis nidulans* —enzima digno de especial mención por resistir, durante tratamientos prolongados, el calentamiento a 100° y el pH fuertemente ácido— aparece casi en su totalidad firmemente unido a las laminillas fotosintéticas. Lo mismo puede afirmarse de la nitrato reductasa de otra alga verde-azulada, *Anabaena cylindrica* (7).

V. CONTROL DEL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO

El amoníaco, producto final de la ruta de reducción del nitrato, actúa in vivo como represor nutricional de los enzimas del sistema reductor de nitrato y como agente promotor del fenómeno, recientemente descubierto, de la inactivación redox reversible de estos enzimas, primer ejemplo de interconversión metabólica de este tipo (3,8).

V. I. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS ENZIMAS

Los dos complejos enzimáticos del sistema reductor de nitrato son adaptativos. Así, en las algas verdes *Chlorella fusca* y *Chlamydomonas reinhardtii*, tanto la NADH-nitrato reductasa como la ferredoxina-nitrito reductasa se reprimen cuando la fuente de nitrógeno empleada como nutriente es el amoníaco (3).

V. II. REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

La nitrato reductasa y nitrito reductasa del tipo asimilatorio están sujetas a regulación por reducción y oxidación de las correspondientes proteínas. Ambos complejos pueden existir en dos formas interconvertibles: una activa, que se inactiva por reducción, y otra inactiva, que se reactiva por oxidación (8).

V. II. I. INTERCONVERSIÓN DE LA NITRATO REDUCTASA

El fenómeno de la inactivación reversible de la nitrato reductasa ha sido especialmente estudiado en algas, tanto con células enteras, como con extractos acelulares y preparaciones enzimáticas purificadas (8).

La adición de amoníaco a un cultivo de *C. fusca* o *C. reinhardtii*, creciendo en la luz con nitrato en una corriente de CO_2 al 5 por ciento en aire, determina la rápida inactivación de la mitad terminal ($\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa) del complejo NADH-nitrato reductasa (NADH- NO_3 Rasa), sin afectar para nada a su mitad inicial (NADH-diaforasa). El proceso es de naturaleza reversible, y el enzima se reactiva de manera igualmente rápida al remover el amoníaco del cultivo y resuspender las células en su medio original (Figura 6).

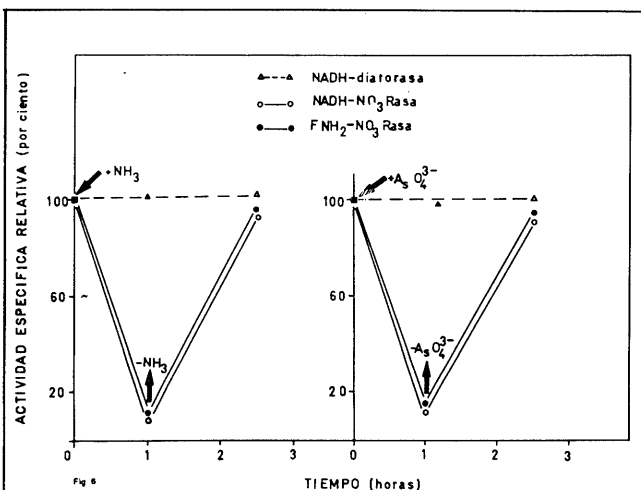


Fig. 6.—Cinética de la inactivación reversible de la nitrato reductasa por el amoníaco (izquierda) o arseniato (derecha) en células de *Chlamydomonas*. En cada caso, la primera flecha indica el tiempo en que se añadió amoníaco o arseniato a los cultivos de alga, y la segunda, el tiempo en que se lavaron las células y se resuspendieron en el medio original. Las respectivas actividades del complejo NADH-nitrato reductasa se estimaron en los correspondientes extractos a los tiempos indicados (8).

Aparentemente, el amoníaco actúa como desacoplante de la fotofosforilación fotosintética, provocando simultáneamente una subida del nivel de poder reductor, NAD(P)H, y una bajada de la carga energética celular. Otros agentes desacoplantes, como la metilamina y el arseniato, que inhiben igualmente, aunque por distintos mecanismos, la fotofosforilación del ADP (adenosín-difosfato), ejercen el mismo efecto. El fenómeno, no tiene, en cambio, lugar si, en presencia de los desacoplantes, se impide la acumulación de poder reductor, bien sea por oxidación (mediante el uso del transportador redox vitamina K) o bien por bloqueo del propio flujo no-cíclico de electrones (mediante el uso del inhibidor de la fotólisis del agua, diclorofenil-dimetilurea).

Es interesante subrayar que aunque la acción de estos desacoplantes de la fotofosforilación sea estrictamente dependiente de la luz, se puede, alternativamente, conseguir la rápida inactivación de la nitrato reductasa, no

sólo en la luz sino también en la oscuridad, cuando se interrumpe la aireación de los cultivos, con el fin de inducir un ambiente anaeróbico. La readmisión de aire, determina, en este caso, la pronta reactivación del enzima (Figura 7).

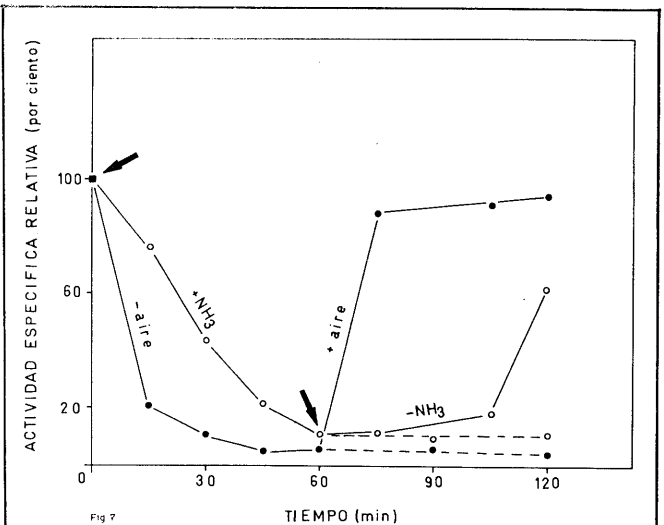


Fig. 7.—Cinética de la inactivación reversible de la nitrato reductasa en células de *Chlamydomonas* por interrupción de la aireación de los cultivos o por la adición de amoníaco (8). Otras condiciones experimentales como en la figura 6.

Que la adición y sustracción de amoníaco (y otros agentes desacoplantes) determinan in vivo la inactivación y reactivación de la nitrato reductasa por reducción y oxidación del enzima, respectivamente, ha sido elegantemente demostrado mediante el uso de oxidantes y reductores artificiales y fisiológicos, capaces de provocar in vitro los mismos procesos reversibles de inactivación y reactivación.

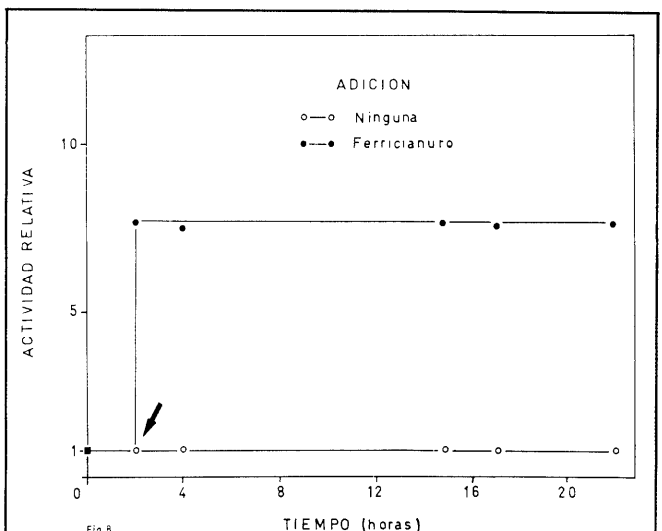


Fig. 8.—Cinética de la reactivación in vitro de la nitrato reductasa de *Chlamydomonas* por ferricianuro. Al enzima inactivo, extraído de células tratadas con amoníaco y mantenido en hielo, se añadió ferricianuro al tiempo indicado por la flecha. La actividad NADH-nitrato reductasa se determinó en alícuotas de las mezclas de incubación a los tiempos indicados (8).

A modo de ejemplo, la figura 8 muestra la forma inactiva de la nitrato reductasa —extraída de células tratadas con amoníaco— se reactiva inmediatamente al ser reoxidada con ferricianuro. Por otro lado, la figura 9 muestra cómo la forma activa —procedente de células no tratadas— se inactiva rápidamente por reducción con NADH en presencia de ADP. Por lo demás, y sin entrar en disquisiciones que excedan los propósitos de este artículo, es importante señalar que el nitrato y varios inhibidores competitivos (como el cianato) protegen al enzima contra la inactivación e incluso lo reactivan una vez inactivado. También es de interés indicar que la

inactivación y la reactivación proceden con más rapidez a pH bajo y alto, respectivamente, con independencia del tampón utilizado.

Aunque, de momento, quedan por aclarar la naturaleza y el tipo de transformación que experimenta el grupo químico responsable de la inactivación, parece probable que se trate del cambio de valencia de un catión metálico pesado o de la apertura de un puente disulfuro en la molécula proteica.

El fenómeno de la interconversión metabólica de la nitrato reductasa no es exclusivo de las algas, y ha sido, igualmente, puesto de manifiesto en bacterias, hongos y plantas superiores.

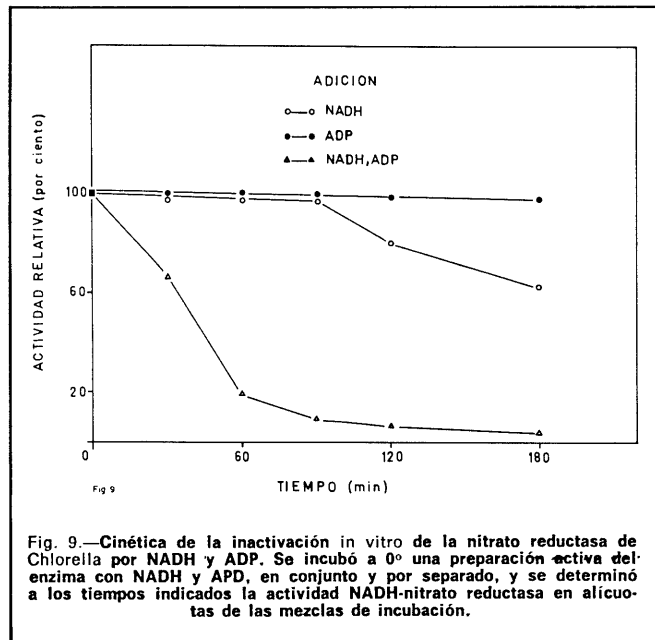


Fig. 9.—Cinética de la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de *Chlorella* por NADH y ADP. Se incubó a 0° una preparación activa del enzima con NADH y ADP, en conjunto y por separado, y se determinó a los tiempos indicados la actividad NADH-nitrato reductasa en alícuotas de las mezclas de incubación.

V. II. II. INTERCONVERSIÓN DE LA NITRITO REDUCTASA

Hasta la fecha, la interconversión de la nitrato reductasa entre una especie activa y otra inactiva sólo ha sido observada en preparaciones del enzima extraído de la bacteria asimiladora de nitrato *Azotobacter chroococcum*, que es, además, fijadora de nitrógeno. No obstante, el proceso parece también de general importancia metabólica y, sin duda, relacionado con un cambio redox de la proteína (8).

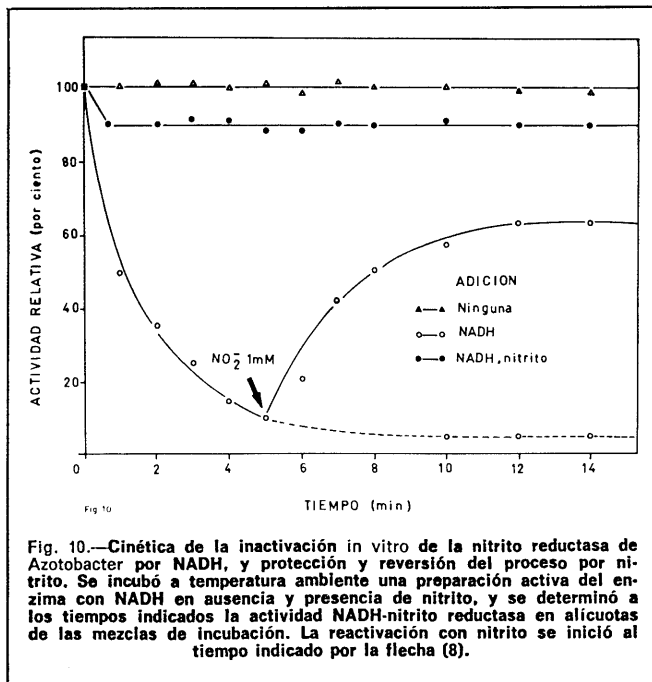


Fig. 10.—Cinética de la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de *Azotobacter* por NADH, y protección y reversión del proceso por nitrato. Se incubó a temperatura ambiente una preparación activa del enzima con NADH en ausencia y presencia de nitrato, y se determinó a los tiempos indicados la actividad NADH-nitrato reductasa en alícuotas de las mezclas de incubación. La reactivación con nitrato se inició al tiempo indicado por la flecha (8).

Como muestra la figura 10, la nitrato reductasa de *Azotobacter* se inactiva en pocos minutos por preincubación con NADH. El nitrato protege específicamente al en-

zima contra esta inactivación y revierte el proceso, una vez que ha tenido lugar.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El nitrógeno constituye aproximadamente el 2 por ciento del peso seco de las plantas, lo que, a escala mundial, supone la incorporación anual al reino vegetal de 10.000 millones de toneladas de este elemento. Exceptuadas aquellas especies que directamente fijan el nitrógeno atmosférico, las plantas utilizan predominantemente nitrato como fuente de nitrógeno. Realmente es fabulosa la cantidad de energía solar que requiere el mundo vegetal para llevar a cabo la asimilación del nitrato, globalmente considerada. La reducción fotosintética del nitrato es un proceso metabólico clave, cuya ruta ha quedado ya prácticamente esclarecida, y el estudio de su regulación ha revelado nuevos y eficacísimos mecanismos de control.

Un mejor conocimiento del mecanismo de la asimilación del nitrato y de su regulación genética y bioquímica es no sólo de primordial importancia en Biología y Fisiología Vegetal, consideradas como ciencias básicas, sino también en Agricultura, Nutrición, etc., pues puede a corto plazo y económicamente traducirse en un incremento considerable del rendimiento y valor nutritivo de las cosechas, al permitir aumentar la cantidad, proporción y calidad de su contenido proteico.

A este respecto hay que recordar que los compuestos nitrogenados resultantes de la asimilación del nitrato —proteínas y ácidos nucleicos— son las sustancias cualitativa y cuantitativamente más características de la materia viva, y que son las plantas, en último término, quienes, con agua, dióxido de carbono, nitrato y sulfato, fabrican limpia y suavemente estos compuestos y los facilitan después a todos los demás organismos. Por otro lado, no podemos tampoco ignorar que la alimentación humana es hoy, por desgracia, deficitaria en vastas zonas de la Tierra y que los científicos tienen, en consecuencia, la obligación de contribuir con los resultados de sus investigaciones a tratar de resolver en la medida que puedan tan angustioso problema, cada día aún más agravado con la incógnita de la superpoblación.

Agradecimiento. Este trabajo ha sido realizado con una ayuda de los Laboratorios de Investigación Philips (Eindhoven, Holanda).

BIBLIOGRAFIA

- (1) ARNON, D. I.: «*Physiol. Rev.*», **47**, 317 (1967).
- (2) CALVIN, M. y BASSHAM, J. A.: «*The Photosynthesis of Carbon Compounds*», W. A. Benjamin, Inc., Nueva York, 1962.
- (3) LOSADA, M.: «La fotosíntesis del nitrógeno nítrico», discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias, Madrid, 1972.
- (4) BANDURSKY, R. S.: en «*Plant Biochemistry*», Bonner, J. y Varner, J. E., Eds., Academic Press, Nueva York, 1965, p. 467.
- (5) MEYER, V. y SCHULZE, E.: «*Ber. Dtsch. Chem. Ges.*», **17**, 1554 (1884).
- (6) WARBURG, O.: «*Ann. Rev. Biochem.*», **33**, 1 (1964).
- (7) FOGG, G. E., STEWART, W. D. P., FAY, P. y WALSBY, A. E.: «*The Blue-Green Algae*», Academic Press, Nueva York, 1973.
- (8) LOSADA, M.: «Third International Symposium on the Metabolic Interconversion of Enzymes», Seattle, 1973 (en prensa).