

TD  
589

TD  
589

R. 9412



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL Y BIOLOGIA MOLECULAR

CONTRIBUCION A LOS ESTUDIOS DE REGULACION DEL METABOLISMO DEL  
NITROGENO INORGANICO DEL ALGA VERDE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA CENTRAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA

140 111  
13 FEB, 1980

de 10  
EL DIRECTOR DE

*Fleura Laffitte*

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor en Biología por  
el Licenciado

Alberto Menacho Aparicio



Director

Dr. José M. Vega Piqueres  
Catedrático de Bioquímica y  
Biología Molecular

**A Cinta**

**A mis padres**

*Esta tesis ha sido realizada en el grupo de Bioquímica de la Facultad de Química, integrado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, y dirigida por el Dr. José M. Vega Piqueres, a quien agradezco el haberme aceptado como miembro del grupo y la ayuda y apoyo prestados en todo momento. Gracias también a todos los compañeros/amigos del laboratorio y a aquellas personas que desde fuera me ayudaron a atenuar el paso de este tiempo tantas veces ingrato. Por último, quiero agradecer a la Junta de Andalucía la concesión de una beca de investigación, y a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología su apoyo económico (Proyecto BT87-0028-C02).*

## INDICE

## INTRODUCCION

<i>El ciclo biológico del nitrógeno</i> .....	13
<i>Asimilación de nitrógeno inorgánico</i> .....	14
<i>Asimilación de amonio en microalgas y plantas</i> .....	18

## MATERIALES Y METODOS

<b>Organismo y condiciones de cultivo</b> .....	22
<b>Preparación de extractos crudos</b> .....	24
<b>Determinaciones analíticas</b> .....	24
<i>Amonio</i> .....	24
<i>Clorofila</i> .....	26
<i>L-Glutamato</i> .....	27
<i><math>\gamma</math>-Glutamil hidroxamato</i> .....	28
<i>Nitrato</i> .....	28
<i>Nitrito</i> .....	28
<i>Oxígeno</i> .....	29
<i>Proteína</i> .....	29
<b>Determinación de actividades enzimáticas</b> .....	30
<i>Permeabilización de las células</i> .....	30
<i>Glutamato sintasa</i> .....	30
<i>Glutamina sintetasa</i> .....	32
<i>Nitrato reductasa</i> .....	33

*Nitrito reductasa* ..... 34

**Separación de isoenzimas con actividad glutamina sintetasa** 35

**Purificación de ferredoxina** ..... 35

*Tratamiento con sulfato de protamina* ..... 36

*Cromatografía en DEAE-Sefacel* ..... 36

**Diálisis** ..... 37

**Variación experimental** ..... 37

**Aparatos y reactivos** ..... 37

**RESULTADOS Y DISCUSION**

**I. EFECTO DE LA CARENCIA DE NITROGENO SOBRE LA ASIMILACION DE AMONIO POR CHLAMYDOMONAS REINHARDTII**

**Resumen** ..... 42

**Introducción** ..... 42

**Resultados y Discusión** ..... 44

*Consumo de nitrógeno inorgánico por células deficientes en este elemento* ..... 44

*Efecto de la carencia de nitrógeno sobre las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa* ..... 48

*Inhibición del consumo de amonio por MSX o azaserina* ..... 52

*Nivel intracelular de las actividades glutamato sintasa en células tratadas con MSX* ..... 54

*Nivel intracelular de la actividad glutamina sintetasa en células tratadas con azaserina o metilamonio* ..... 55

## II. EFECTO DE LA LIMITACION DE CO<sub>2</sub> SOBRE LA UTILIZACION DE NITROGENO INORGANICO POR CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

<b>Resumen</b> .....	60
<b>Introducción</b> .....	61
<b>Resultados y Discusión</b> .....	64
<i>Efecto del amonio sobre el consumo de nitrato o nitrito</i> .....	64
<i>Control por CO<sub>2</sub> del consumo de nitrato</i> .....	67
<i>Efecto de la concentración de nitrato o nitrito en el medio sobre la inhibición por limitación de CO<sub>2</sub> del consumo de ambos iones</i> .....	72
<i>Inactivación de la nitrato reductasa por limitación de CO<sub>2</sub></i> .....	74
<i>Producción de nitrito y amonio en cultivos de células que utilizan nitrato en aire</i> .....	77
<i>Efecto de la limitación de CO<sub>2</sub> sobre el consumo de amonio</i> .....	87

## III. EFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

<b>Resumen</b> .....	93
<b>Introducción</b> .....	94
<b>Resultados y Discusión</b> .....	95
<i>Efecto de la limitación de CO<sub>2</sub> y de la adición de amonio sobre la actividad glutamina sintetasa</i> .....	95
<i>Efecto del metilamonio sobre la actividad glutamina sintetasa</i> .....	104
<i>Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la disminución de</i> .....	

7

<i>actividad glutamina sintetasa causada por oscuridad y/o amonio</i> .....	106
<i>Efecto de la reposición de la fuente de nitrógeno sobre la actividad glutamina sintetasa de células deficientes en este elemento</i> .....	109
<i>Efecto del DTE sobre las actividades GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub></i> .....	109

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFIA

### Abreviaturas

A	.....	Absorbancia
ADP	.....	Adenosín-5'-difosfato
ATP	.....	Adenosín-5'-trifosfato
Chl	.....	Clorofila
DEAE	.....	Dietilaminoetil
DTE	.....	Ditioeritritol
e	.....	Electrón
E	.....	Coeficiente de extinción
EDTA	.....	Acido etilendiaminotetraacético
Fd	.....	Ferredoxina
Fd <sub>ox</sub>	.....	Ferredoxina oxidada
Fd <sub>red</sub>	.....	Ferredoxina reducida
GDH	.....	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	.....	Glutamato sintasa
GS	.....	Glutamina sintetasa
MOPS	.....	Acido morfolinopropanosulfónico
MSX	.....	L-Metionina-D,L-sulfoximina
MVH	.....	Metil viológeno
n	.....	Número de experimentos realizados
NAD(P) <sup>+</sup>	.....	β-Nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) oxidado
NAD(P)H	.....	β-Nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) reducido
NR	.....	Nitrato reductasa
NiR	.....	Nitrito reductasa

P <sub>i</sub>	.....	Fosfato inorgánico
PMSF	.....	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SD	.....	Desviación estándar
Tris (Trizma base)	---	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	.....	Unidad de actividad enzimática

Parte de los resultados presentados en este trabajo se han publicado en los artículos y comunicaciones a Congresos que se citan a continuación:

(i) Artículos en revistas o libros:

EFFECT OF NITROGEN STARVATION ON AMMONIUM ASSIMILATION BY  
*Chlamydomonas reinhardtii*

Alberto Menacho y José M. Vega

Physiologia Plantarum 75, 285-289 (1989)

REGULATION OF INORGANIC NITROGEN METABOLISM IN *Chlamydomo-*  
*nas reinhardtii*

José M. Vega y Alberto Menacho

(Incluido en un libro que publicará Springer-Verlag en breve, recogiendo trabajos presentados en el *II Advanced Course on Inorganic Nitrogen Metabolism*, celebrado en Seiano di Vico Equense, Nápoles, Italia (1989)

(ii) Comunicaciones a Congresos:

EFECTO DE LA CARENCIA DE NITROGENO SOBRE LAS ENZIMAS DE LA  
ASIMILACION DEL AMONIO EN *Chlamydomonas reinhardtii*

Alberto Menacho y José M. Vega

XIV Congreso de la SEB, resumen 16-14 (Málaga 1987)

EFEECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA  
ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE *Chlamydomonas reinhardtii*

Alberto Menacho, José L. Prieto y José M. Vega

III Congreso Luso-Español de Bioquímica, resumen 11-6  
(Santiago de Compostela 1988)

CONTROL POR CO<sub>2</sub> DEL METABOLISMO DEL NITROGENO INORGANICO  
EN EL ALGA *Chlamydomonas reinhardtii*

Alberto Menacho y José M. Vega

IV Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, resumen F-7  
(Sevilla 1989)

REGULATION OF INORGANIC NITROGEN METABOLISM IN *Chlamydomonas  
reinhardtii*

Alberto Menacho y José M. Vega

II Advanced Course on Inorganic Nitrogen Metabolism, pp:  
22-23 (Seiano di Vico Equense, Nápoles, Italia 1989)

REGULACION DEL METABOLISMO DEL NITROGENO INORGANICO EN  
ALGAS EUCARIOTICAS

José M. Vega y Alberto Menacho

XVI Congreso Nacional de la SEB, resumen SA-1 (Alicante  
1989)

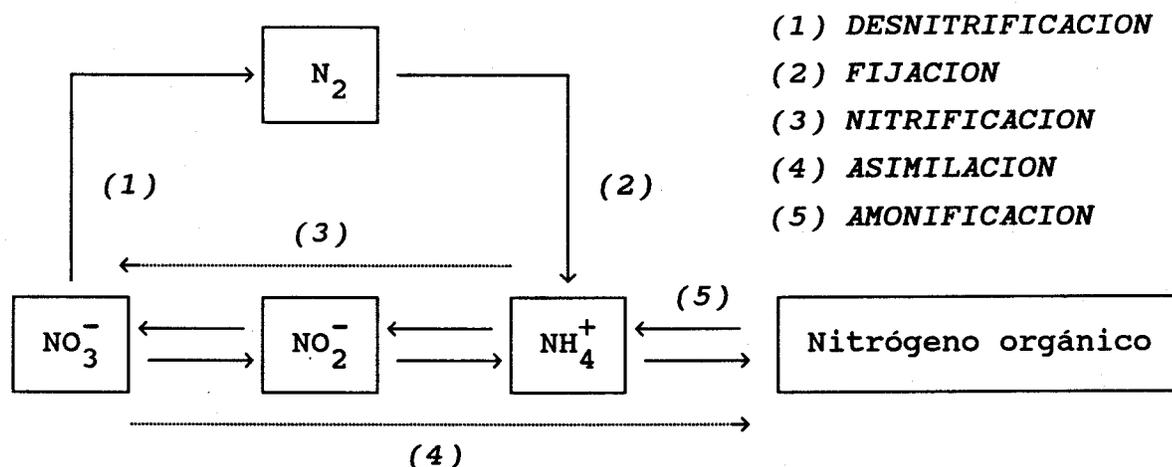
## INTRODUCCION

## *El ciclo biológico del nitrógeno*

El nitrógeno es, junto con el carbono, hidrógeno y oxígeno, uno de los elementos más abundantes de los seres vivos, estando presente en las proteínas, los ácidos nucleicos y numerosos compuestos del metabolismo intermediario.

En la biosfera, el nitrógeno circula continuamente de unos organismos a otros, experimentando por la acción de éstos una serie de interconversiones entre distintas formas, que en conjunto constituyen el *ciclo biológico del nitrógeno*. Este elemento se hace accesible a la biosfera gracias a la *fijación del nitrógeno atmosférico*, proceso durante el cual el  $N_2$  es reducido hasta amonio y que realizan exclusivamente algunos procariotas, que en ocasiones se asocian simbióticamente con organismos eucariotas. A la ganancia de nitrógeno por fijación se opone la pérdida debida a la actividad metabólica de ciertas bacterias que usan formas oxidadas de nitrógeno como aceptores de electrones durante la respiración anaerobia, en un proceso que genera en última instancia nitrógeno molecular y se conoce como *desnitrificación*. La magnitud del flujo de nitrógeno por esta parte del ciclo es relativamente pequeña, calculándose que solamente del 3 al 10 % de la producción primaria neta procede de la fijación biológica, correspondiendo el resto a la recirculación del nitrógeno no molecular presente en la biosfera. Durante este reciclaje ocurren *procesos asimilatorios* en los que formas oxidadas de nitrógeno son reducidas e

incorporadas a compuestos orgánicos, que están compensados por el retorno del nitrógeno orgánico a un estado inorgánico debido a la actuación de microorganismos que liberan amonio durante la descomposición de la materia orgánica, proceso que se conoce genéricamente como *amonificación*. El ciclo se completa con la conversión del amonio en nitrato durante la *nitrificación*, realizada por dos grupos de bacterias quimiolitotróficas, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, que oxidan el amonio a nitrito y éste a nitrato, respectivamente. El siguiente esquema resume el ciclo biológico del nitrógeno:



#### *Asimilación de nitrógeno inorgánico*

La asimilación de nitrógeno inorgánico, es decir, su reducción e incorporación a esqueletos carbonados, la realizan bacterias, cianobacterias, hongos, algas y plantas. Si bien no es una capacidad exclusiva de organismos fotolitotróficos, en éstos la asimilación de formas inorgánicas de nitrógeno es un

proceso genuinamente fotosintético, que ocurre con el concurso de la energía solar y procediendo los electrones requeridos de la fotólisis del agua (Losada et al. 1981).

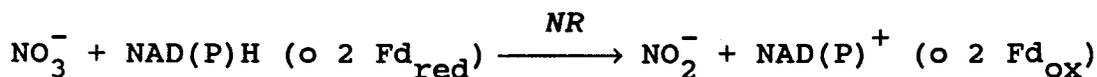
De las distintas formas de nitrógeno inorgánico que pueden asimilarse, el nitrato es la más abundante en el suelo puesto que habitualmente el amonio es rápidamente nitrificado (Haynes 1986). Dado que el nitrógeno atmosférico, a pesar de su abundancia, sólo es accesible a un reducido número de organismos, se comprende que la asimilación de nitrato sea un proceso de gran importancia para la adquisición de nitrógeno. La asimilación del amonio exógeno puede ser importante en la nutrición del fitoplancton (McCarthy y Goldman 1979) y en aquellas condiciones que no favorecen la nitrificación en el suelo (Haynes 1986).

Las distintas formas de nitrógeno inorgánico que pueden utilizar los seres vivos ( $N_2$ ,  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$ , principalmente) son asimiladas en tres etapas:

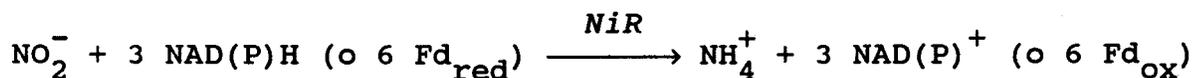
(i) *Transporte al interior de la célula*, que en el caso de las formas combinadas de nitrógeno es dependiente de energía y está mediado por permeasas específicas (Ullrich 1987).

(ii) *Reducción hasta amonio*. La reducción de nitrato se consigue por la acción sucesiva de las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) (Losada et al. 1981). La primera

de estas enzimas cataliza la reducción de nitrato hasta nitrito:



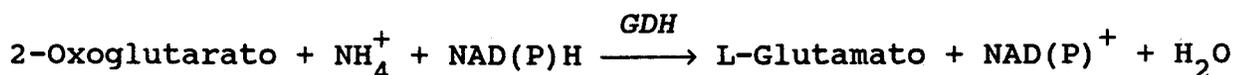
siendo la enzima de procariotas dependiente de ferredoxina y la de eucariotas de piridín nucleótidos. A continuación, la nitrito reductasa cataliza la reducción de nitrito hasta amonio, que consume 6 electrones suministrados por ferredoxina o piridín nucleótidos, según se trate de organismos fotosintéticos o no, respectivamente:



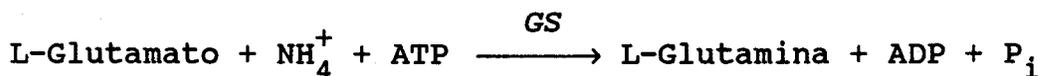
Finalmente, la reducción del dinitrógeno hasta amonio es un proceso complejo que está catalizado por la nitrogenasa y consume 6 electrones, suministrados por ferredoxina o flavodoxina, y una cantidad considerable de ATP (Yates 1980).

(iii) *Asimilación de amonio.* Por asimilación de amonio se entiende su incorporación a esqueletos carbonados, que puede producirse principalmente a través de dos rutas metabólicas:

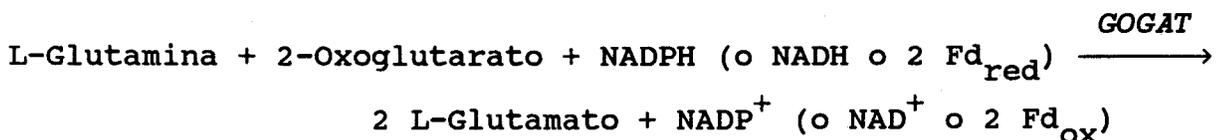
(a) *Aminación reductiva del 2-oxoglutarato para formar L-glutamato, reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH):*



(b) Incorporación inicial del amonio como grupo amido de la L-glutamina, catalizada por la glutamina sintetasa (GS):



seguida por la transferencia del grupo amido de la L-glutamina al 2-oxoglutarato para formar el grupo  $\alpha$ -amino del L-glutamato, reacción catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT, de glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa):

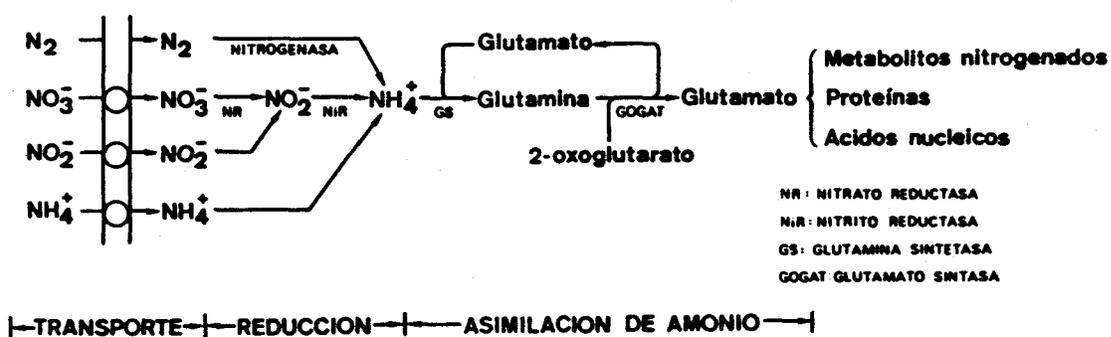


A la acción secuencial de estas dos enzimas se la conoce como ciclo GS/GOGAT, que produce la síntesis neta de L-glutamato a partir de 2-oxoglutarato y amonio, siendo reciclada continuamente una molécula de L-glutamato.

Independientemente de la ruta metabólica seguida, los productos primarios de la asimilación de amonio son la L-glutamina y el L-glutamato. Desde estos aminoácidos, el nitrógeno es distribuido a distintos componentes celulares, permitiendo así la síntesis de los restantes aminoácidos, de bases nitrogenadas y de otros metabolitos nitrogenados indispensables para la vida celular.

### Asimilación de amonio en microalgas y plantas

En microalgas (cianobacterias y algas eucarióticas) y plantas se considera que la asimilación de amonio ocurre principalmente a través de la ruta GS/GOGAT (Lea y Miflin 1979). El siguiente esquema resume el proceso de asimilación de nitrógeno inorgánico en estos organismos:



Las principales evidencias del funcionamiento de esta ruta provienen de estudios de marcaje isotópico y estudios con inhibidores de las enzimas que intervienen en ella. Así, en la cianobacteria *Anabaena cylindrica* se ha observado que cuando se utiliza  $^{13}\text{N}$ , la radiactividad aparece inicialmente en el grupo amido de la L-glutamina y sólo posteriormente se transfiere al grupo  $\alpha$ -amino del L-glutamato y otros aminoácidos (Wolk et al. 1976, Meeks et al. 1977, Thomas et al. 1977). Por otra parte, al tratar las células con MSX, inhibidor de la GS, todo el  $^{13}\text{N}$  se acumula como amonio, mientras que en presencia de azaserina, inhibidor de la GOGAT y de las restantes reacciones de

transferencia del grupo amido de la L-glutamina, la radiactividad permanece en la L-glutamina, evitándose su incorporación a otros aminoácidos (Wolk et al. 1976). Resultados similares se han descrito en *Chlorella* (van der Meulen y Bassham 1959), en *Lemna* (Stewart y Rhodes 1976) y otra vez en *Anabaena cylindrica* (Stewart y Rowell 1975, Ladha et al. 1978).

Otra evidencia de la participación del ciclo GS/GOGAT en la asimilación de amonio es el fenómeno de la excreción de amonio al medio de cultivo por células tratadas con MSX, observado en *Chlamydomonas* (Cullimore y Sims 1980, Hipkin et al. 1982), *Chlorella* (Beudeker y Tabita 1984) y *Ankistrodesmus* (Larsson et al. 1982a). En estas condiciones, el amonio que se genera dentro de la célula durante la fotorrespiración y otros procesos no puede reasimilarse al estar inactiva la GS. También la producción estequiométrica de amonio a partir de nitrato o nitrito por células de *Anacystis nidulans* (Flores et al. 1983a) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Florencio y Vega 1983a) tratadas con MSX indica que la asimilación de amonio ocurre a través de esta ruta.

A pesar del amplio consenso que existe para considerar la ruta GS/GOGAT como la principal vía de adquisición de nitrógeno orgánico por microalgas y plantas, en ocasiones se ha propuesto que la asimilación de amonio en algunos de estos organismos puede ocurrir por la acción de la GDH. De hecho, en las algas eucarióticas *Chlorella autotrófica* (Ahmad y Hellebust 1984) y

*Stichococcus bacillaris* (Ahmad y Hellebust 1986), células con un alto nivel de NAD(P)H-GDH pueden crecer en presencia de MSX, que inactiva la mayor parte de la GS.

## MATERIALES Y METODOS

## Organismo y condiciones de cultivo

El trabajo experimental descrito en la presente memoria se ha realizado con la estirpe silvestre 21 gr del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Habitualmente, las células se cultivaron a 25° C, en medio líquido, utilizando recipientes transparentes de 0,25, 1, ó 5 l, que se iluminaron con luz fluorescente blanca que proporcionaba 15-20 W m<sup>-2</sup> en la superficie de los cultivos.

El medio de cultivo empleado fue el descrito previamente por Sueoka et al. (1967) que contenía por litro los siguientes compuestos : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,44 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 g; MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,061 g; CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 0,020 g y 5 ml de una disolución de microelementos. Esta última se preparó según Hutner et al. (1959), disolviendo en 550 ml de agua destilada, a 100° C y por el orden indicado, los siguientes compuestos: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,28 g; ZnSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 4,40 g; MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 1,02 g; FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1,00 g; CoCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O, 0,32 g; CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O, 0,32 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 0,22 g. A esta disolución se le añadió otra que contenía 10 g de EDTA (ácido libre) en 250 ml de agua destilada (la disolución del EDTA se facilitó con KOH) y la mezcla resultante se calentó a 100° C, ajustando el pH, tras dejar enfriar hasta 80° C, a 6,8 con KOH al 20 % (p/v). El volumen se completó hasta 1 l con agua destilada, manteniéndose la disolución resultante en oscuridad durante dos días antes de ser utilizada. Como fuente de nitrógeno se emplearon 0,95 g de KNO<sub>3</sub> ó 0,5 g de NH<sub>4</sub>Cl.

Por los cultivos se hizo pasar aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  (5 %, v/v). Las células utilizadas en los experimentos se recogieron por centrifugación (5.000 x g) de cultivos en fase exponencial de crecimiento. El tiempo de duplicación en las condiciones de cultivo empleadas fue de 8 h aproximadamente.

En este trabajo se citan, como condiciones especiales de cultivo, la carencia de nitrógeno, la limitación o carencia de  $\text{CO}_2$  y el mantenimiento en oscuridad. Para obtener *cultivos deficientes en nitrógeno*, células en fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con medio de cultivo sin fuente de nitrógeno, en el que finalmente se resuspendieron, manteniéndose durante 18 h en las condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente. La *limitación de  $\text{CO}_2$*  se consiguió al no suplementar con  $\text{CO}_2$  el aire que llegaba a los cultivos. Cuando se precisó aire libre de  $\text{CO}_2$ , éste se obtuvo haciendo pasar el aire por una disolución 5 M de KOH antes de que alcanzara las células. Los cultivos se mantenían en oscuridad envolviendo con papel de aluminio los recipientes que los contenían.

La conservación del organismo se consiguió manteniendo las células en medio sólido, obtenido suplementando el medio líquido previamente descrito con agar (2 %, p/v). Los inóculos nuevos se expusieron a luz intensa para obtener un buen crecimiento inicial y después de 3-4 días se trasladaron a un ambiente con luz difusa. Los cultivos se renovaban cada tres meses.

Las células se cultivaron habitualmente en condiciones de esterilidad, lo que requería que los medios de cultivo y los recipientes que los contenían se calentaran a 120° C (1 atmósfera de sobrepresión) durante 20 min.

#### Preparación de extractos crudos

Las células se recogieron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 660 nm entre 1,5 y 2) por centrifugación a 5.000 x g durante 5 min. Para romper las células, se sumergieron en aire líquido durante 1 min y se descongelaron posteriormente en presencia del *tampón estándar* (5 ml por g de peso húmedo de células), que fue MOPS 10 mM, pH 7,0, conteniendo DTE 0,5 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 2,5 mM. En esta etapa, el *tampón* contenía PMSF 0,5 mM, que se disolvió previamente en una cantidad mínima de isopropanol, de tal manera que se diluyera al menos 100 veces al añadirlo al *tampón*. La preparación resultante se centrifugó a 16.000 x g durante 15 min, utilizándose el sobrenadante como extracto crudo libre de células.

#### Determinaciones analíticas

##### *Amonio*

En los ensayos de consumo de amonio, la concentración de éste en el medio de cultivo se determinó habitualmente por el método

del fenol-hipoclorito (Solorzano 1969). A una parte alícuota del medio de cultivo, desprovista de células y conteniendo entre 0 y 100 nmoles de amonio, se le añadió agua destilada hasta completar un volumen de 1,6 ml. Posteriormente, y por este orden, se añadieron 0,2 ml de fenol al 10 % (p/v) en etanol absoluto, 0,2 ml de nitroprusiato sódico al 0,5 % (p/v) y 0,5 ml de una disolución oxidante, que se preparó inmediatamente antes de usarse mezclando 20 ml de una disolución alcalina estable (que contenía 20 g de citrato trisódico dihidratado y 1 g de NaOH por cada 100 ml de agua destilada) con 5 ml de una disolución de hipoclorito (conteniendo 1 ml de hipoclorito sódico comercial por cada 7 ml de agua destilada). Tras agitar vigorosamente, se dejó estar 2 h en oscuridad para que se desarrollase el color y posteriormente se midió la absorbancia a 640 nm ( $E_{640} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Cuando el medio de cultivo contenía MSX o azaserina, la concentración de amonio en el mismo se determinó enzimáticamente siguiendo la oxidación de NADH dependiente de amonio y catalizada por la glutamato deshidrogenasa (Da Fonseca Wollheim et al. 1974). A una parte alícuota del medio de cultivo, de la que se habían separado previamente las células y que contenía entre 0 y 200 nmoles de amonio, se le añadió agua destilada hasta completar un volumen de 0,4 ml y, a continuación, 0,6 ml de una mezcla de reacción que contenía 5 mg de NADH, 10,5 mg de ADP, 5 ml de una disolución 50 mM de 2-oxoglutarato (ajustada a pH 7,5 con NaOH) y 10 ml de una disolución 250 mM de

trietanolamina (ajustada a pH 8,6 con HCl). El amonio se determinó midiendo la absorbancia a 340 nm de las muestras antes y después de la adición de 25  $\mu$ l de glutamato deshidrogenasa de hígado bovino ( $240 \text{ U ml}^{-1}$ ) disuelta en glicerina al 50 % (v/v), dejándose pasar 45 min para que la reacción ocurriera completamente. Este método se usó también para determinar el amonio intracelular empleando partes alícuotas de extractos crudos obtenidos al descongelar las células en presencia de tampón trietanolamina-HCl 250 mM, pH 8,6 (3 ml por g de peso húmedo de células) y calentados a  $100^\circ \text{ C}$  durante 2 min para destruir las actividades enzimáticas.

Para determinar concentraciones de amonio en el medio de cultivo superiores a 1 mM, se utilizaron los reactivos comerciales A y B de Nessler mezclados en la proporción 1:1. A una parte alícuota de medio de cultivo, libre de células y conteniendo entre 100 y 700 nmoles de amonio, se le añadió agua destilada hasta completar un volumen de 3 ml y 0,1 ml de la mezcla recién preparada de ambos reactivos, dejándose transcurrir 1 min antes de medir la absorbancia a 410 nm ( $E_{410} = 3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Clorofila*

La concentración de clorofila se determinó por el método de Arnon (1949), usando 0,2-1 ml de suspensión celular que se calentaron durante 2 min a  $100^\circ \text{ C}$ , añadiéndose posteriormente

acetona hasta completar 5 ml. Tras centrifugar a 3.000 x g durante 5 min, se midió la absorbancia del sobrenadante a 652 nm ( $E_{652} = 34,5 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ ).

### *L-Glutamato*

El L-glutamato producido durante el ensayo de las actividades GOGAT se determinó siguiendo básicamente el método descrito por Match *et al.* (1980), que se inicia con la separación, mediante intercambio iónico, del L-glutamato formado y la L-glutamina utilizada como sustrato. Para ello, los 2 ml de la mezcla de reacción se aplicaron a una columna conteniendo alrededor de 2 ml de la resina intercambiadora de aniones AG 1-X8 (forma acetato) y equilibrada con agua. A continuación, la columna se lavó con 10 ml de agua para extraer la L-glutamina y posteriormente el L-glutamato se separó de la resina con 8 ml de una disolución 2 N de ácido acético.

El L-glutamato se midió colorimétricamente después de reaccionar con el reactivo de cadmio-ninhidrina, que contenía 80 ml de etanol, 20 ml de agua, 10 ml de acético glacial, 0,4 g de ninhidrina y 1 g de acetato de cadmio (II). Para ello, se añadieron 2 ml del mencionado reactivo a 1 ml de la muestra acética y tras calentar a 80° C durante 10 min y enfriar posteriormente el mismo tiempo a 4° C para estabilizar el complejo coloreado, se midió la absorbancia a 506 nm ( $E_{506} = 6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *$\gamma$ -Glutamil hidroxamato*

El  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado por la actividad transferasa de la GS se determinó según Shapiro y Stadtman (1970a), por su reacción con el reactivo de hierro en medio ácido, que estaba formado por 7,7 ml de HCl al 37 % (p/p), 60,2 ml de ácido tricloroacético al 20 % (p/p), 33,3 g de  $\text{Fe}_3\text{Cl}$  y agua destilada hasta completar 1 l. Para ello, 2 ml de la muestra se trataron con 2 ml del reactivo férrico y tras 5 min a temperatura ambiente, y separar en el ensayo *in situ* los restos celulares, se midió la absorbancia a 500 nm ( $E_{500} = 1,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Nitrato*

El nitrato se midió espectrofotométricamente por el método de Cawse (1967), tratando una parte alícuota de medio de cultivo (conteniendo entre 0 y 100 nmol de nitrato), después de separar las células y completarla hasta 0,75 ml con agua destilada, con 0,05 ml de ácido sulfámico al 10 % (p/v). Tras agitar fuertemente y esperar 2 min, se añadieron 0,2 ml de ácido perclórico al 20 % (v/v) y se midió la absorbancia a 210 nm ( $E_{210} = 7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Nitrito*

El nitrito se midió colorimétricamente por la reacción de

diazotación de Griess-Illosway, según el método de Snell y Snell (1949). Una muestra de 3 ml conteniendo entre 0 y 80 nmol de nitrito se trató con 1 ml de sulfanilamida al 1,5 % (p/v) disuelta en HCl 2,5 N y 1 ml de N-naftil-etilendiamina al 0,02 % (p/v) en agua destilada. Se dejó desarrollar el color durante 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm ( $E_{540} = 53 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### *Oxígeno*

El oxígeno se determinó con un electrodo de Pt/AgCl tipo Clark. Como fuente de iluminación se empleó luz blanca procedente de una lámpara de tungsteno (aproximadamente 200 W  $\text{m}^{-2}$  en la superficie de la cámara del electrodo). El calibrado se realizó eliminando el  $\text{O}_2$  del agua destilada haciendo pasar por ella  $\text{N}_2$  (el contenido en oxígeno del agua a 25° C es de 0,253  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ ).

### *Proteína*

La proteína se determinó según el método de Lowry et al. (1951), tratando 0,5 ml de muestra, conteniendo entre 0 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína, con 2,5 ml de una disolución preparada mezclando 50 ml de una disolución conteniendo un 4 % (p/v) de carbonato sódico y un 0,8 % (p/v) de NaOH con 0,5 ml de una disolución al 2 % (p/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$  y 0,5 ml de una disolución al 4% (p/v) de tartrato sódico potásico tetrahidrato, completándose el

volumen hasta 100 ml con agua destilada. Después de agitar fuertemente, se esperó 10 min a temperatura ambiente, y se añadió a continuación 0,25 ml del reactivo Folin-Ciocalteu comercial diluido en proporción 1:1. Después de esperar 30 min, se midió la absorbancia a 750 nm ( $E_{750} = 21 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ ). El calibrado se realizó con una disolución de seroalbúmina al 0,2 %, cuya concentración se midió espectrofotométricamente con precisión utilizando un coeficiente de extinción a 279 nm de  $0,67 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ ml}$  (Rideal y Roberts 1951).

Durante las cromatografías, la proteína se midió por absorbancia a 280 nm.

#### Determinación de actividades enzimáticas

##### *Permeabilización de las células*

Para las determinaciones de actividad *in situ*, 1-10 ml de cultivo se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min y resuspendieron en 1 ml del correspondiente tampón. Las células se permeabilizaron añadiendo 25  $\mu\text{l}$  de tolueno comercial y agitando vigorosamente durante 1 min.

##### *Glutamato sintasa*

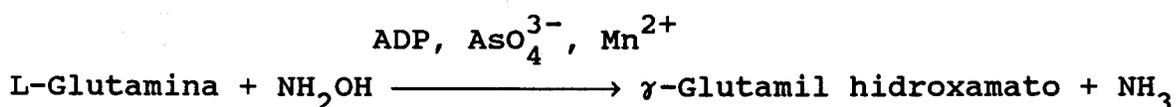
Las actividades GOGAT se determinaron *in situ* usando 0,5 ml de una suspensión de células permeabilizadas en tampón fosfato

potásico 50 mM, pH 7,5, a los que se añadieron 0,9 ml de una mezcla de reacción que contenía 50 ml de agua destilada, 40 ml de tampón fosfato potásico 0,5 M, pH 7,5, 146 mg de L-glutamina y 168,1 mg de 2-oxoglutarato monosódico. Posteriormente, se añadieron 0,2 ml de aminooxiacetato 50 mM y, según la actividad a determinar, 0,2 ml de NADH 15 mM en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 (actividad NADH-GOGAT), 0,2 ml de metil viológeno 20 mM (actividad MVH-GOGAT) ó 0,2 ml de una disolución de ferredoxina en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0, con una absorbancia a 420 nm de 0,5 aproximadamente (actividad Fd-GOGAT). El metil viológeno y la ferredoxina fueron reducidos químicamente añadiendo 0,2 ml de una disolución reciente de ditionito sódico que contenía 20 mg por cada ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M. En el caso de la actividad NADH-GOGAT el volumen de reacción se completó con 0,2 ml de agua destilada.

La reacción se inició con la adición del agente reductor, y después de 20 min a 30° C se detuvo calentando la mezcla de reacción en agua hirviendo durante 1 min y agitando fuertemente para oxidar el exceso de reductor. A continuación, los restos celulares se retiraron de la mezcla de ensayo y se midió el L-glutamato. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de L-glutamato en 1 min.

### Glutamina sintetasa

Además de catalizar la síntesis de L-glutamina a partir de amonio y L-glutamato y de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato a partir de hidroxilamina y L-glutamato, en presencia de ATP (denominadas reacciones biosintética y sintética respectivamente), la GS puede catalizar la actividad  $\gamma$ -glutamil transferasa según la siguiente reacción:



La actividad transferasa es varias veces superior a la (bio)sintética lo que, unido al hecho de que el  $\gamma$ -glutamil hidroxamato es fácil de cuantificar colorimétricamente, explica que este ensayo sea empleado rutinariamente en las medidas de actividad GS. A pesar de que se ha señalado que la interpretación de la actividad transferasa de extractos crudos en términos de actividad GS puede ser problemática (Mifflin y Lea 1977), en microalgas, incluyendo *Chlamydomonas*, y plantas se ha observado en repetidas ocasiones que las variaciones de actividad (bio)sintética en extractos crudos o células permeabilizadas van acompañadas de cambios similares en el nivel de actividad transferasa (Rhodes et al. 1975, Rowell et al. 1977, Taylor y Stewart 1980, Cullimore 1981, Ahmad y Hellebust 1984, Florencio et al. 1987, Ahmad y Hellebust 1989).

La actividad transferasa de la GS se determinó midiendo el

$\gamma$ -glutamil hidroxamato formado durante la reacción (Shapiro y Stadtman 1970a). Habitualmente, la GS se midió *in situ* usando 1 ml de células permeabilizadas en tampón MOPS 50 mM, pH 7,0, a las que se añadieron 0,8 ml de una mezcla de reacción que contenía 52 ml de agua destilada, 8 ml de tampón MOPS 0,5 M, pH 7,0, 1,4 g de L-glutamina, 47,6 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  y 13 mg de ADP. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de hidroxilamina 2,4 M, 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 1,2 M y 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1 M. Para la medida de actividad *in vitro* se procedió del mismo modo, excepto en que la suspensión de células se sustituyó por una cantidad adecuada de disolución enzimática cuyo volumen se completó hasta 1 ml con tampón MOPS 50 mM, pH 7,0.

La reacción se inició al añadir el arseniato y después de 10 min a 30° C se paró con 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que permite la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato en 1 min.

#### Nitrato reductasa

La nitrato reductasa activa se determinó *in situ* midiendo el nitrito formado durante la reacción y usando metil viológeno reducido como donador de electrones (Florencio y Vega 1983a). Para ello, se utilizó 1 ml de células permeabilizadas en medio de cultivo sin nitrógeno, a las que se añadieron 0,9 ml de una mezcla de ensayo que contenía 40 ml de agua destilada, 10 ml de

Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, 42,5 mg de nitrato sódico y 2,6 mg de metil viológeno. La reacción se inició añadiendo 0,1 ml de una disolución reciente de ditionito sódico en Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, que contenía 40 mg por ml. La actividad total de la enzima se midió del mismo modo, incubando previamente las células permeabilizadas con 50  $\mu$ l de una disolución 6 mM de ferricianuro potásico durante 2 min a 30° C.

La reacción comenzó al añadir el ditionito y después de 10 min a 30° C se paró agitando vigorosamente hasta oxidar el exceso de reductor. El nitrito producido se midió después de separar por centrifugación los restos celulares. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu$ mol de nitrito por min.

#### *Nitrito reductasa*

La actividad nitrito reductasa se midió *in vitro* como desaparición de nitrito, empleando metil viológeno reducido como donador de electrones (Vega et al. 1980). Las células contenidas en 10 ml de cultivo se recogieron por centrifugación y se sumergieron durante 30 s en aire líquido, descongelándose posteriormente en presencia de 0,5 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. La suspensión resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, tomándose a continuación 0,4 ml del sobrenadante a los que se añadieron 0,5 ml de una mezcla de reacción que contenía 30 ml de agua destilada, 10 ml de Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, 25 mg de



nitrito potásico y 51 mg de metil viológeno. Finalmente, se añadieron 0,1 ml de una disolución reciente de ditionito sódico conteniendo 100 mg por cada ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M.

La reacción se inició al añadir el ditionito y después de 10 min a 40° C se paró agitando fuertemente hasta oxidar el exceso de reductor. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima necesaria para hacer desaparecer 1  $\mu\text{mol}$  de nitrito en 1 min.

#### Separación de isoenzimas con actividad glutamina sintetasa

Extractos obtenidos a partir de 10 g de células (peso húmedo) se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa (32 x 1,6 cm) equilibrada previamente con tampón estándar. La columna se lavó a continuación con 200 ml del tampón conteniendo NaCl 50 mM. Finalmente, la actividad GS se separó de la columna con un gradiente lineal de NaCl desde 50 hasta 250 mM en 200 ml de tampón estándar. Todo el proceso se realizó a un flujo de 15 ml  $\text{h}^{-1}$ .

#### Purificación de ferredoxina

En los ensayos de actividad Fd-GOGAT se utilizó ferredoxina de *C. reinhardtii*, purificada según el método descrito por Galván et al. (1985). La relación de absorbancias de la proteína purificada,  $A_{420}/A_{275}$ , fue 0,5 aproximadamente.

### *Tratamiento con sulfato de protamina*

A un extracto crudo obtenido por descongelación en presencia de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0 (5 ml por g de peso húmedo de células), se le añadió una disolución de sulfato de protamina al 2 % (p/v) (1 ml por cada 10 ml de extracto), ajustada a pH 7,0 con KOH. Después de unos 10 min con agitación suave, la suspensión se centrifugó a 16.000 x g durante 15 min.

### *Cromatografía en DEAE-sefacel*

El sobrenadante resultante del tratamiento con protamina se aplicó a una columna de DEAE-sefacel (40 x 2,6 cm) equilibrada con tampón fosfato. Después de lavar la columna con 750 ml de dicho tampón conteniendo NaCl 0,3 M, la ferredoxina se eluyó de la columna con NaCl 0,5 M en el tampón. Todo el proceso se realizó a un flujo de 60 ml h<sup>-1</sup>.

Las fracciones de la etapa anterior que contenían ferredoxina se mezclaron, se diluyeron 5 veces con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,0 y se aplicaron a una segunda columna de DEAE-sefacel (40 x 1,6 cm) equilibrada con el mismo tampón. Tras lavar la columna con 300 ml de tampón conteniendo NaCl 0,2 M, la ferredoxina se eluyó de la columna con un gradiente lineal desde 0,2 hasta 0,7 M de NaCl en 300 ml de tampón. En este caso, la cromatografía se realizó a un flujo de 35 ml h<sup>-1</sup>. Las fracciones

con ferredoxina se mezclaron y se dializaron durante una noche frente a 5 l de tampón.

### **Diálisis**

Las diálisis para la eliminación de sales se realizaron en bolsas de celulosa (2,4 nm de tamaño de poro), que se habían hervido en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$  al 1 % (p/v) y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  al 0,01 % (p/v) durante 30 min y lavado a continuación con abundante agua destilada, almacenándose hasta su uso en una disolución de azida sódica al 2 % (p/v).

### **Variación experimental**

Los resultados mostrados son datos representativos o valores medios de al menos dos experimentos independientes realizados con diferentes cultivos. En el segundo caso, las medias se presentan con las correspondientes desviaciones estándar (SD) y el número de experimentos realizados (n)

### **Aparatos y reactivos**

Las medidas de absorbancia se realizaron a temperatura ambiente en los espectrofotómetros ultravioleta-visible Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000, y Beckman, modelo DU-7. Se utilizaron cubetas de cuarzo para longitudes de onda inferiores a 340 nm y de plástico o cristal para el resto.

Las centrifugaciones se realizaron con centrifugas refrigeradas Sorvall, modelo RC-5B con rotores SS-34 y GSA, y Beckman, modelo J2-21 con rotores JA-20 y JA-14. Para la determinación de las actividades enzimáticas *in situ*, las células se recogieron con una centrifuga Heraeus, modelo Labofuge. Las preparaciones de volumen inferior a 1,5 ml se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf, modelo 5415.

En las cromatografías se utilizaron columnas de Pharmacia, las bombas peristálticas P1 de Pharmacia y Microperpex 2132 de LKB y los colectores de fracciones Frac-100 de Pharmacia y Redirac 2112 de LKB. La absorbancia a 280 nm se midió con un monitor ultravioleta Uvicord SII, modelo 2238, acoplado a un registrador modelo 2210, ambos de LKB.

Las pesadas se efectuaron en balanzas Mettler, modelos PE 3600 y AE 160, las medidas de pH con un pH-metro Beckman, modelo  $\Phi$  70 y las de oxígeno con un electrodo tipo Clark de Hansatech, provisto de un registrador Linseis, modelo 6512.

La procedencia de los productos químicos que se citan era la siguiente: Sigma proporcionó el ADP, aminoxiacetato, azaserina, DTE,  $\gamma$ -glutamil hidroxamato, L-glutamina, metil viológeno, MOPS, MSX, NADH, trizma base, 2-oxoglutarato, PMSF, el sulfato de protamina y la DEAE-celulosa. Las sales empleadas en mayor cantidad en los medios de cultivo, fosfatos, nitrato y nitrito

potásico y cloruro amónico, así como el hidróxido de potasio eran de Panreac, el hipoclorito sódico de Aldrich, la resina de intercambio aniónico AG 1-X8 de BioRad, el agar de Difco, la DEAE-sefacel de Pharmacia y la GDH de Boehringer. Los restantes productos químicos utilizados eran de grado analítico y procedían de Merck. Las bolsas de celulosa para las diálisis (Visking) fueron proporcionadas por Serva. Por otra parte, el agua destilada se obtuvo de un destilador Aquatron, modelo A8S, el anhídrido carbónico se adquirió a la Sociedad Española del Oxígeno y el aire líquido lo suministró el Servicio de Criogenia de la Universidad de Sevilla.

## RESULTADOS Y DISCUSION

I. EFECTO DE LA CARENCIA DE NITROGENO SOBRE LA ASIMILACION  
DE AMONIO POR CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

## Resumen

Células de *Chlamydomonas reinhardtii* sometidas previamente a carencia de nitrógeno son capaces de consumir nitrato, nitrito o amonio en oscuridad y sin fuente de carbono orgánico en el medio. El consumo de amonio en oscuridad es alrededor de un 25 % mayor que en luz; por el contrario, los consumos de nitrato o nitrito en oscuridad son significativamente menores que en luz.

La carencia de nitrógeno aumenta el nivel intracelular de las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa. El incremento de la GS<sub>1</sub> (3 veces) y la NADH-GOGAT (4,5 veces) es mayor que el de la GS<sub>2</sub> (1,5 veces) y la Fd-GOGAT (1,5 veces).

Experimentos realizados con MSX, azaserina y metilamónio sugieren que: i) El amonio y/o la L-glutamina mantienen parcialmente inhibida la expresión de las actividades GS y Fd-GOGAT; y ii) un producto resultante de la asimilación de amonio puede ser modulador negativo de la actividad NADH-GOGAT.

## Introducción

La asimilación de amonio en *C. reinhardtii* ocurre a través de la ruta GS/GOGAT (Cullimore y Sims 1981a, Florencio y Vega 1983a). En esta alga hay dos enzimas con actividad glutamina sintetasa, GS<sub>1</sub> y GS<sub>2</sub>, que pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico (Florencio y Vega 1983b) y dos glutamato

sintasas, NADH-GOGAT y Fd-GOGAT (Cullimore y Sims 1981b, Márquez et al. 1984), lo que parece ser una característica común a la mayoría de células fotosintéticas. En plantas, la GS<sub>1</sub> está localizada en el citosol y la GS<sub>2</sub> en el cloroplasto (Mann et al. 1980, Hirel y Gadal 1981), mientras que ambas GOGAT son enzimas plastídicas (Suzuki y Gadal 1984). En *C. reinhardtii*, la actividad GS está repartida entre el citoplasma y el cloroplasto, mientras que las actividades Fd-GOGAT y NADH-GOGAT aparecen exclusivamente en el cloroplasto (Fischer y Klein 1988). Por consiguiente, no parece que haya dos sistemas GS/GOGAT separados espacialmente dentro de la célula. En algas eucarióticas, el papel fisiológico de las dos GS y las dos GOGAT no se conoce con precisión, mientras que en plantas el aislamiento de mutantes deficientes en GS<sub>2</sub> o Fd-GOGAT capaces de crecer normalmente sólo cuando se suprime la fotorrespiración (Somerville y Ogren 1980, Kendall et al. 1986, Wallsgrove et al. 1986) revela que el papel principal de ambas enzimas es la reasimilación del amonio liberado durante dicho proceso.

El mantenimiento de células de *C. reinhardtii* en un medio de cultivo sin fuente de nitrógeno aumenta el nivel intracelular de las enzimas implicadas en la incorporación de amonio a esqueletos carbonados y también la capacidad de las células para asimilar amonio (Márquez et al. 1986), lo que parece ser un fenómeno general en microalgas (Hipkin et al. 1983). Además de suprimiendo la fuente de nitrógeno del medio, una situación carencial similar puede inducirse inhibiendo la asimilación de

amonio al añadir al cultivo MSX, inhibidor de la GS, o azaserina, inhibidor de la GOGAT y de las restantes reacciones de transferencia del grupo amido de la L-glutamina. El metilamonio es un análogo estructural del amonio que las células de *C. reinhardtii* no pueden usar como fuente de nitrógeno (Franco et al. 1984). Por lo tanto, también en presencia de metilamonio como único compuesto nitrogenado en el medio de cultivo se desarrolla en las células una situación de carencia de nitrógeno. Estas situaciones nutricionales que causan deficiencia en nitrógeno van acompañadas paradójicamente de la acumulación intracelular de distintos compuestos nitrogenados, circunstancia que puede aprovecharse para establecer una correlación entre esos compuestos y los niveles intracelulares de las actividades GS y GOGAT.

## Resultados y discusión

### *Consumo de nitrógeno inorgánico por células deficientes en este elemento*

La Tabla 1 muestra las velocidades de consumo de nitrato, nitrito o amonio por células de *C. reinhardtii* en diferentes condiciones nutricionales. La utilización de nitrógeno inorgánico es dependiente de la luz en células cultivadas con suficiente nitrógeno, como se ha descrito previamente (Thacker y Syrett 1972, Florencio y Vega 1983a). Los consumos de nitrato y nitrito por células sometidas previamente a carencia de

Tabla 1. Consumo de nitrógeno inorgánico en diferentes condiciones nutricionales. Las células normales se cultivaron con nitrato como fuente de nitrógeno. La deficiencia en nitrógeno se consiguió al resuspender dichas células en un medio sin N y mantenerlas durante 18 h en condiciones de crecimiento. En los experimentos de consumo, las células se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en medio de cultivo. A tiempo cero, se añadió a las suspensiones celulares 0,25 mM de nitrato, nitrito o amonio. La concentración de estos compuestos en el medio se determinó cada 5-10 min.

Condiciones experimentales	Consumo de nitrógeno inorgánico $\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{NH}_4^+$
Células normales			
Luz	7,5	12,7	13,8
Oscuridad	0,4	0,1	0,6
Células deficientes en N			
Luz	8,4	12,8	24,0
Oscuridad	5,6	6,7	30,3

nitrógeno son similares a los observados en células que no lo habían sido, mientras que la velocidad de consumo de amonio prácticamente se duplica. Por otra parte, las células deficientes en nitrógeno y mantenidas en oscuridad muestran dos características relevantes: i) Consumen nitrato, nitrito o amonio, indicando que los compuestos orgánicos de carbono acumulados durante el periodo de carencia de nitrógeno se movilizan para proporcionar los esqueletos carbonados, la energía y el poder reductor necesarios para el consumo; y ii) El consumo de amonio es significativamente mayor que en luz (alrededor de un 25 %). Por el contrario, los consumos de nitrato y nitrito son menores en oscuridad que en luz.

La elevada capacidad para utilizar amonio observada en células de *C. reinhardtii* deficientes en nitrógeno puede relacionarse con distintos factores. Por una parte, con el notable incremento de las actividades GS y GOGAT que ocurre en dichas condiciones (véase más adelante). Por otra, se ha propuesto que la carencia de nitrógeno determina en *C. reinhardtii* la aparición de una nueva permeasa para el amonio (Franco 1986). Al mayor consumo de amonio puede contribuir también una utilización eficaz de las reservas endógenas de carbono orgánico. En las microalgas eucarióticas *Chlorella* y *Amphidinium* se ha observado que el amonio estimula la utilización de carbohidratos, movilizandoo una fracción de los mismos no disponibles para el consumo de nitrato (Syrett 1987, Dixon y Syrett 1988). Los citados autores han propuesto que la

formación de algún derivado metabólico del amonio, que se produciría en menor cantidad o más lentamente a partir de nitrato, promueve la degradación de polisacáridos, aumentando el suministro de esqueletos carbonados disponibles para la asimilación de amonio. En este contexto, es interesante señalar que en *Neurospora crassa* se ha observado que un aumento de la velocidad de síntesis de L-glutamina estimula la degradación de sacarosa (Hernández y Mora 1986), estando este efecto mediado posiblemente por un cambio en la relación ATP/ADP. Un mecanismo de este tipo explicaría la falta de estimulación por carencia de nitrógeno del consumo de nitrato, un hecho observado también en otras microalgas (Dortch et al. 1982), que podría atribuirse a una reducida disponibilidad de esqueletos carbonados. La capacidad de las células para asimilar rápidamente amonio, pero no nitrato o nitrito, puede representar una adaptación fisiológica que permita utilizar con rapidez, y antes de su dilución en el medio circundante, pulsos de amonio, los cuales pueden ser accesibles de forma intermitente como resultado de la actividad metabólica de organismos heterótrofos (McCarthy y Goldman 1979).

Otra característica interesante del consumo de amonio por células de *C. reinhardtii* es el hecho de que sea mayor en oscuridad que en luz, lo que puede relacionarse con el aumento de actividad NADH-GOGAT encontrado en células sometidas a carencia de nitrógeno (véase más adelante). La NADH-GOGAT puede actuar como una enzima auxiliar para la asimilación de amonio en

aquellas situaciones en las que la producción de NADH es elevada, lo que probablemente ocurre cuando se mantienen en oscuridad células enriquecidas en reservas de carbono orgánico, como son las sometidas a carencia de nitrógeno. De hecho, es posible que el aumento de esta actividad enzimática sea promovido por un incremento del nivel intracelular de NADH, como sugiere el alto nivel de NADH-GOGAT encontrado en células de *C. reinhardtii* cultivadas heterotróficamente (Márquez et al. 1986).

*Efecto de la carencia de nitrógeno sobre las actividades glutamina sintetasa y glutamato sintasa*

En *C. reinhardtii*, la carencia de nitrógeno eleva el nivel intracelular de las actividades GS y GOGAT. La GS<sub>1</sub> (3 veces) aumenta más que la GS<sub>2</sub> (1,5 veces) (Fig. 1), al igual que ocurre en *Chlorella kessleri* (Sumar et al. 1984), mientras que la NADH-GOGAT (4,5 veces) lo hace más que la Fd-GOGAT (1,5 veces) (Figs. 2 y 3). Estos resultados sugieren algún tipo de asociación funcional entre la GS<sub>1</sub> y la NADH-GOGAT. Sin embargo, no parece que ambas enzimas constituyan un sistema GS/GOGAT citoplasmático separado de otro cloroplástico formado por la GS<sub>2</sub> y la Fd-GOGAT, dado que recientes estudios de citolocalización con cloroplastos intactos y protoplastos de esta alga muestran que ambas GOGAT están en el cloroplasto; por el contrario, una significativa fracción de actividad GS aparece fuera del mismo (Fischer y Klein 1988).

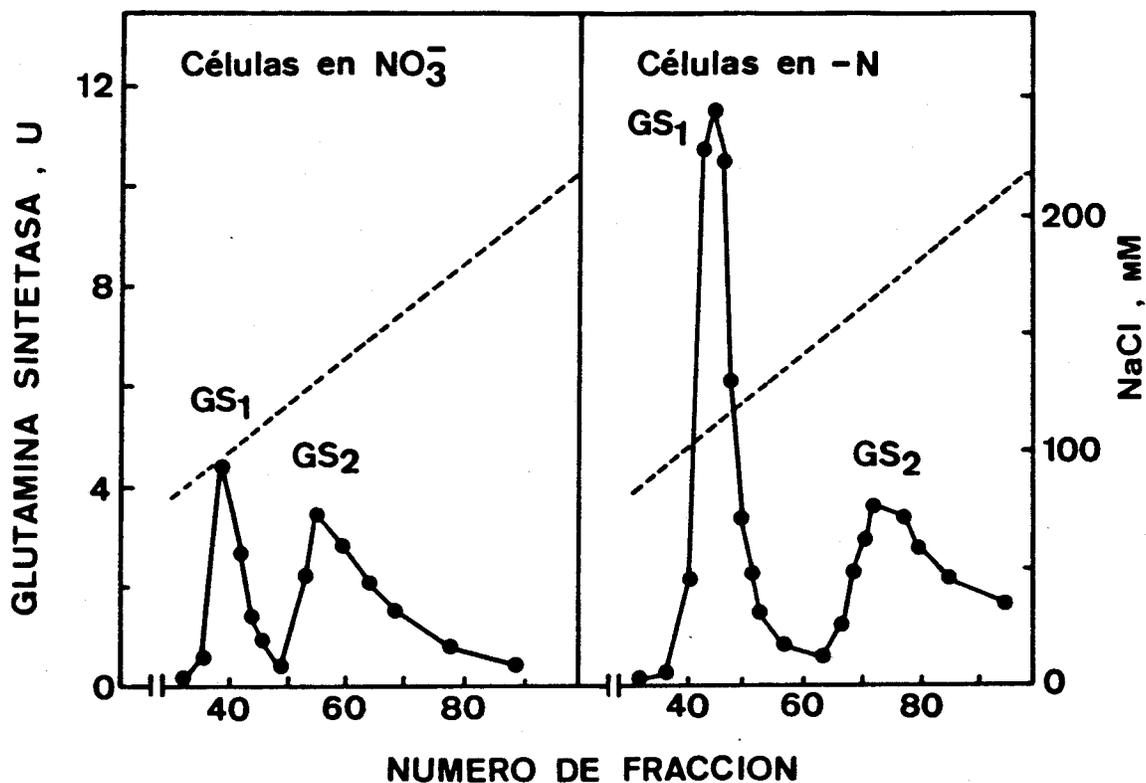


Fig. 1. Perfil de elución de la actividad GS adsorbida en una columna de DEAE-celulosa. Extractos crudos, preparados a partir de células cultivadas con nitrato, y, en su caso, depositadas a continuación en un medio sin fuente de N durante 18 h, se filtraron a través de una columna de DEAE-celulosa (32 x 1,6 cm) equilibrada con tampón estándar. Tras lavar con el mismo tampón suplementado con NaCl 50 mM, la actividad GS se separó de la columna con un gradiente lineal de NaCl en tampón estándar, recogiendo fracciones de 2 ml.

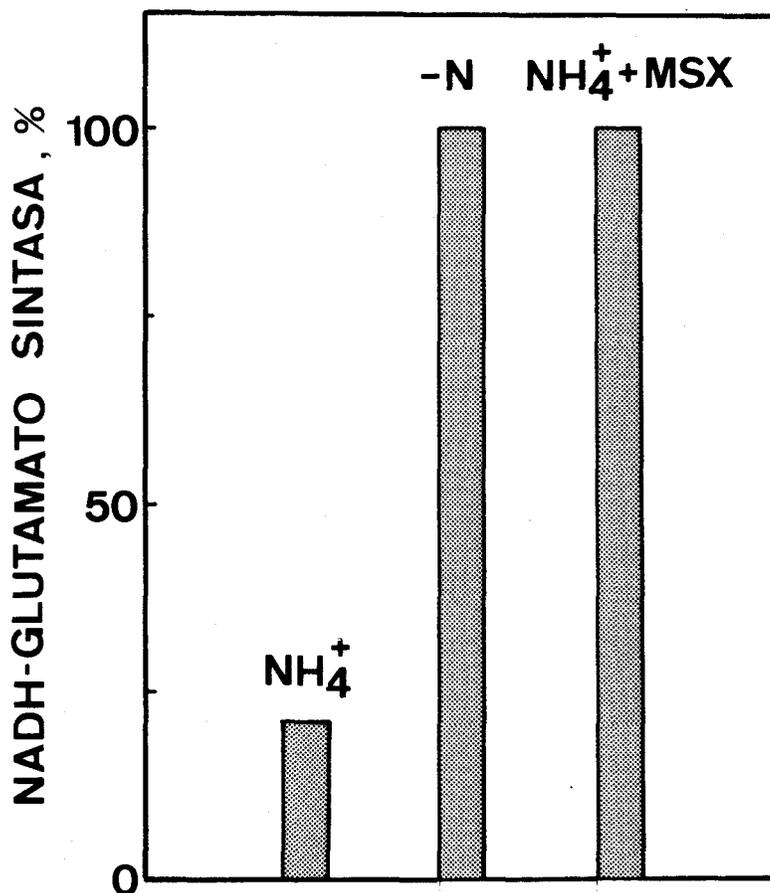


Fig. 2. Nivel intracelular de actividad NADH-GOGAT en células tratadas con MSX. Se usaron células crecidas con amonio. A tiempo cero, se añadió MSX 1 mM a una parte del cultivo, mientras que otras células del mismo se recogieron y resuspendieron en un medio sin fuente de N. Tras 18 h de incubación en condiciones de crecimiento, se determinó la actividad NADH-GOGAT (100 % de actividad =  $0,75 \text{ U (mg Chl)}^{-1}$ ).

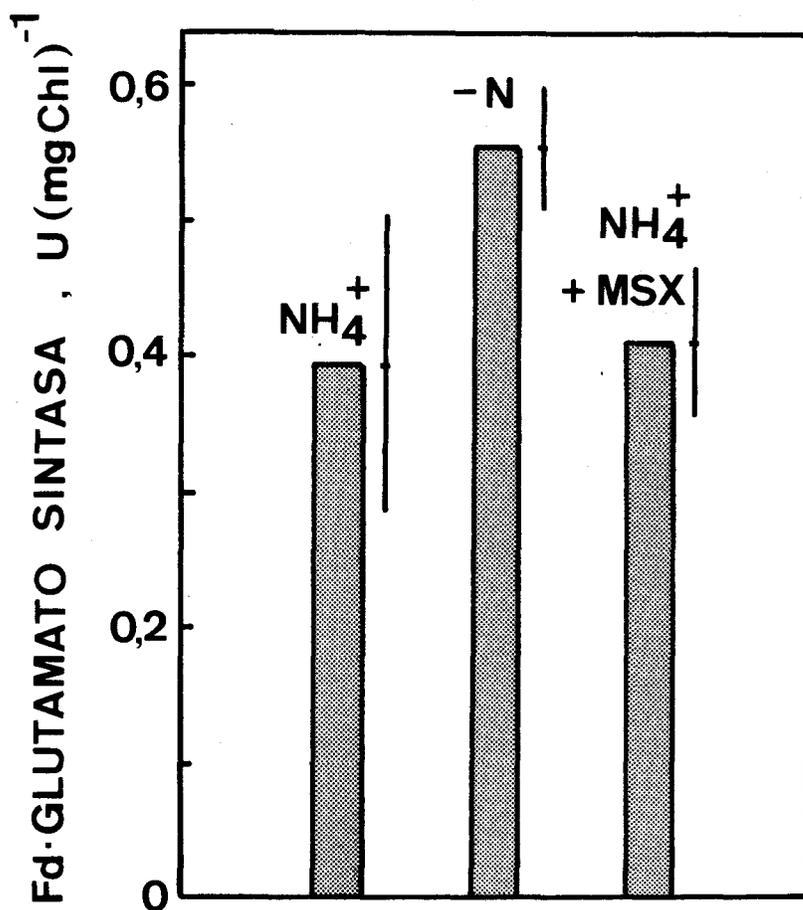


Fig. 3. Nivel intracelular de actividad Fd-GOGAT en células tratadas con MSX. Se usaron células crecidas con amonio. A tiempo cero, se añadió MSX 1 mM a una parte del cultivo, mientras que otras células del mismo se recogieron y resuspendieron en un medio sin fuente de N. Tras 18 h de incubación en condiciones de crecimiento, se determinó la actividad Fd-GOGAT. Los resultados mostrados son los valores medios ( $\pm$  SD) de 4 experimentos independientes.

Parece probable que la expresión de estas enzimas esté parcialmente reprimida por compuestos nitrogenados, que sean relativamente abundantes en células cultivadas con un exceso de nitrógeno y disminuyan al transferir las células a un medio desprovisto de este elemento (Hipkin y Syrett 1977, Everest et al. 1986). Por otra parte, el elevado tiempo de incubación en ausencia de nitrógeno que ha de transcurrir para que las actividades GS y GOGAT alcancen valores máximos (18-21 h) sugiere que el aumento de actividad requiere, al menos parcialmente, síntesis de proteínas. En cultivos sincrónicos de *Chlorella sorokiniana* se ha observado que el incremento de actividad GS causado por la carencia de nitrógeno es debido tanto a activación enzimática como a síntesis de nueva proteína (Tischner y Hüttermann 1980). La aparente estimulación de la síntesis de las proteínas relacionadas con la asimilación de amonio cuando las células no disponen de nitrógeno exógeno exigiría una redistribución del nitrógeno intracelular, formándose esas proteínas a expensas de otras proteínas o pigmentos que pueden ser parcialmente redundantes cuando el crecimiento está limitado (Everest et al. 1986). De hecho, en *C. reinhardtii* el recambio de proteínas es muy intenso en condiciones de deficiencia en nitrógeno (Hipkin et al. 1982).

#### *Inhibición del consumo de amonio por MSX o azaserina*

En células de *C. reinhardtii* tratadas con MSX o azaserina se observa una completa inhibición del consumo de amonio (Fig. 4).

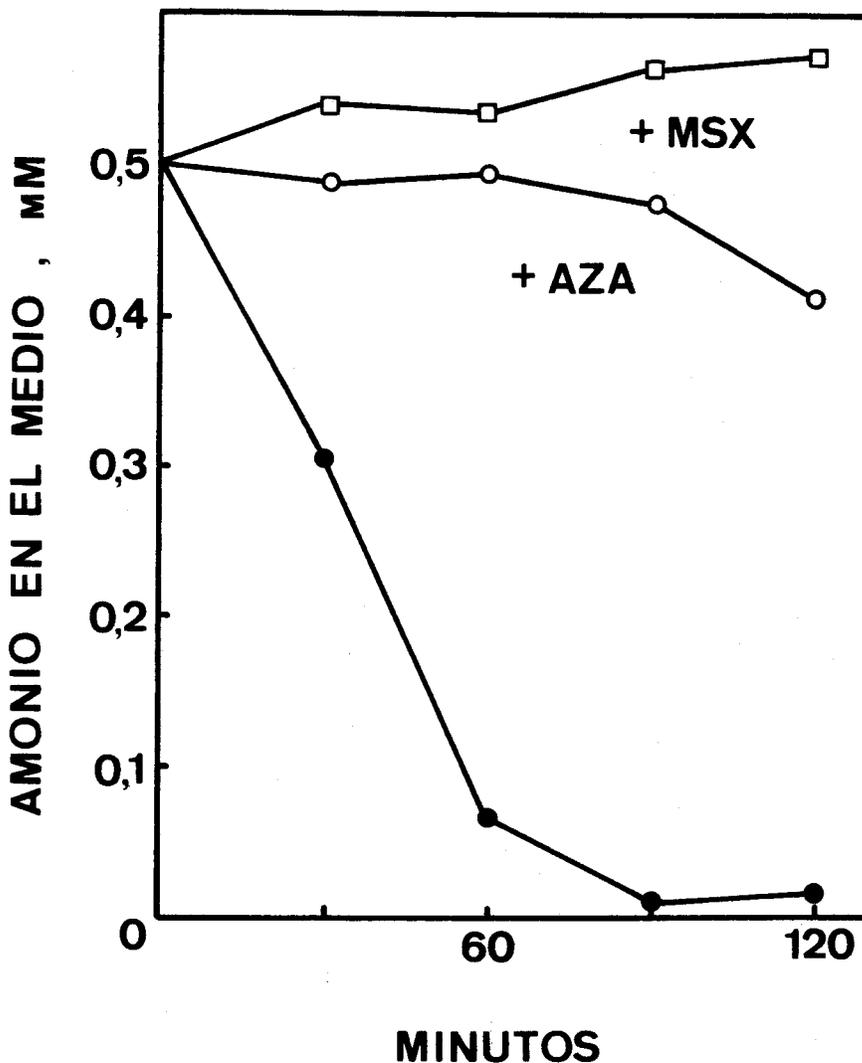
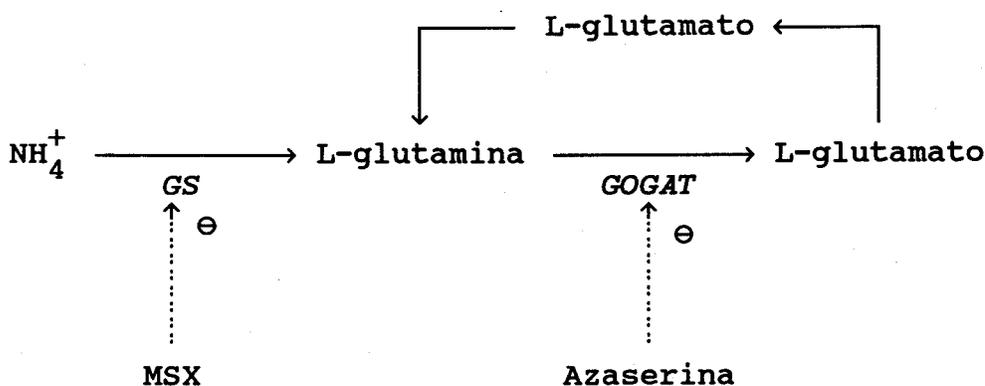


Fig. 4. Inhibición del consumo de amonio por MSX o azaserina. Células cultivadas con amonio se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. La suspensión celular se dividió en tres partes, añadiéndose donde se indica MSX 1 mM o azaserina (AZA) 5 mM. Después de 30 min en condiciones de crecimiento, se añadió a los cultivos 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , determinándose a los tiempos indicados la concentración de amonio en el medio.

Por consiguiente, la adición de alguno de estos compuestos genera en las células una situación de carencia de nitrógeno a pesar de la presencia de amonio en el medio de cultivo. La deficiencia en nitrógeno así inducida puede estar acompañada de la acumulación dentro de la célula de algunos compuestos nitrogenados. Como ilustra el esquema, la adición de MSX a células que asimilan amonio a través de la ruta GS/GOGAT aumenta el nivel intracelular de amonio y la de azaserina los de amonio y L-glutamina (van der Meulen y Bassham 1959, Stewart y Rowell 1975, Wolk et al. 1976, Stewart y Rhodes 1976).



#### *Nivel intracelular de las actividades glutamato sintasa en células tratadas con MSX*

En los experimentos que se muestran en las Figuras 2 y 3, se estudia también el efecto que la limitación de nitrógeno inducida por MSX tiene sobre las actividades GOGAT de *C. reinhardtii*. El tratamiento con este compuesto eleva el nivel intracelular de NADH-GOGAT, siendo dicho incremento igual al

observado cuando se retira la fuente de nitrógeno del medio (Fig. 2). Por el contrario, la actividad Fd-GOGAT no aumenta en células tratadas con MSX (Fig. 3). Estos resultados sugieren que el amonio disminuye la expresión de la actividad Fd-GOGAT, mientras que un producto resultante de su asimilación podría ser modulador negativo de la NADH-GOGAT.

#### *Nivel intracelular de la actividad glutamina sintetasa en células tratadas con azaserina o metilamonio*

En *C. reinhardtii*, el nivel intracelular de la actividad GS se duplica tras 5 h de carencia de nitrógeno (Fig. 5). En presencia de 5 mM de azaserina, lo que mantiene completamente inhibida la actividad MVH-GOGAT, ó 1 mM de metilamonio, el nivel de GS no experimenta variación, sugiriendo estos resultados que el amonio y/o la L-glutamina impiden la expresión máxima de la actividad GS.

El metilamonio entra y se acumula en las células de *C. reinhardtii*, donde es convertido por la GS en un único producto identificado como  $\gamma$ -N-metilglutamina (Franco et al. 1984). Cuando células mantenidas durante 4 h en presencia de metilamonio se depositan en un medio desprovisto de nitrógeno (lo que disminuye el nivel intracelular de metilamonio y aumenta el de metilglutamina) la actividad GS aumenta notablemente (Fig. 6). Este resultado sugiere que el amonio (metilamonio) y no la L-glutamina (metilglutamina) puede ser el modulador negativo de

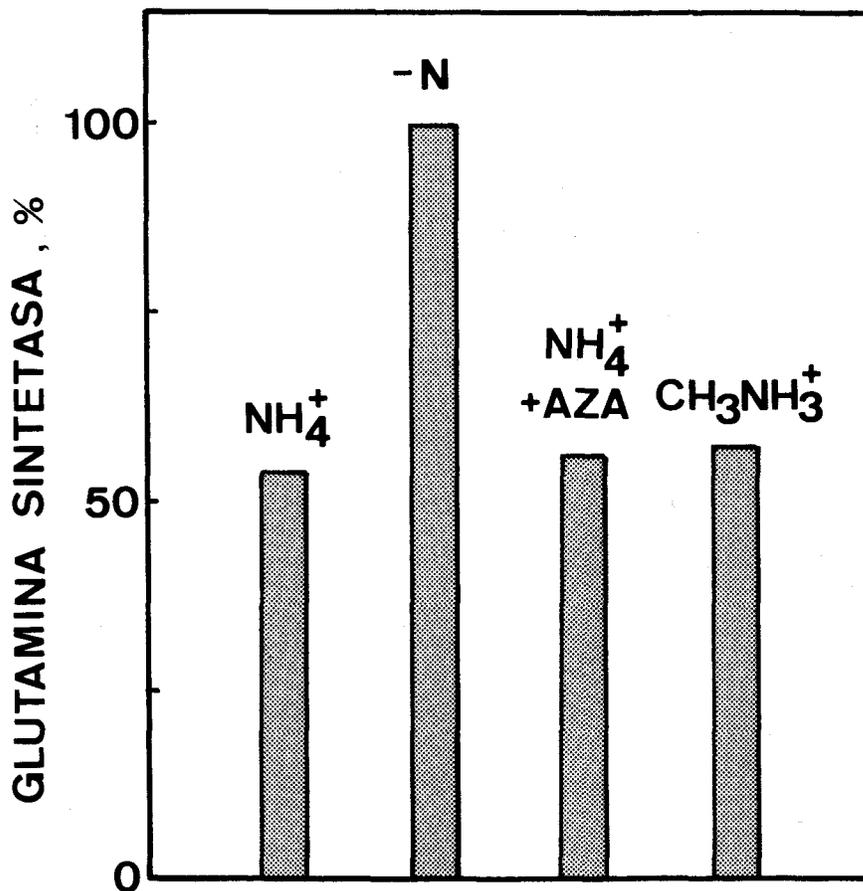


Fig. 5. Nivel intracelular de actividad GS en células tratadas con azaserina o metilamonio. Se utilizaron células crecidas con amonio como fuente de N. A tiempo cero, se añadió azaserina (AZA) 5 mM a una parte del cultivo, mientras que otras células del mismo se recogieron y resuspendieron en un medio sin fuente de N, añadiéndose donde se indica metilamonio 1 mM. Después de 5 h de incubación en condiciones de crecimiento, se determinó la actividad GS de los distintos cultivos (100 % de actividad = 0,8 U (mg chl)<sup>-1</sup>).

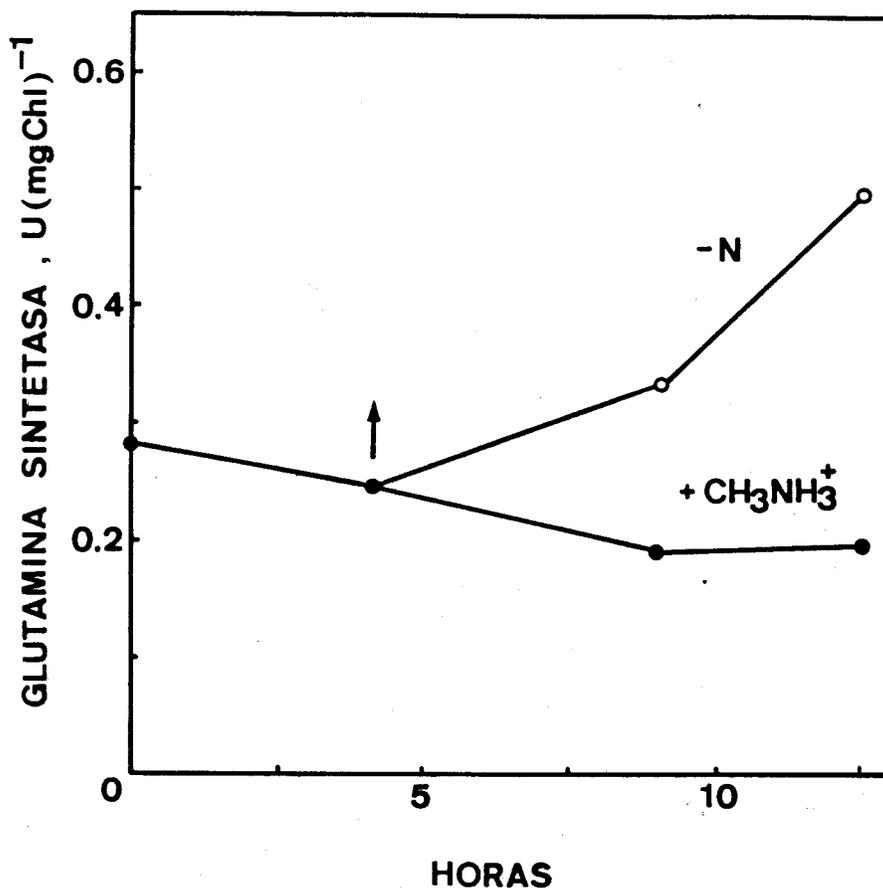


Fig. 6. Efecto de la deficiencia en nitrógeno inducida por metilamonio sobre la actividad GS. Células cultivadas con amonio como fuente de N se recogieron y resuspendieron en un medio con metilamonio 1 mM. Tras 4 h de incubación en condiciones de crecimiento, las células de una parte del cultivo se recogieron y resuspendieron en un medio sin fuente de N. A los tiempos indicados se determinó la actividad GS.



la GS, si se admite que el amonio y el metilamonio actúan de modo similar, lo que puede no ocurrir, como se ha observado en *Phaeodactylum tricornutum* donde ambos compuestos inhiben el consumo de nitrato de manera diferente (Cresswell y Syrett 1984).

En este contexto, es interesante indicar que el amonio ha sido propuesto como correpresor de la síntesis de la GS en la cianobacteria *Anabaena sp. 7120* (Orr y Haselkorn 1982). Por el contrario, en *Lemna minor* (Rhodes et al. 1975) y en la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas capsulata* (Romero et al. 1985a), la síntesis de esta enzima parece estar regulada por L-glutamina más que por amonio.

II. EFECTO DE LA LIMITACION DE CO<sub>2</sub> SOBRE LA UTILIZACION DE  
NITROGENO INORGANICO POR CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

## Resumen

En *Chlamydomonas reinhardtii*, la limitación del suministro de  $\text{CO}_2$  inhibe notablemente la utilización de nitrato (alrededor de un 70 %), mientras que la de nitrito disminuye solamente un 30 %. En estas condiciones, en presencia de 0,25 mM de nitrato todo el nitrógeno consumido por las células se incorpora como aminoácidos, mientras que en presencia de 0,25 mM de nitrito se produce un exceso de amonio que las células excretan al medio de cultivo. Estos resultados indican que hay un control dependiente de  $\text{CO}_2$  que evita la reducción superflua de nitrato y que no actúa cuando la fuente de nitrógeno es nitrito. Además, la utilización de nitrato, pero no la de nitrito, se inhibe notablemente por amonio. El consumo de nitrato puede estar regulado negativamente por amonio y/o algún producto de su asimilación, que se acumulan dentro de las células cuando se reduce la disponibilidad de productos de la fijación de  $\text{CO}_2$ . La actividad nitrato reductasa también disminuye (un 50 % aproximadamente) al limitar el  $\text{CO}_2$ .

En cultivos de *C. reinhardtii* que utilizan nitrato se observa, al limitar el  $\text{CO}_2$ , la aparición de nitrito y amonio en el medio cuando la concentración de nitrato es igual o superior a 1 mM. La producción de nitrito, que aumenta al elevar la concentración de nitrato en el medio y que no ocurre en células tratadas con MSX, revela una inhibición de su reducción hasta amonio.

La limitación de  $\text{CO}_2$  inhibe el consumo de amonio (alrededor de un 70 %) antes de que ocurra una reducción apreciable de la actividad glutamina sintetasa. Por otra parte, el amonio proveniente de nitrato se asimila a la misma velocidad que aquél tomado directamente del medio. Estos resultados sugieren que la inhibición del consumo de amonio está causada por una disminución del suministro de esqueletos carbonados y no por una limitación de su entrada en la célula o una pérdida de actividad glutamina sintetasa.

### Introducción

La asimilación de nitrato es un proceso metabólico de gran importancia para la adquisición de nitrógeno por numerosos microorganismos y plantas. Dos importantes características de la utilización de nitrato, comunes a numerosos organismos, son el requerimiento de  $\text{CO}_2$  y la inhibición por amonio (Losada et al. 1981, Syrett 1981, Ullrich 1983, Guerrero y Lara 1987).

En microalgas, se ha descrito que la presencia de amonio inactiva la nitrato reductasa (Losada et al. 1981), pero demasiado lentamente para que sea ésta la causa de la rápida inhibición del consumo de nitrato. De hecho, en ocasiones el amonio inhibe la utilización de nitrato sin afectar a la NR (Syrett y Leftley 1976, Flores et al. 1980). Se puede pensar, pues, que el amonio impide la entrada de nitrato en la célula,

lo que ha podido ser demostrado de forma concluyente en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cresswell y Syrett 1979) y en la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Lara et al. 1987a), donde se ha descrito que la presencia de amonio evita la acumulación intracelular de nitrato. En *Chlamydomonas reinhardtii*, el nitrato protege a la nitrato reductasa contra la inactivación reversible *in vivo*, que parece ser consecuencia de la inhibición previa de su transporte al interior de la célula (Florencio y Vega 1982) y requisito para la posterior degradación de la enzima (Franco et al. 1987).

Se ha observado que el amonio no impide la utilización de nitrato en ausencia de  $\text{CO}_2$  (Syrett y Morris 1963) o en células tratadas con MSX (Flores et al. 1980, Di Martino Rigano et al. 1982), condiciones en las que no puede asimilarse, lo que sugiere que la inhibición no está causada directamente por amonio sino por algún producto de su asimilación. Sin embargo, en algunos casos, la presencia de MSX inhibe fuertemente el consumo de nitrato (Florencio y Vega 1983a, Larsson et al. 1985a), lo que parece compatible con la participación del amonio por sí mismo en el mecanismo de inhibición.

El requerimiento de  $\text{CO}_2$  no se da en presencia de una fuente de carbono orgánico en el medio (Davis 1953, Eisele y Ullrich 1977) ni en células sometidas a carencia de nitrógeno (Stevens y van Baalen 1973, Flores et al. 1983b), lo que indica que el efecto positivo que el  $\text{CO}_2$  ejerce sobre la utilización de

nitrate está mediado por productos de su fijación. Estos productos pueden combinarse con metabolitos nitrogenados inhibidores de la utilización de nitrato para formar otros compuestos no inhibidores (Flores et al. 1983b, Romero et al. 1985b). Según esta hipótesis, la adición de amonio o la ausencia de  $\text{CO}_2$  detienen el consumo de nitrato porque los metabolitos inhibidores se acumulan dentro de la célula debido al aumento de su producción o a la falta de esqueletos carbonados, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que un control similar puede actuar en *C. reinhardtii*.

Algunas microalgas son incapaces de reducir nitrato en ausencia de  $\text{CO}_2$  a pH bajo (alrededor de 6) pero pueden hacerlo a pH alto (alrededor de 8), produciéndose en este caso una reducción fútil de nitrato que conduce a la acumulación de nitrito y amonio en el medio (Eisele y Ullrich 1977, Larsson y Andersson 1981, Di Martino Rigano et al. 1985). La producción de nitrito, observada en *C. reinhardtii* cuando las células utilizan concentraciones altas de nitrato en aire o aire libre de  $\text{CO}_2$  (Azuara y Aparicio 1983, 1984), puede reflejar la existencia de algún tipo de control sobre su reducción hasta amonio. Nuestros datos indican que en *C. reinhardtii* la limitación de  $\text{CO}_2$  en presencia de nitrato causa una inhibición de la reducción de nitrito.

## Resultados y Discusión

### *Efecto del amonio sobre el consumo de nitrato o nitrito*

La adición de amonio a cultivos de *C. reinhardtii* que se mantienen en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  causa una inhibición inmediata y completa de la utilización de nitrato o nitrito (Fig. 7, izquierda), hecho previamente descrito en *Chlamydomonas* (Thacker y Syrett 1972, Florencio y Vega 1983a) y en muchos otros organismos. Sin embargo, la inhibición por amonio de la utilización de nitrato o nitrito no es completa cuando se limita el  $\text{CO}_2$  a las células. Además, su extensión es diferente en ambos casos: mientras que la inhibición del consumo de nitrato es todavía alta (alrededor de un 70 %), la del de nitrito es baja (alrededor de un 25 %) (Fig. 7, derecha), lo que sugiere que la inhibición de la utilización de nitrato depende menos de la asimilación de amonio que la del consumo de nitrito.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el consumo de nitrato se inhibe por amonio y/o algún producto *primario* de su asimilación cuya producción no disminuye al limitar el suministro de esqueletos carbonados, mientras que el de nitrito es controlado negativamente por algún producto *secundario* de la asimilación de amonio, cuya formación bajo aire está probablemente limitada por la reducida disponibilidad de productos de la fijación de  $\text{CO}_2$ .

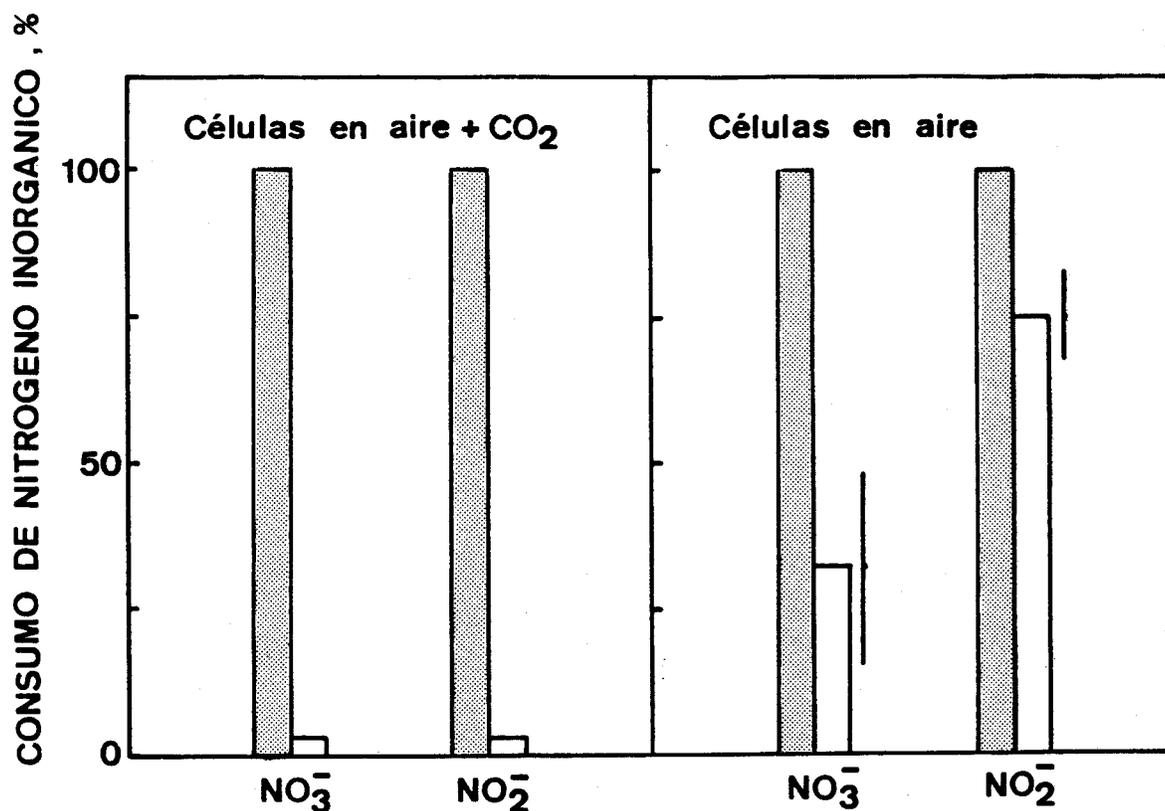


Figura 7. Efecto del amonio sobre los consumos de nitrato y nitrito. Células cultivadas con nitrato se resuspendieron en un medio sin N. A partir de la suspensión resultante se prepararon dos cultivos, a los que se añadió  $\text{KNO}_3$  o  $\text{KNO}_2$  2 mM. Tras 2 h de incubación en la atmósfera indicada, las células de cada cultivo se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. A tiempo cero, se añadió 0,25 mM de  $\text{KNO}_3$  (a las células que fueron incubadas previamente con nitrato) o  $\text{KNO}_2$  (a aquellas mantenidas previamente en presencia de nitrito), y, donde se indica, 1 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (barras blancas). El 100 % de los consumos de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  fue respectivamente 14,5 y 16,2 (en aire +  $\text{CO}_2$ ) y  $5,6 \pm 1,0$  y  $10,4 \pm 0,5$  ( $n=4$ ) (en aire) (valores expresados en  $\mu\text{mol (mg chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

Dado que la reacción catalizada por la GOGAT, que utiliza como sustratos 2-oxoglutarato y L-glutamina, es el primer punto de conexión entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno, parece probable que la limitación de  $\text{CO}_2$  disminuya el aporte de 2-oxoglutarato y, por consiguiente, la velocidad del ciclo GS/GOGAT en dicho punto, aumentando al añadir amonio los niveles de amonio y L-glutamina dentro de la célula. Así pues, la L-glutamina parece ser un buen candidato para el papel de producto *primario* modulador de la utilización de nitrato.

Alternativamente, la inhibición de los consumos de nitrato o nitrito puede estar causada por algún cambio metabólico (más que por el aumento en la concentración de algún metabolito nitrogenado), inducido por la aceleración del metabolismo del nitrógeno que puede ocurrir cuando aumenta la disponibilidad de amonio. De hecho, en *Anacystis nidulans*, donde la inhibición por amonio requiere que éste sea asimilado (Flores et al. 1980), no se ha encontrado una correlación positiva entre el nivel intracelular de aminoácidos y la inhibición del consumo de nitrato (Lara et al. 1987b, Romero et al. 1987). En este contexto, en *Neurospora crassa* se ha propuesto que es la velocidad con que se sintetiza la L-glutamina, y no su concentración, la que regula el catabolismo de la sacarosa (Hernández y Mora 1986), probablemente a través de cambios en la relación ATP/ADP. No obstante, la primera hipótesis resulta más atractiva porque ofrece la posibilidad de relacionar más fácilmente los efectos del  $\text{CO}_2$  y del amonio sobre la utilización

de nitrato (véase más adelante).

Es interesante señalar que en cultivos de *C. reinhardtii* en aire y en presencia de amonio se observa un significativo consumo de nitrato (véase Fig. 7, derecha), sugiriendo que en el control del mismo pueden intervenir, además de los productos indicados anteriormente, otros metabolitos derivados de la asimilación de amonio. De hecho, en *Anabaena cycadae* se ha propuesto un control mixto de la utilización de nitrato por amonio y derivados metabólicos suyos (Bagchi et al. 1985). Un control de este tipo permitiría que la utilización de nitrato se regulase en función tanto de la capacidad para asimilarlo (indicada por la disponibilidad de esqueletos carbonados) como de la necesidad de compuestos orgánicos nitrogenados (detectada por el nivel de ciertos metabolitos nitrogenados secundarios).

#### *Control por CO<sub>2</sub> del consumo de nitrato*

Cuando se limita el CO<sub>2</sub> a cultivos de *C. reinhardtii*, la inhibición del consumo de nitrato es mayor que la del de nitrito (Tabla 2). Por otra parte, la producción de amonio y la de esqueletos carbonados disponibles para su asimilación presentan un balance equilibrado si las células utilizan 0,25 mM de nitrato pero no cuando usan la misma concentración de nitrito, observándose en este último caso una acumulación de amonio en el medio (Fig. 8). Estos resultados indican la existencia de un mecanismo de control dependiente de CO<sub>2</sub> para el consumo de

Tabla 2. Efecto de la limitación de  $\text{CO}_2$  sobre la utilización de nitrato o nitrito. Células cultivadas con nitrato se resuspendieron ( $20\text{-}30 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. La suspensión resultante se dividió en cuatro cultivos, añadiéndose a dos de ellos  $\text{KNO}_3$  2 mM y a los dos restantes la misma concentración de  $\text{KNO}_2$ . Dos de los cultivos (uno con nitrato y otro con nitrito) se mantenían en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  y los otros dos en una de aire. Después de 2 h en la atmósfera indicada, las células se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N y a tiempo cero se añadió 0,25 mM de  $\text{KNO}_3$  (a las células que se incubaron previamente con nitrato) o  $\text{KNO}_2$  (a aquellas mantenidas previamente en presencia de nitrito). Los experimentos de consumo se realizaron en la atmósfera que se indica en cada caso.

Condiciones experimentales	Consumo de nitrógeno inorgánico $\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$		$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	
Células en aire enriquecido en $\text{CO}_2$	20,5	20,0	1,0
Células en aire	8,7	13,8	0,6

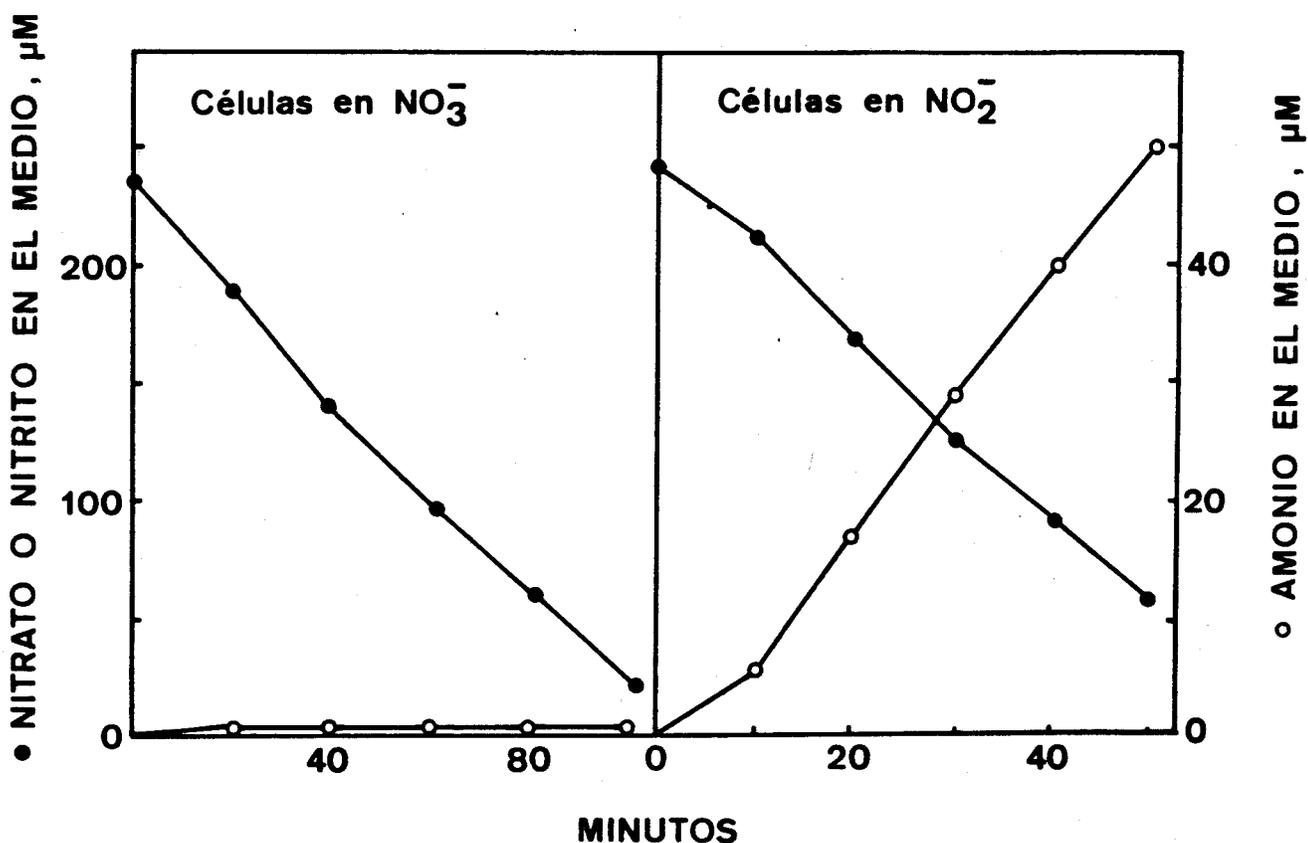


Figura 8. Estudio de la producción de amonio en presencia de bajas concentraciones iniciales de nitrato o nitrito. Células crecidas con nitrato se resuspendieron ( $20-30 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. La suspensión resultante se dividió en dos cultivos, añadiéndose a uno de ellos  $\text{KNO}_3$  2 mM y al otro la misma concentración de  $\text{KNO}_2$ . Después de 2 h en una atmósfera de aire, las células se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio al que se añadió a tiempo cero 0,25 mM de  $\text{KNO}_3$  (a las células que fueron incubadas con nitrato) o  $\text{KNO}_2$  (a aquellas mantenidas previamente en presencia de nitrito).

nitrato que evita la reducción superflua del mismo.

Una situación similar se ha descrito en *Scenedesmus obtusiusculus*, con un control por  $\text{CO}_2$  actuando sobre el consumo de nitrato pero no sobre el de nitrito (Larsson et al. 1982b). La ausencia de un control preciso de la utilización de nitrito puede reflejar la falta de presión selectiva para desarrollarlo dado que el nitrito no es una fuente natural de nitrógeno inorgánico. En *C. reinhardtii* este mecanismo de control opera probablemente a través de productos de la fijación de  $\text{CO}_2$ , como indica la ausencia de requerimiento de  $\text{CO}_2$  para usar nitrato observada en células sometidas a carencia de nitrógeno (Tabla 3).

El efecto del  $\text{CO}_2$  sobre el consumo de nitrato puede relacionarse con la inhibición del mismo promovida por amonio, como se ha propuesto para la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Flores et al. 1983b, Romero et al. 1985b). Nuestra hipótesis de trabajo consiste en que la poca disponibilidad de esqueletos carbonados puede causar la acumulación intracelular de amonio y algún producto primario de su asimilación, probablemente L-glutamina, los cuales, como se indicó anteriormente, inhiben el consumo de nitrato (pero no el de nitrito). Cuando aumenta el suministro de  $\text{CO}_2$ , el nivel de los compuestos inhibidores disminuye al combinarse con productos de la fijación de  $\text{CO}_2$  para generar otros compuestos orgánicos nitrogenados no inhibidores.

El control por  $\text{CO}_2$  puede mostrar una dependencia del pH, como



Tabla 3. Efecto de la carencia de  $\text{CO}_2$  sobre el consumo de nitrato. Las células normales se cultivaron con nitrato como fuente de N, obteniéndose la deficiencia en este elemento al resuspender dichas células en un medio desprovisto del mismo y mantenerlas durante 18 h en condiciones de crecimiento. En los experimentos, las células se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en medio de cultivo, añadiéndose a tiempo cero, 0,25 mM de nitrato.

Tipo de células	Consumo de nitrato, $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$	
	minus $\text{CO}_2$	plus $\text{CO}_2$
Normales	27	250
Deficientes en N	228	225

se ha descrito en *Ankistrodesmus braunii* (Eisele y Ullrich 1977), donde el requerimiento de  $\text{CO}_2$  para la reducción de nitrato solamente se observa a pH bajo (alrededor de 6), mientras que a pH alto (alrededor de 8) las células son capaces de reducir nitrato en ausencia de  $\text{CO}_2$ , incluso cuando se les añade amonio. Es decir, en esas condiciones desaparecen simultáneamente los controles de la utilización de nitrato por  $\text{CO}_2$  y por amonio, lo que apoya la hipótesis que los considera manifestaciones de un único mecanismo regulador, que inhibiría la utilización de nitrato actuando probablemente sobre su entrada en la célula, como se ha observado en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* donde la acumulación intracelular de nitrato se impide por la adición de amonio (Cresswell y Syrett 1979) o por la ausencia de  $\text{CO}_2$  (Syrett 1989). Resultados similares se han descrito en *A. nidulans* (Lara et al. 1987a).

*Efecto de la concentración de nitrato o nitrito en el medio sobre la inhibición por limitación de  $\text{CO}_2$  del consumo de ámbos iones*

Como se muestra en la Fig. 9, en cultivos de *C. reinhardtii*, el aumento de la concentración inicial de nitrito en el medio desde 0,25 hasta 2 mM evita la ligera inhibición de su consumo observada cuando se limita al  $\text{CO}_2$  a las células. Estos resultados sugieren que la limitación de  $\text{CO}_2$  inhibe la entrada de nitrito en la célula (si bien no lo suficiente para evitar su reducción superflua, como se ha señalado anteriormente) cuando

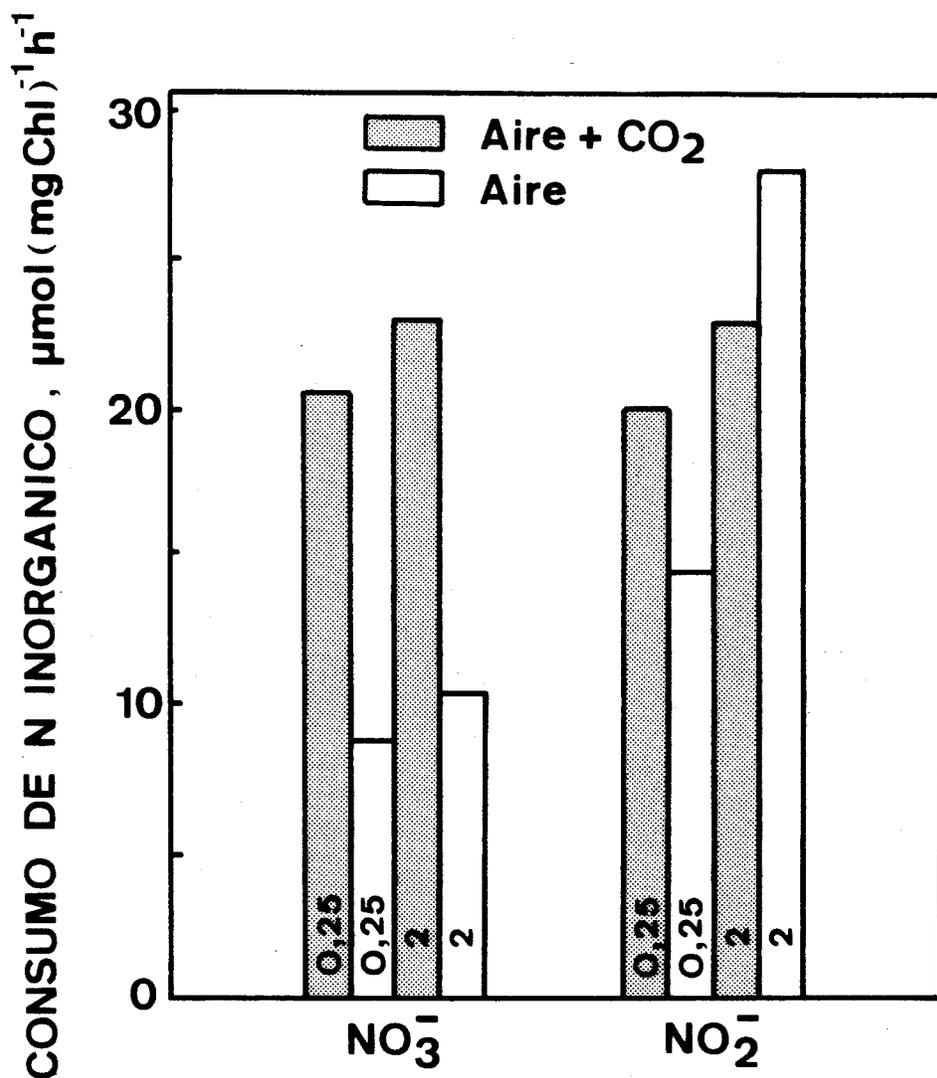


Figura 9. Efecto de la concentración de nitrato o nitrito sobre la inhibición por limitación de CO<sub>2</sub> del consumo de ambos iones. Las condiciones experimentales fueron las indicadas en la Tabla 2, resuspendiéndose finalmente las células para los experimentos de consumo en presencia de nitrato o nitrito a la concentración inicial que se indica en cada caso.

su concentración en el medio de cultivo es relativamente baja. El hecho de que un aumento similar de la concentración de nitrato en el medio no evite la inhibición de su consumo (Fig. 9), parece indicar que al limitar el suministro de  $\text{CO}_2$  disminuye la capacidad de reducir nitrato (y no solamente la de transportarlo al interior de la célula).

#### *Inactivación de la nitrato reductasa por limitación de $\text{CO}_2$*

Cuando se limita el suministro de  $\text{CO}_2$  a células de *C. reinhardtii*, se pierde alrededor de un 50 % de actividad nitrato reductasa (Fig. 10), que se recupera completamente al tratar con ferricianuro las células permeabilizadas (Fig. 11). Esta inactivación no se observa en otras algas verdes, como *Scenedesmus obtusiusculus* (Larsson et al. 1985b) o *Chlorella fusca* (Krämer et al. 1988). En *C. reinhardtii*, el nitrato protege la nitrato reductasa contra la inactivación reversible *in vivo*, ya que ésta ocurre por distintos tratamientos que impiden la entrada de nitrato en la célula (Florencio y Vega 1982, Córdoba et al. 1985). Por lo tanto, la inactivación de la NR por limitación de  $\text{CO}_2$  puede ocurrir porque en estas condiciones disminuye el transporte de nitrato y, por consiguiente, el nivel intracelular del mismo.

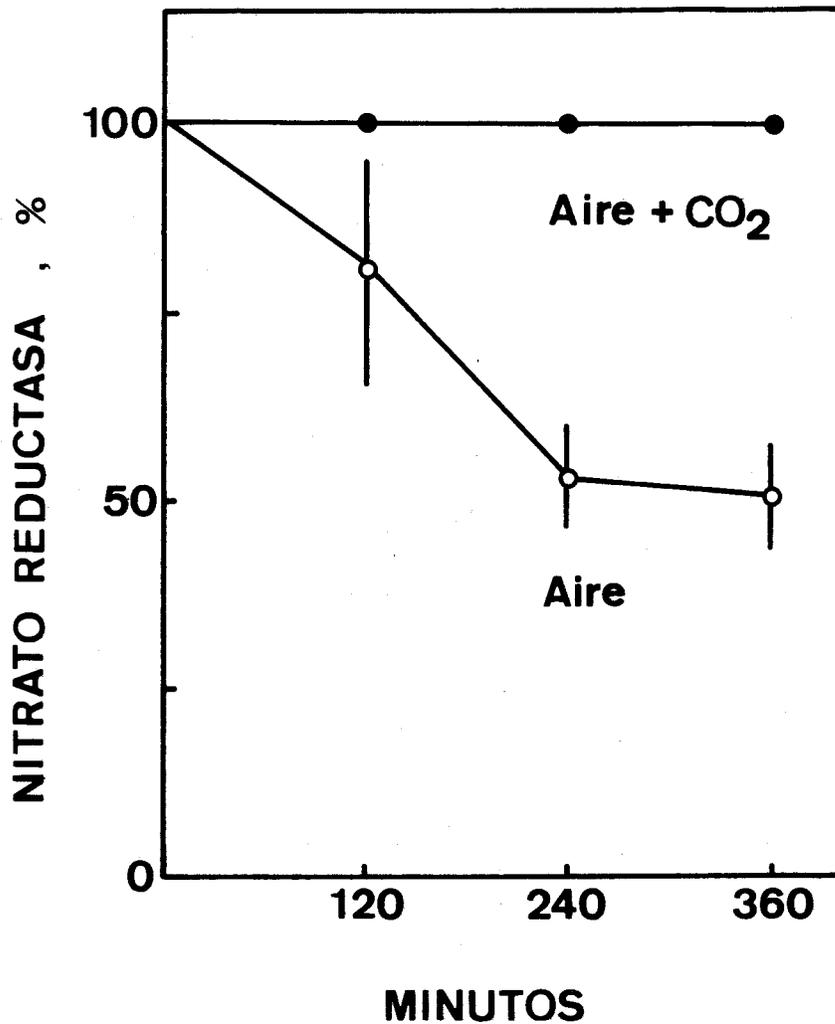


Figura 10. Inactivación de la nitrato reductasa por limitación de  $CO_2$ . Células cultivadas con nitrato se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. A tiempo cero, se añadió 5 mM de  $KNO_3$  a la suspensión celular, que se dividió a continuación en dos partes; una de ellas se mantuvo en una atmósfera de aire enriquecido en  $CO_2$  y la otra en una de aire. A los tiempos indicados, se midió la actividad NR (100 % de actividad =  $0,15 \pm 0,02 \text{ U (mg Chl)}^{-1}$ ,  $n=3$ ).

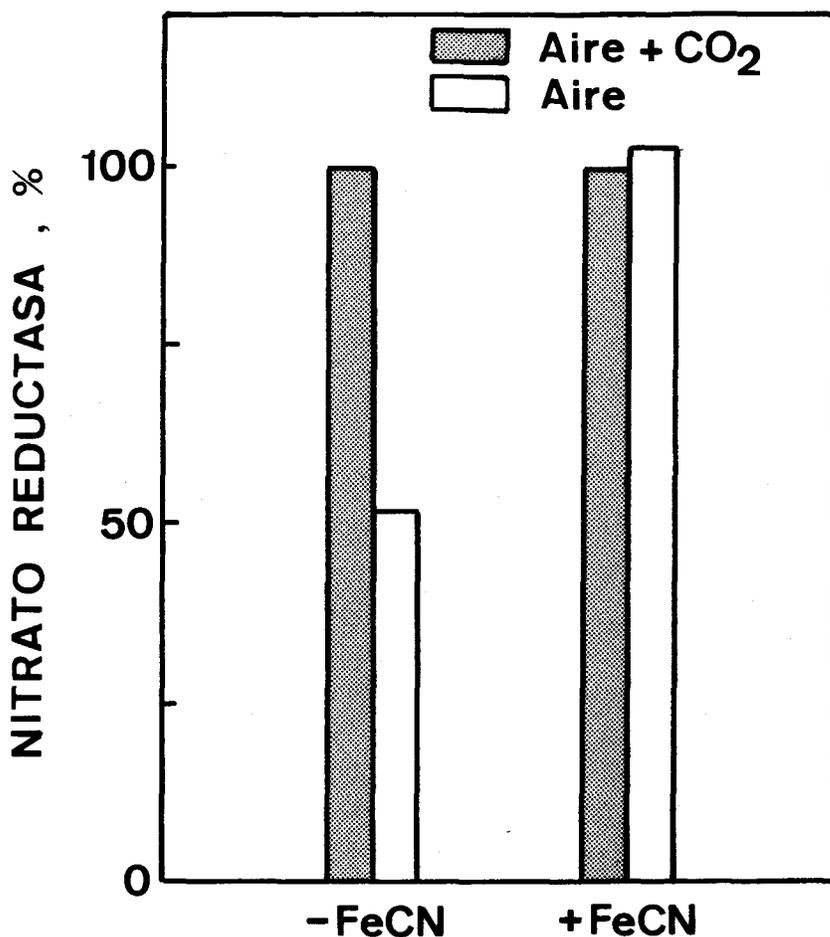


Figura 11. Reactivación por ferricianuro de la nitrato reductasa inactivada por limitación de CO<sub>2</sub>. Se procedió como se indica en la figura anterior, y después de 240 min de incubación se midió la actividad NR, con o sin tratamiento previo con ferricianuro (FeCN) de las células permeabilizadas. El 100 % de actividad nitrato reductasa fue 0,17 (- FeCN) ó 0,24 (+ FeCN) U (mg chl)<sup>-1</sup>.

*Producción de nitrito y amonio en cultivos de células que utilizan nitrato en aire*

En cultivos de *C. reinhardtii* creciendo con 1 mM de nitrato se observa la aparición de nitrito y amonio en el medio cuando se limita el CO<sub>2</sub> (Fig. 12). Se da la circunstancia de que esta producción de nitrito ocurre sin que las células hayan agotado la capacidad de reducirlo que muestran en ausencia de nitrato, dado que cuando el nitrito proviene de la reducción de nitrato, la cantidad que se reduce hasta amonio representa algo menos del 30 % del nitrito exógeno reducido por las mismas células (si la concentración inicial de N inorgánico en el medio es 1 mM, la relación entre los consumos de nitrato y nitrito en aire es aproximadamente 0,3). En consecuencia, y dado que en aire la asimilación de amonio está limitada, se acumula en el medio mucho más amonio cuando las células utilizan 1 mM de nitrito que cuando usan la misma concentración de nitrato como fuente de nitrógeno (Fig. 13). Estos resultados revelan que en presencia de nitrato la reducción de nitrito hasta amonio está limitada.

En *Chlorella fusca* parece que la limitación de CO<sub>2</sub> inhibe una permeasa cloroplástica encargada de transportar el nitrito formado en el citosol para que sea reducido en el cloroplasto (Krämer et al. 1988). Una situación de este tipo podría explicar las observaciones antes mencionadas, ya que en cultivos mantenidos en presencia de nitrito, la concentración intracelular de éste podría ser lo suficientemente alta para

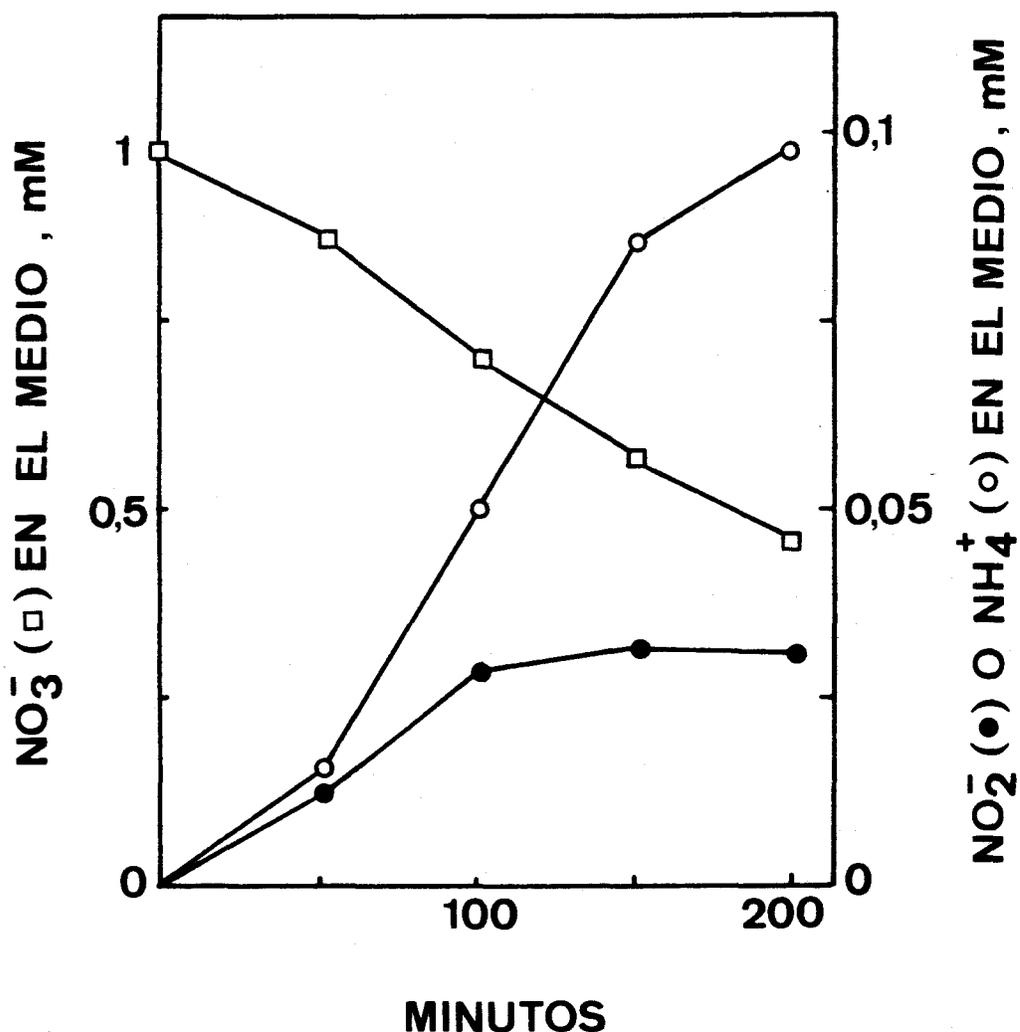


Figura 12. Producción de amonio y nitrito inducida por la limitación de  $\text{CO}_2$  en presencia de nitrato 1 mM. Células cultivadas con nitrato se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio que contenía 1 mM de  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno. El cultivo se mantenía en una atmósfera de aire, determinándose a los tiempos indicados las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio en el medio.

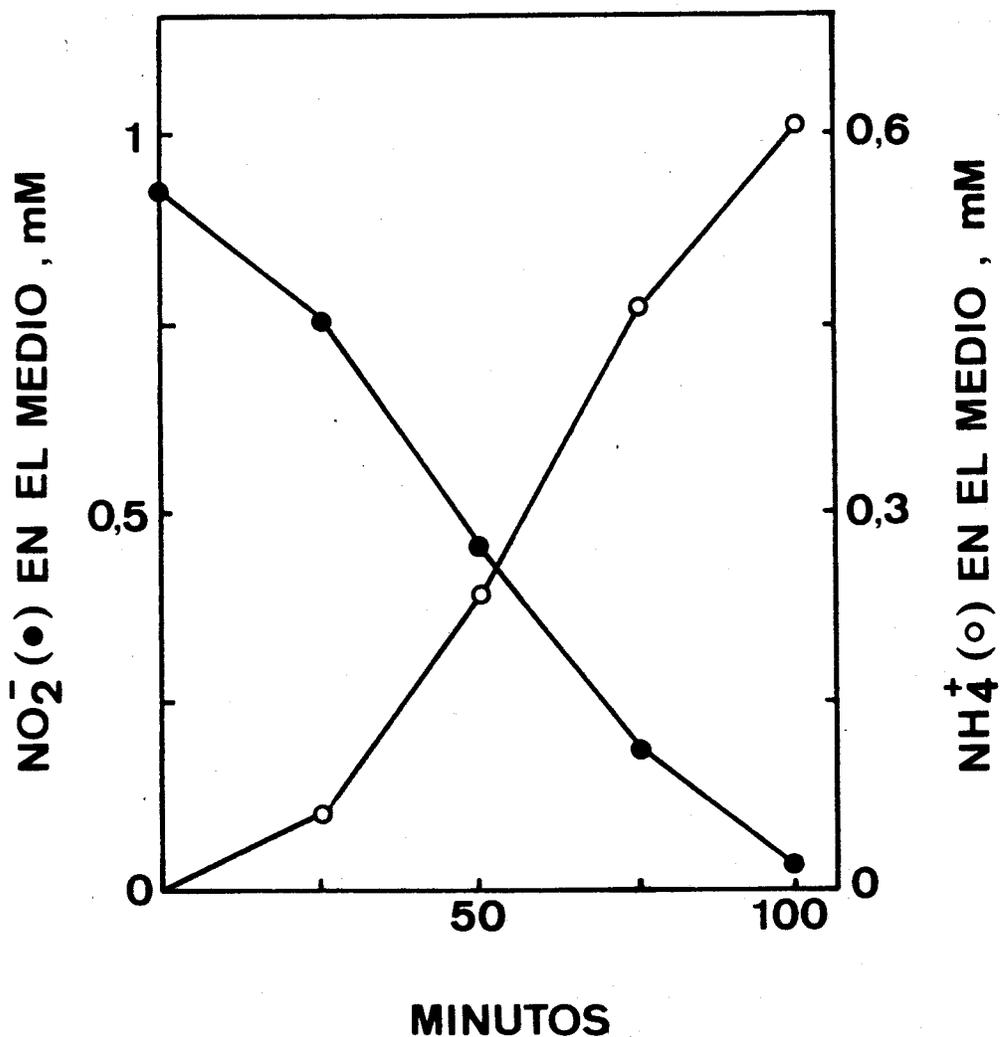


Figura 13. Producción de amonio inducida por la limitación de  $\text{CO}_2$  en presencia de nitrito 1 mM. Células cultivadas con nitrato se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio que contenía 1 mM de  $\text{KNO}_2$  como fuente de nitrógeno. El cultivo se mantenía en una atmósfera de aire, determinándose a los tiempos indicados las concentraciones de nitrito y amonio en el medio.

superar las restricciones de transporte impuestas por la inhibición de la permeasa. Esta hipótesis requiere que la nitrato reductasa esté localizada en el citoplasma. Sin embargo, esta enzima se ha encontrado, mediante técnicas de inmunocitocalización, en el pirenoide del cloroplasto de diversas algas verdes, incluyendo entre ellas *C. reinhardtii* (Lopez-Ruiz et al. 1985). No obstante, en cloroplastos aislados de esta alga no se ha detectado actividad nitrato reductasa (Fischer y Klein 1988), proponiendo los citados autores que la enzima del pirenoide puede ser una reserva de proteína que no es activa *in vivo*.

Por otra parte, se ha observado que al elevar la concentración de nitrato en el medio hasta 10 mM aumenta la cantidad de nitrito acumulado en el medio, al mismo tiempo que disminuye la de amonio (Fig. 14), lo que sugiere que hay una inhibición por nitrato de la reducción de nitrito en células de *C. reinhardtii*.

Dado que en condiciones de limitación de CO<sub>2</sub> el consumo de poder reductor es menor en cultivos que utilizan nitrato que en aquellos con nitrito (Fig. 15), puede descartarse que la inhibición antes mencionada se deba a una competencia por el poder reductor. Por consiguiente, y ya que la actividad nitrito reductasa de células en aire es prácticamente la misma cuando se cultivan con nitrato que cuando la fuente de nitrógeno es nitrito (Fig. 16), se puede pensar que el efecto inhibitorio que

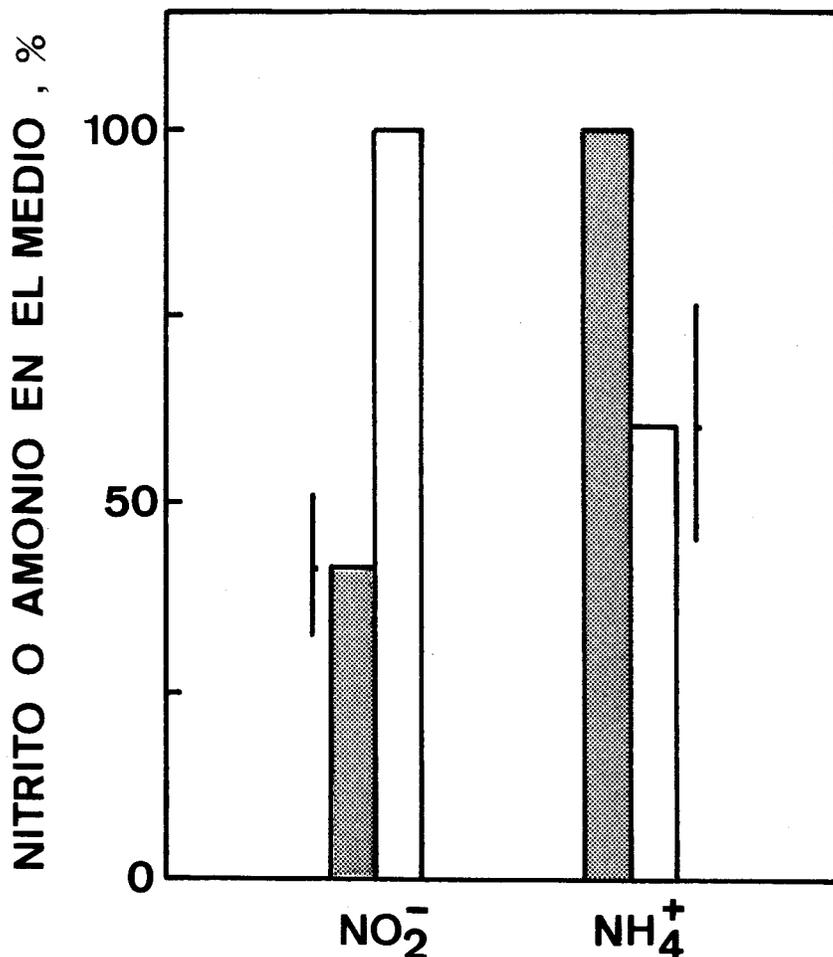


Figura 14. Efecto de la concentración de nitrato sobre la producción de nitrito y amonio por células que utilizan nitrato en aire. Células crecidas con nitrato se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N, dividiéndose la suspensión resultante en dos cultivos, a los que se añadió 1 mM (barras oscuras) ó 10 mM (barras claras) de  $\text{KNO}_3$ . Tras 4 h de incubación en una atmósfera de aire, se midió en ambos cultivos la concentración de nitrito y amonio en el medio. El 100 % de  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NH}_4^+$  en el medio fue  $0,10 \pm 0,01$  ó  $0,19 \pm 0,08 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ,  $n = 5$ , respectivamente.

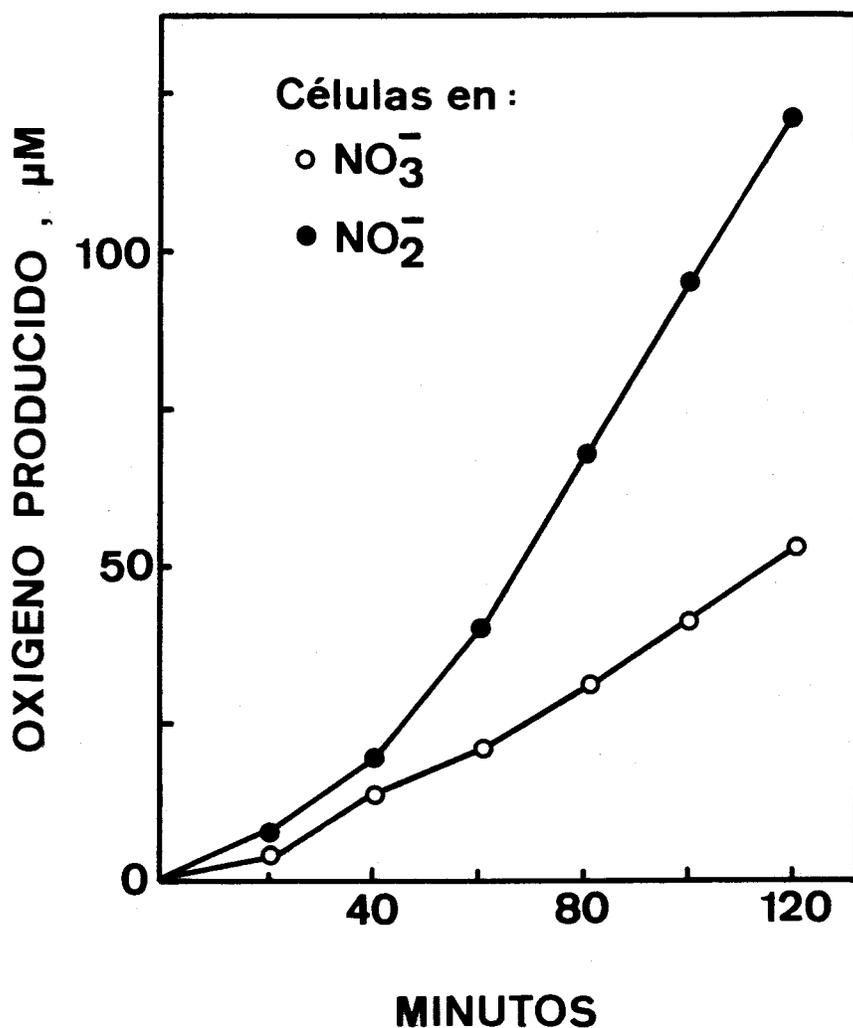


Figura 15. Producción de oxígeno por células que utilizan nitrato o nitrito en condiciones de limitación de  $CO_2$ . Células crecidas con nitrato se recogieron y resuspendieron ( $20 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N y se situaron en la cámara del electrodo de  $O_2$ . A tiempo cero, se añadió 2 mM de  $KNO_3$  o  $KNO_2$  y se iluminaron las células, determinándose la cantidad de oxígeno producido a los tiempos indicados.

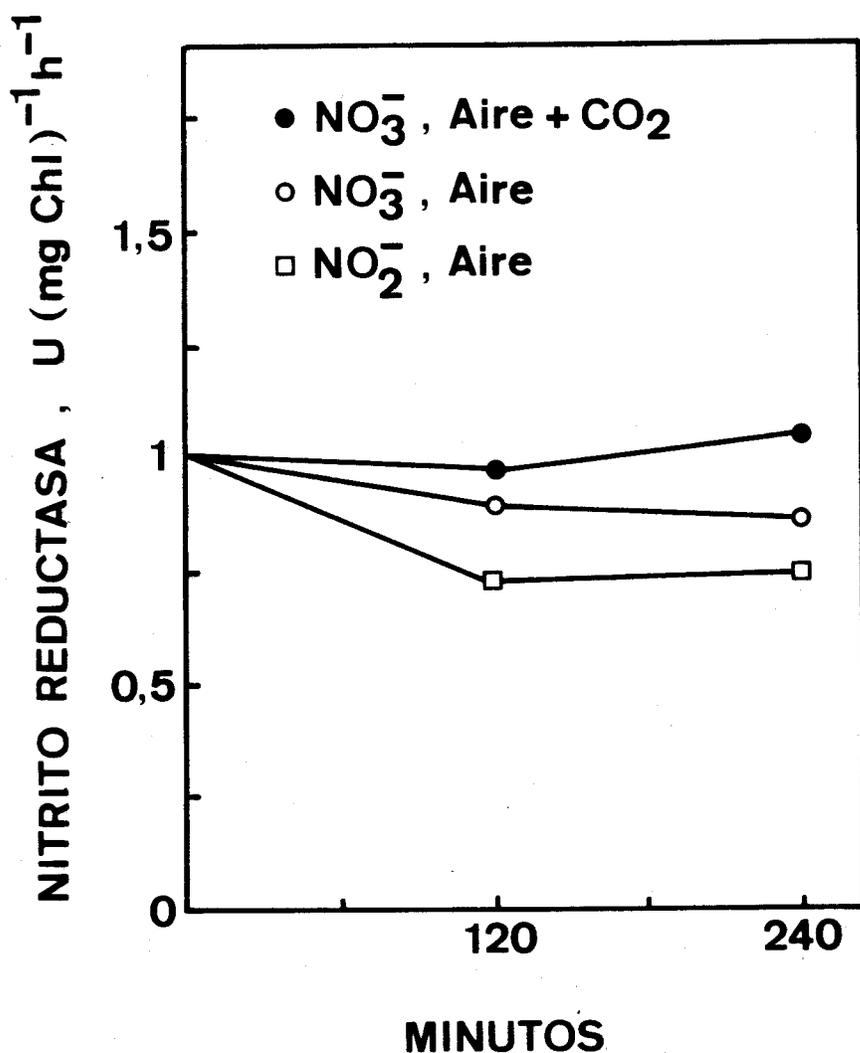
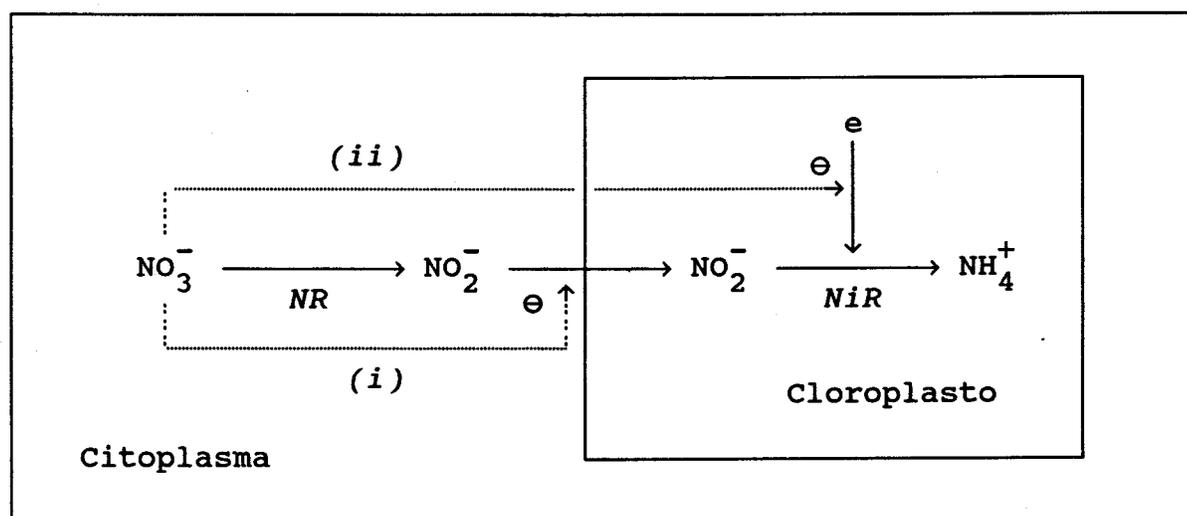


Figura 16. Actividad nitrito reductasa en diferentes condiciones nutricionales. Células cultivadas con nitrato se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. La suspensión resultante se dividió en tres cultivos, añadiéndose a dos de ellos  $3 \text{ mM}$  de  $\text{KNO}_3$  y al otro la misma concentración de nitrito. Uno de los cultivos con nitrato se mantenía en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  y los dos restantes en una de aire. A los tiempos indicados, se midió la actividad nitrito reductasa.

el nitrato ejerce sobre la reducción de nitrito en estas condiciones se debe a una (ver esquema): *i*) inhibición de una permeasa encargada de transportar el nitrito al interior del cloroplasto; o bien a una *ii*) disminución del poder reductor disponible para la conversión de nitrito en amonio.



Hay que añadir que la excreción de nitrito se observa también en ausencia de  $\text{CO}_2$  (dato no presentado), pero no en células tratadas con MSX 1 mM (Fig. 17), lo que indica que en la inhibición por nitrato de la reducción de nitrito puede estar implicado algún producto derivado de la asimilación de amonio, cuya formación, que ocurre a pesar de la limitación o ausencia de  $\text{CO}_2$ , se impide al inactivar completamente la GS.

En resumen, nuestros datos permiten suponer la existencia en

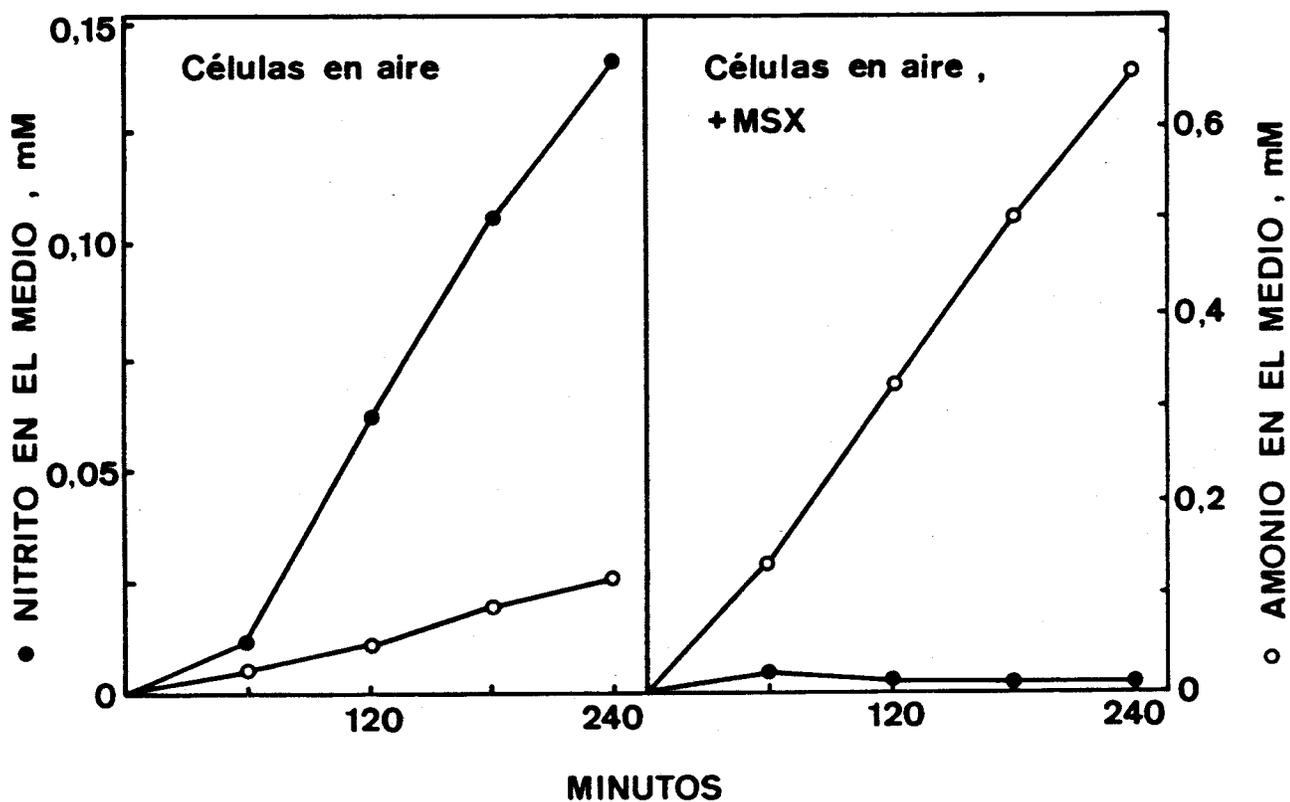


Figura 17. Inhibición por MSX de la producción de nitrito por células que utilizan nitrato en condiciones de limitación de  $\text{CO}_2$ . Células crecidas con nitrato se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio con  $10 \text{ mM}$  de  $\text{KNO}_3$  y, donde se indica,  $1 \text{ mM}$  de MSX. Los cultivos se mantenían en una atmósfera de aire, determinándose a los tiempos indicados la concentración de nitrito y amonio en el medio.

*C. reinhardtii* de una inhibición de la reducción de nitrógeno inorgánico por la acción concertada del nitrato y de algún producto *primario* de la asimilación de amonio. La utilidad de un mecanismo de este tipo parece clara: en ausencia de nitrato, no es necesario que actúe el dispositivo de control dado que no hay riesgo de reducción superflua de N inorgánico; cuando hay nitrato en el medio, el mecanismo de control solamente actúa si hay limitación de esqueletos carbonados, detectada por la acumulación de ese producto *primario* de la asimilación de amonio.

Se ha sugerido que la excreción de nitrito y amonio representa una manera de controlar el nivel intracelular de poder reductor, actuando el nitrato y el nitrito como sumideros del mismo cuando se produce en exceso (Azuara y Aparicio 1983). Por el contrario, pensamos que refleja la ausencia de un mecanismo de control para evitar la reducción superflua de nitrito y la incapacidad del control que opera sobre el consumo de nitrato para funcionar eficazmente a altas concentraciones del mismo.

El hecho de que el ligero aumento de la velocidad de consumo de nitrato en aire observado al elevar la concentración de nitrato en el medio (Fig. 9) sea suficiente para romper el equilibrio que existe entre la reducción de nitrato y la asimilación de los productos que resultan de la misma (las células que utilizan 0,25 mM de nitrato en aire no excretan

amonio al medio pero si lo hacen si la concentración inicial de nitrato se eleva hasta 1 mM), indica que las células, a bajas concentraciones de nitrato, consumen la máxima cantidad del mismo que pueden asimilar.

#### *Efecto de la limitación de CO<sub>2</sub> sobre el consumo de amonio*

En *C. reinhardtii*, la limitación de CO<sub>2</sub> disminuye notablemente el consumo de amonio, observándose esta inhibición antes de que ocurra una pérdida apreciable de actividad GS (Fig. 18). Por otra parte, y aprovechando la circunstancia de que la diferencia entre el nitrato o nitrito que desaparece del medio y el nitrito y/o amonio que aparecen en el mismo cuando se limita el CO<sub>2</sub> puede considerarse equivalente al amonio incorporado por las células, cuando se comparan las velocidades con que se asimilan el amonio que procede de la reducción de nitrato y aquél que se añade al medio de cultivo, se observa que ambas son muy parecidas (Fig. 19), mientras que el amonio que procede del nitrito se asimila, ligera pero significativamente, con más rapidez. Por consiguiente, parece que la inhibición de la utilización de amonio por limitación de CO<sub>2</sub> no se debe a la inactivación de la GS ni a una disminución de la entrada de amonio en la célula, sino que es causada por la reducida disponibilidad de esqueletos carbonados.

El requerimiento de CO<sub>2</sub> para el consumo de amonio no se observa en células sometidas previamente a carencia de nitrógeno

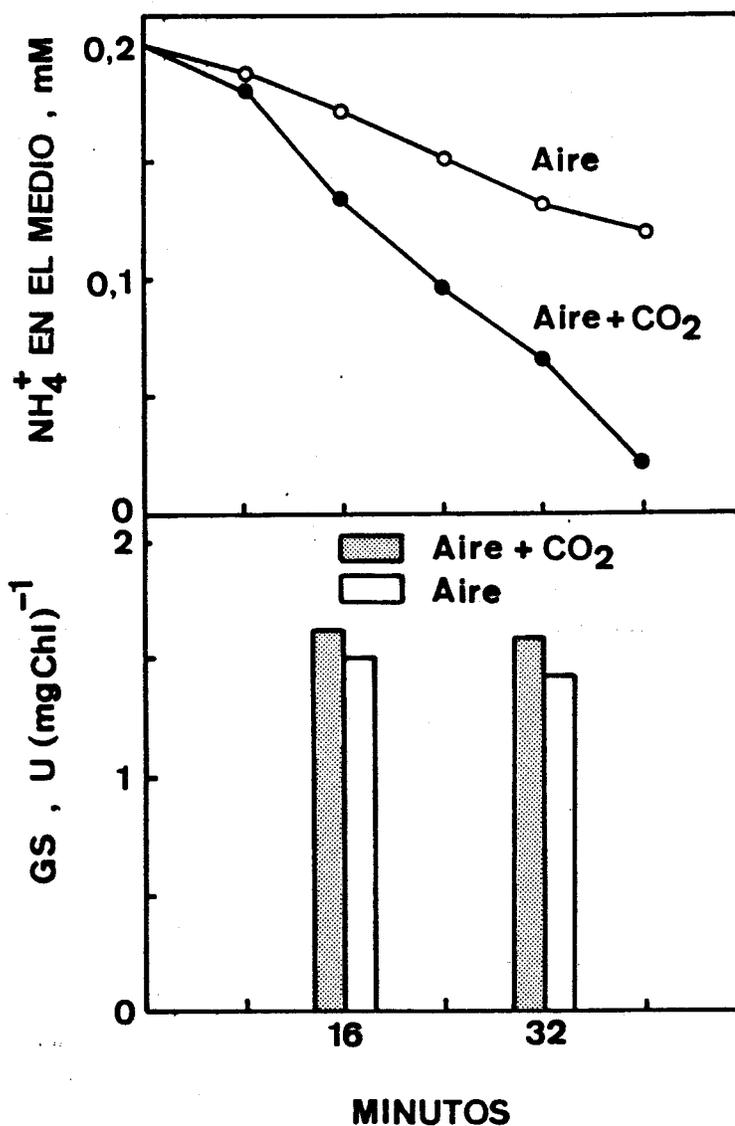


Figura 18. Efecto de la limitación de CO<sub>2</sub> sobre el consumo de amonio y la actividad GS. Células crecidas con nitrato se recogieron y resuspendieron (25 µg Chl ml<sup>-1</sup>) en un medio sin N. La suspensión celular resultante se dividió en dos partes a las que se añadió, a tiempo cero, 0,2 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Uno de los cultivos se mantenía en una atmósfera de aire suplementado con CO<sub>2</sub> y el otro en una de aire. A los tiempos indicados, se determinó la concentración de amonio en el medio y la actividad GS en ambos cultivos.

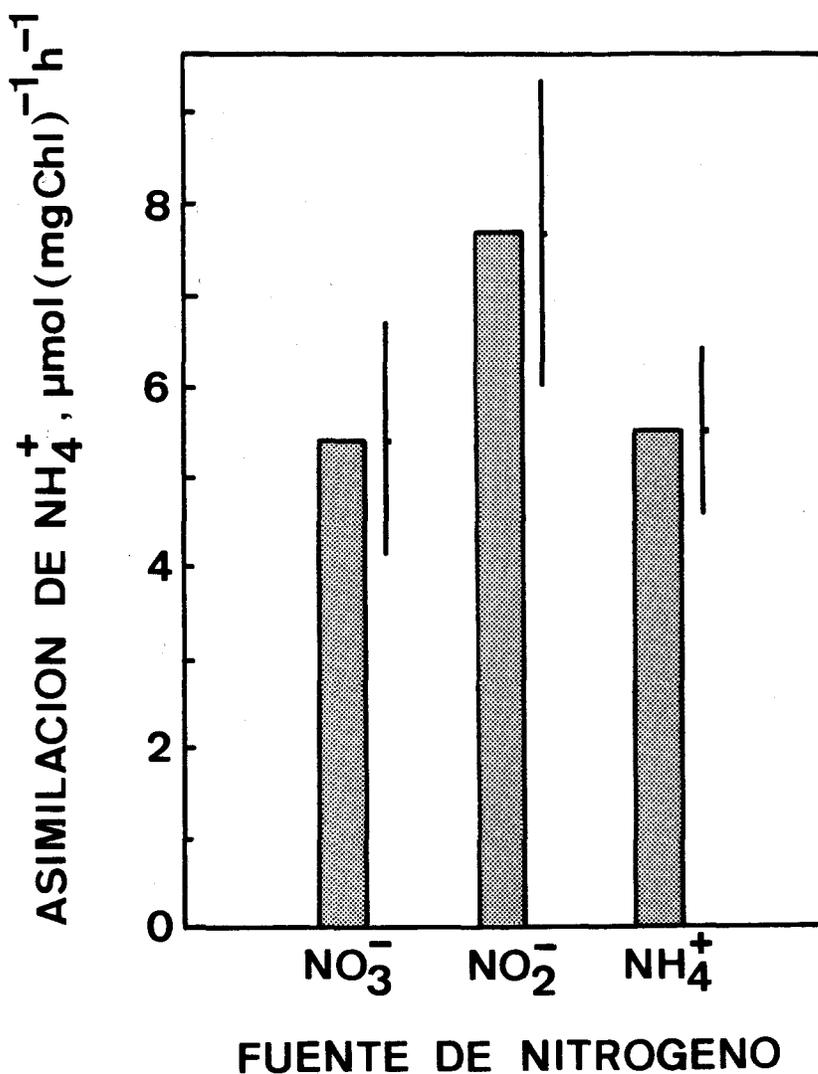


Figura 19. Asimilación de amonio en diferentes condiciones de cultivo. Células crecidas con nitrato se recogieron y resuspendieron en un medio conteniendo 1 mM de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KNO}_2$  o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , manteniéndose los cultivos en una atmósfera de aire. El amonio asimilado fue, según los casos, la diferencia entre el nitrato consumido y el nitrito y amonio excretados al medio, la diferencia entre el nitrito consumido y el amonio excretado y, finalmente, el amonio consumido. Los resultados que se muestran son los valores medios ( $\pm$  SD) de 4 experimentos independientes.

(Fig. 20). Esto indica que los compuestos orgánicos acumulados durante el periodo de carencia de N pueden sustituir a los productos recientes de la fijación de  $\text{CO}_2$  en su efecto positivo sobre el consumo de amonio. De forma diferente se comportan cultivos deficientes en nitrógeno del alga *Cyanidium caldarium*, en los que la presencia de  $\text{CO}_2$ , incluso en oscuridad, es estrictamente necesaria para la utilización de amonio (Di Martino Rigano et al. 1986).

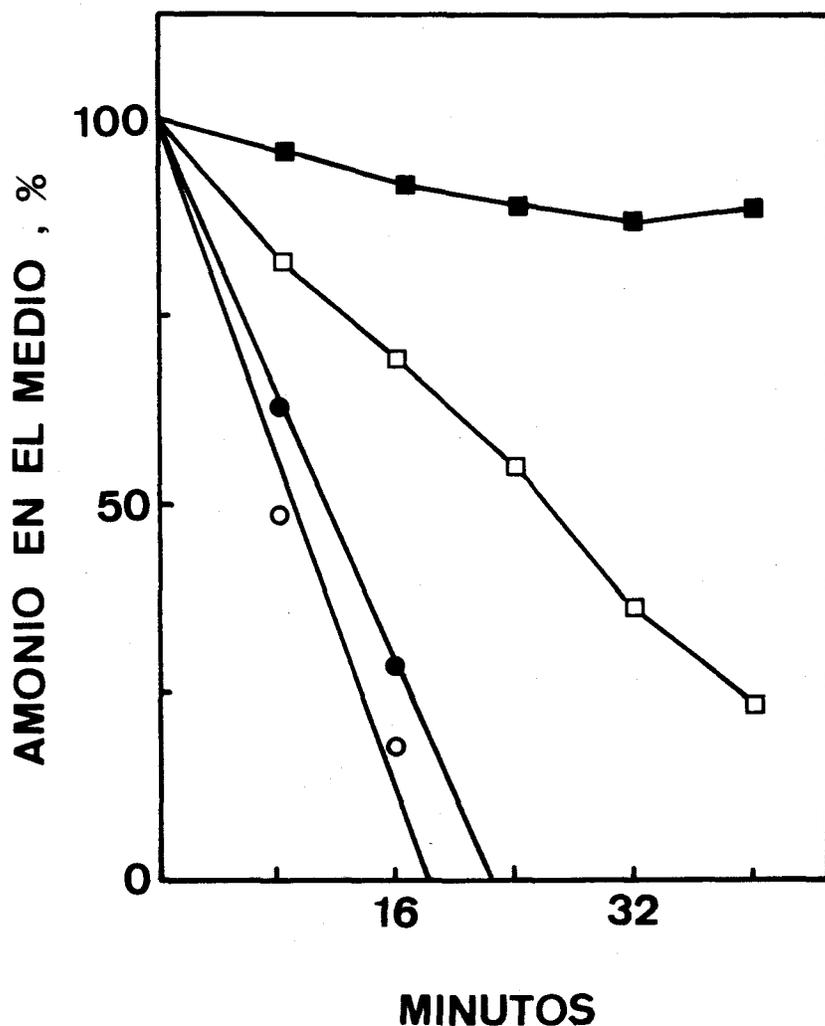


Figura 20. Consumo de amonio en ausencia de  $\text{CO}_2$  por células deficientes en nitrógeno. Las células normales (cuadrados) se cultivaron con nitrato como fuente de N y las deficientes en N (círculos) se obtenían al resuspender células normales en un medio sin N y mantenerlas durante 18 h en condiciones de crecimiento. Los experimentos se realizaron en una atmósfera de aire suplementado con  $\text{CO}_2$  (símbolos blancos) o libre del mismo (símbolos negros), recogiendo las células y resuspendiéndose ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio al que se añadió a tiempo cero  $0,25 \text{ mM}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

III. EFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA  
ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

## Resumen

En *C. reinhardtii*, la limitación de  $\text{CO}_2$  disminuye la actividad glutamina sintetasa. Esta pérdida de actividad requiere la presencia de una fuente de nitrógeno inorgánico en el medio y no reduce aparentemente la capacidad de reasimilar el amonio generado dentro de la célula a partir de compuestos orgánicos nitrogenados. La actividad GS también disminuye al añadir amonio a células que utilizan nitrato en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$ , incluso cuando son previamente tratadas con azaserina. Estos resultados sugieren que la actividad GS puede estar modulada negativamente por amonio y/o L-glutamina, cuyo nivel intracelular puede aumentar al reducirse el suministro de  $\text{CO}_2$  o añadir amonio.

La adición de metilamonio, un análogo estructural del amonio que no puede ser utilizado por *C. reinhardtii* como fuente de nitrógeno, a células crecidas con nitrato también disminuye el nivel intracelular de GS, siendo este efecto más pronunciado en luz que en oscuridad.

Las actividades glutamina sintetasa,  $\text{GS}_1$  y  $\text{GS}_2$ , de *C. reinhardtii* se estabilizan por compuestos tiólicos, principalmente la  $\text{GS}_2$ , lo que revela la existencia de grupos sulfhidrilo esenciales para la actividad y sugiere una posible regulación por tioles. No obstante, parece improbable que ésta tenga lugar por medio de tioles generados fotosintéticamente,

dado que la transición luz-oscuridad no ejerce ningún efecto apreciable sobre el nivel de actividad GS.

## Introducción

La GS es una enzima de gran importancia para la adquisición de nitrógeno por organismos fotosintéticos, en los que la asimilación de amonio ocurre a través de la ruta GS/GOGAT. El nivel de actividad GS está controlado por las condiciones nutricionales, habiéndose observado en repetidas ocasiones una disminución del mismo en oscuridad y/o presencia de amonio (Rowell et al. 1979, Rhodes et al. 1979, Taylor y Stewart 1980, Tischner y Hüttermann 1980, Ahmad y Hellebust 1984, Florencio et al. 1987). En bacterias fotosintéticas, esta pérdida de actividad implica la adenilación de la enzima (Johansson y Gest 1977, Alef y Zumft 1981, Caballero et al. 1985), mecanismo de control similar al descrito para la GS de *E. coli* (Shapiro y Stadtman 1970b) y que no se ha encontrado en cianobacterias, algas eucarióticas y plantas. En algunos de estos organismos, la enzima inactiva puede recuperar la actividad por tratamiento con tioles (Rowell et al. 1979, Tischner y Schmidt 1982), lo que ha llevado a proponer una modulación de la GS por la luz a través de tioles generados durante la fotosíntesis, similar a la que presentan diversos enzimas del metabolismo del carbono (Anderson y Avron 1976, Wolosiuk y Buchanan 1977).

En este trabajo se describe el efecto que la limitación del suministro de  $\text{CO}_2$  o la adición de metilamonio tienen sobre el nivel intracelular de actividad GS de *C. reinhardtii*, que disminuye notablemente como consecuencia de ambos tratamientos.

## Resultados y Discusión

### *Efecto de la limitación de $\text{CO}_2$ y de la adición de amonio sobre la actividad glutamina sintetasa*

En cultivos de *C. reinhardtii* que utilizan nitrato o nitrito, el nivel intracelular de GS se reduce aproximadamente un 50 % cuando se limita el suministro de  $\text{CO}_2$  a las células al transferirlas desde una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  a otra de aire (Fig. 21). Esta disminución de actividad requiere la presencia de una fuente de nitrógeno inorgánico en el medio (Fig. 22), lo que indica que está causada por el funcionamiento de la ruta de asimilación de nitrógeno inorgánico cuando el suministro de productos de la fijación de  $\text{CO}_2$  disminuye.

La reacción catalizada por la GOGAT, que utiliza como sustratos L-glutamina y 2-oxoglutarato, es el primer punto de conexión de los metabolismos del carbono y del nitrógeno. Parece probable, pues, que la limitación de  $\text{CO}_2$  frene al ciclo GS/GOGAT en dicho punto al reducir el aporte de 2-oxoglutarato. Además, el  $\text{CO}_2$  es más necesario para la asimilación del amonio que para su formación a partir de nitrato o nitrito (como se muestra en

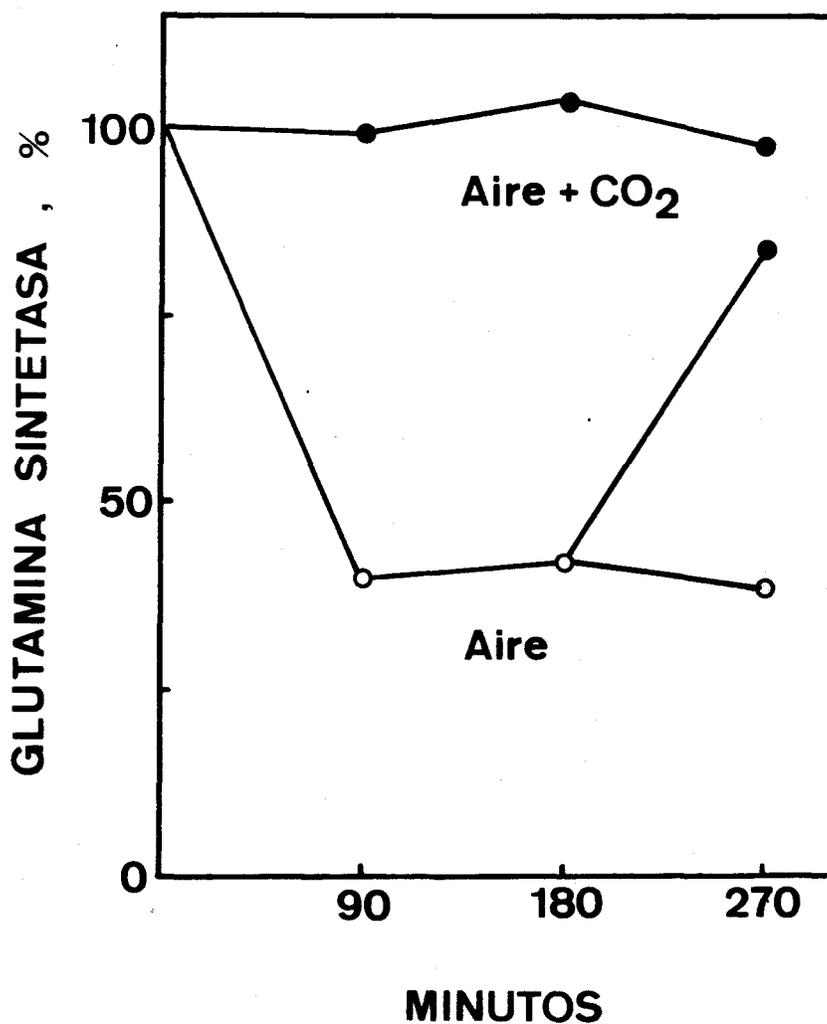


Fig. 21. Efecto de la limitación de  $\text{CO}_2$  sobre el nivel de actividad GS. Células cultivadas con nitrato se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio conteniendo  $\text{KNO}_3$  2 mM. La suspensión resultante se dividió en dos cultivos, uno de los cuales se mantuvo en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  y el otro en una de aire. A los tiempos indicados, se midió la actividad GS. El 100 % de actividad GS fue  $1,5 \text{ U (mg Chl)}^{-1}$ . Un resultado similar se obtuvo cuando se utilizó  $\text{KNO}_2$  como fuente de nitrógeno.

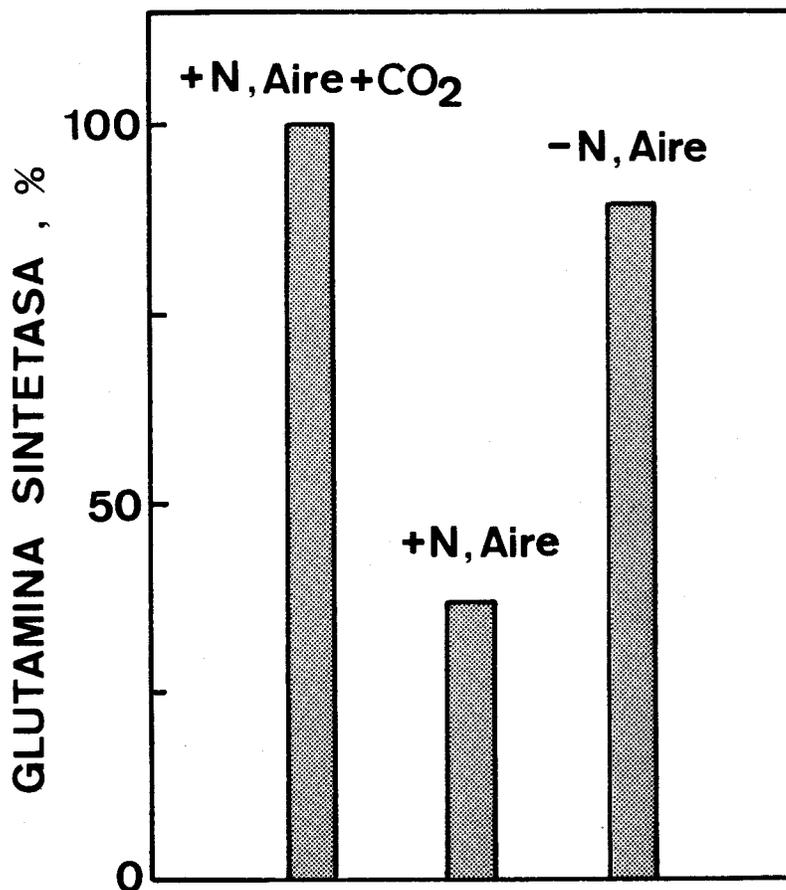


Fig. 22. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la disminución de actividad GS causada por la limitación de CO<sub>2</sub>. Las células de un cultivo crecido con nitrato se resuspendieron (25 µg Chl ml<sup>-1</sup>) en un medio sin N. A continuación, se dividió la suspensión resultante en tres partes, añadiéndose N inorgánico (KNO<sub>3</sub> o KNO<sub>2</sub> 2 mM) a dos de ellas. Tras 90 min de incubación en las condiciones indicadas, se midió la actividad GS (100 % de actividad = 1,3 U (mg Chl)<sup>-1</sup>).

las Figs. 12 y 13, la limitación de  $\text{CO}_2$  a células que utilizan 1 mM de nitrato o nitrito produce la excreción al medio del amonio que no se puede asimilar). Por lo tanto, es previsible que la limitación de  $\text{CO}_2$  cause una acumulación de amonio y L-glutamina dentro de la célula. De hecho, la ausencia de  $\text{CO}_2$  en presencia de nitrógeno inorgánico aumenta el nivel intracelular de amonio (Fig. 23).

Por otra parte, la actividad GS también disminuye al añadir 5 mM de amonio a cultivos que utilizan nitrato en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$ , incluso cuando las células son previamente tratadas con 5 mM de azaserina hasta que la actividad MVH-GOGAT no se detecta (Fig. 24).

Estos datos sugieren que la acumulación de amonio y/o L-glutamina dentro de las células, producida por la limitación de  $\text{CO}_2$  en presencia de N inorgánico o por la adición de amonio a cultivos que utilizan nitrato, puede ser la causa de la inactivación de la GS. No obstante, un aumento del nivel intracelular de L-glutamina está probablemente acompañado por un descenso en el de L-glutamato. Por consiguiente, la implicación de este compuesto en el control de la actividad GS no puede descartarse. En la cianobacteria *Anabaena cylindrica* se ha descrito una correlación positiva entre el nivel de glutamato dentro de la célula y el de actividad GS (Rowell et al. 1979).

Se ha propuesto que la inactivación por amonio puede

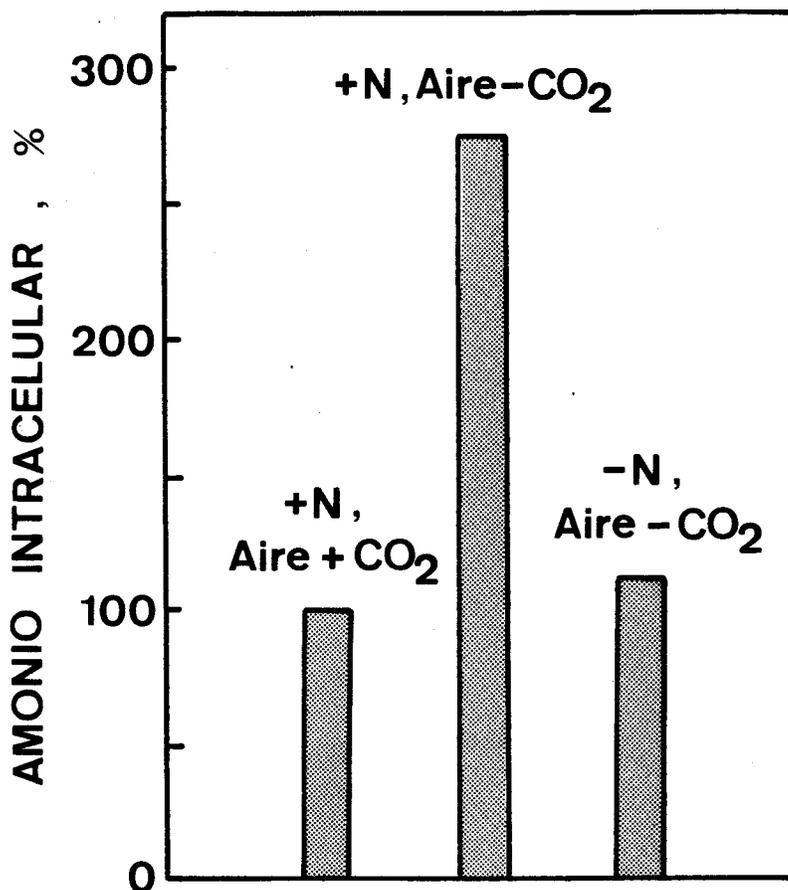


Fig. 23. Efecto de la carencia  $CO_2$  sobre la concentración intracelular de amonio. Células crecidas con nitrato se resuspendieron ( $30 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. La suspensión resultante se dividió en tres partes, añadiéndose  $KNO_2$  2 mM a dos de ellas. Tras 90 min en las condiciones que se indican, se midió la concentración intracelular de amonio. Un resultado similar se obtuvo cuando se utilizó  $KNO_3$  como fuente de nitrógeno.

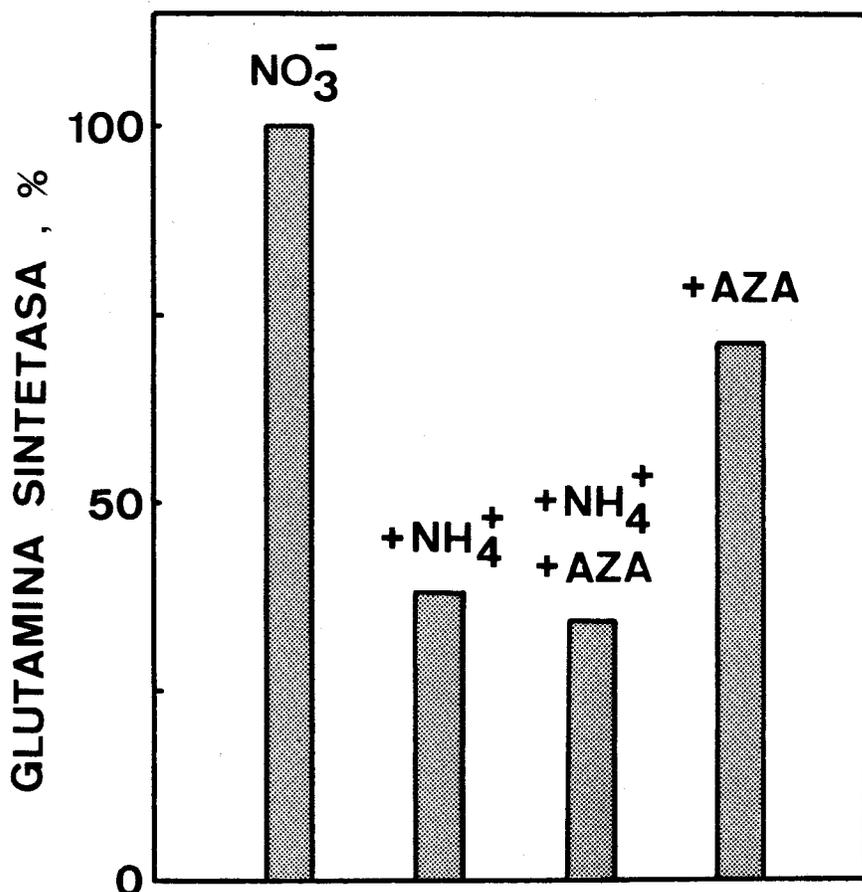


Fig. 24. Efecto de la adición de amonio sobre el nivel de actividad GS en células crecidas con nitrato. Células crecidas con nitrato se repartieron en varios cultivos, a los que se añadió, donde se indica,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM y/o azaserina (AZA) 5 mM. El inhibidor se añadió 30 min antes del amonio para garantizar una completa inactivación de las actividades GOGAT. Tras 210 min en una atmósfera de aire enriquecido en  $\text{CO}_2$ , se midió la actividad GS de los distintos cultivos (100 % de actividad GS =  $1,7 \text{ U (mg chl)}^{-1}$ ).

desempeñar un papel importante en el control del flujo de nitrógeno inorgánico a través del ciclo GS/GOGAT (Cullimore 1981). Por el contrario, la pérdida parcial de actividad GS que ocurre al limitar el  $\text{CO}_2$  parece ser consecuencia de la disminución de la capacidad operativa del ciclo GS/GOGAT, básicamente determinada por la disponibilidad de esqueletos carbonados. En este contexto, es interesante señalar que el aumento del nivel intracelular de L-glutamina y el concomitante descenso del de L-glutamato que siguen a la adición de amonio en microalgas (Rowell et al. 1977, Flores et al. 1980) pueden estar causados por la falta de suficiente 2-oxoglutarato para procesar el exceso de L-glutamina formado. La disminución de la actividad GS puede ser importante para prevenir la formación superflua de L-glutamina y la disminución excesiva del L-glutamato intracelular y para conservar ATP en las condiciones desacoplantes que se dan cuando el amonio es abundante dentro de la célula (Rowell et al. 1979).

¿Qué ventajas ofrece un sistema de control de la GS gobernado por amonio y/o L-glutamina?. Los compuestos orgánicos nitrogenados resultantes de la asimilación de L-glutamina pueden potencialmente desempeñar un papel regulador de la actividad GS. No obstante, si así ocurriera, la respuesta a dos situaciones nutricionales diferentes (limitación de  $\text{CO}_2$  por un lado, deficiencia en N por otro) sería la misma, dado que en ambos casos es previsible que disminuya el nivel intracelular de tales C,N-metabolitos. Por el contrario, un control de la GS

centralizado en el amonio y/o la L-glutamina permite respuestas distintas a las condiciones nutricionales mencionadas, dado que los cambios esperables en su concentración intracelular son opuestos. Además de este control, la actividad GS de *C. reinhardtii* puede estar sometida a una regulación de tipo *feedback* por otros productos de la asimilación del amonio, puesto que los aminoácidos L-alanina, L-glicina y L-arginina la inhiben *in vitro* entre un 30 y un 70 % (Florencio y Vega 1983b).

En organismos fotosintéticos, el sistema GS/GOGAT no interviene solamente en la asimilación *primaria* de amonio, sino que también es responsable de la reasimilación del amonio que se genera dentro de la célula a partir de compuestos orgánicos nitrogenados como consecuencia de distintos procesos metabólicos, incluyendo entre ellos la fotorrespiración (Mifflin et al. 1980). La Fig. 25 muestra que cuando células de *C. reinhardtii* se mantienen en una atmósfera de aire libre de CO<sub>2</sub> en presencia de 0,25 mM de nitrito como única fuente de N (la actividad GS disminuye alrededor de un 50 %), consumen nitrito y excretan al medio hasta 0,20 mM de amonio. Sin embargo, cuando se añade además 1 mM de MSX, el amonio excretado llega hasta 1 mM, lo que indica que, en este último caso, no se asimilan ni el amonio formado a partir de nitrito ni el generado dentro de las células a partir de compuestos orgánicos de N. Así pues, la inactivación de la GS por limitación de CO<sub>2</sub> no disminuye aparentemente la capacidad de las células para asimilar el amonio producido a partir de compuestos organonitrogenados

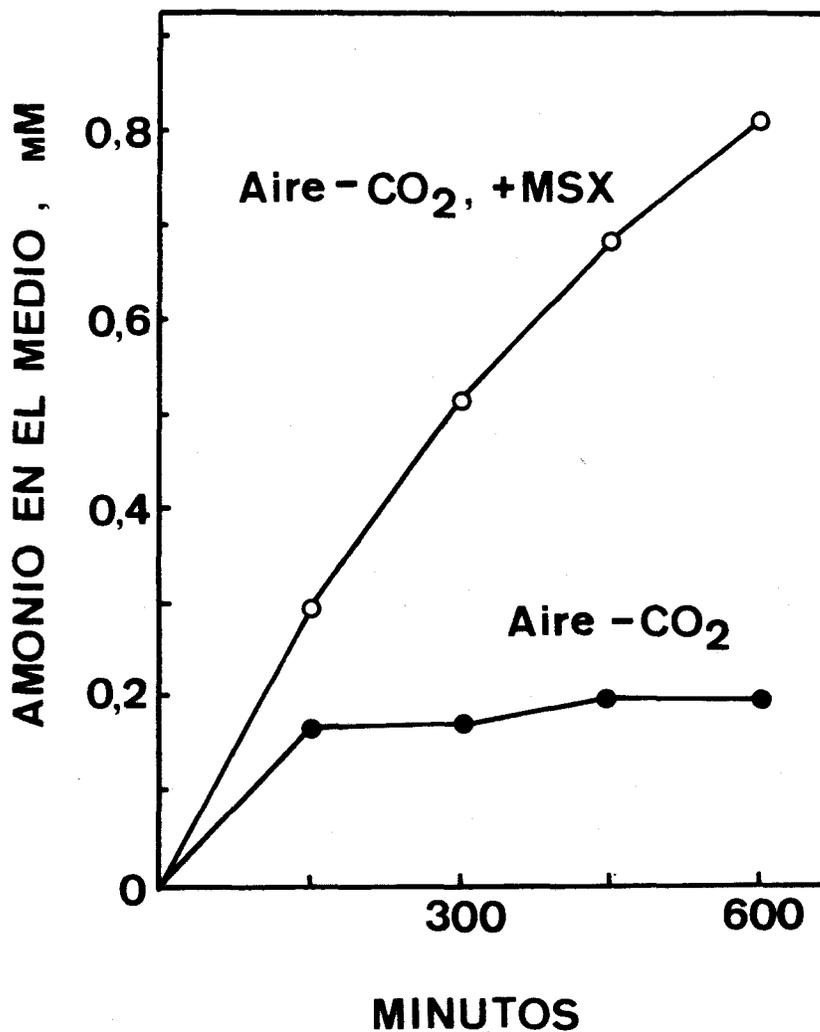


Fig. 25. Efecto de la carencia de  $\text{CO}_2$  sobre la reasimilación de amonio. Células crecidas con nitrato se resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en presencia de  $0,25 \text{ mM}$  de  $\text{KNO}_2$  y repartieron en dos cultivos, añadiéndose a uno de ellos  $\text{MSX } 1 \text{ mM}$ . Ambos cultivos se mantuvieron en una atmósfera de aire libre de  $\text{CO}_2$ , midiéndose a los tiempos indicados la concentración de amonio en el medio.

durante la fotorrespiración y otros procesos.

#### *Efecto del metilamonio sobre la actividad glutamina sintetasa*

La adición de metilamonio 5 mM a cultivos de *C. reinhardtii* que utilizan nitrato reduce el nivel intracelular de actividad GS (Fig. 26). El metilamonio es un análogo estructural del amonio que en *C. reinhardtii* se transforma por la acción catalítica de la GS en un único producto, identificado como metilglutamina (Franco *et al.* 1984). Por consiguiente, el hecho de que el metilamonio disminuya la actividad GS parece avalar la hipótesis de que el nivel intracelular de esta enzima está controlado negativamente por amonio y/o L-glutamina. No obstante, las pérdidas de actividad GS causadas por amonio y metilamonio muestran una clara diferencia: mientras que la promovida por amonio es mayor en oscuridad que en luz, como se ha descrito previamente (Cullimore 1981) y se muestra en la Fig. 28 (véase más adelante), el metilamonio reduce menos la actividad GS cuando se añade en oscuridad (Fig. 26).

En *C. reinhardtii* se da la circunstancia de que el nivel intracelular de metilglutamina aumenta, disminuyendo al mismo tiempo el de metilamonio, cuando células previamente tratadas con metilamonio se resuspenden en un medio de cultivo desprovisto de este compuesto (Franco *et al.* 1984). Se ha observado que la disminución de actividad GS que ocurre al añadir metilamonio es reversible sólo parcialmente al retirarlo

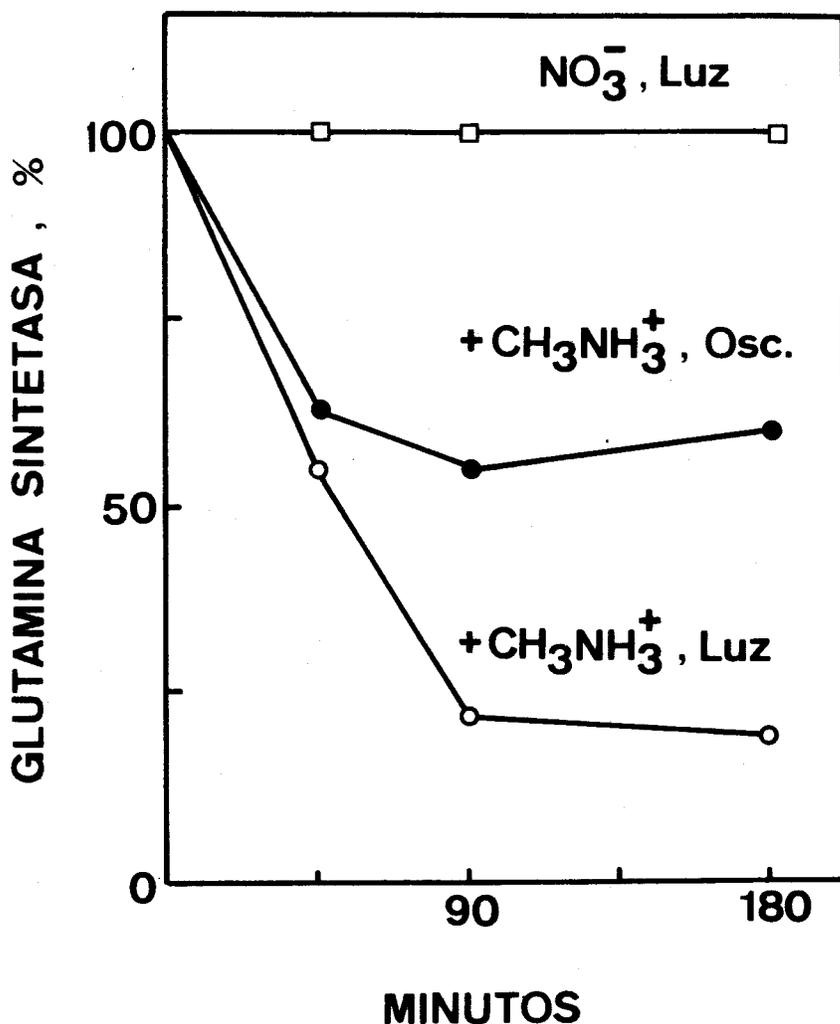


Fig. 26. Efecto de la adición de metilamonio sobre el nivel de actividad GS en células crecidas con nitrato. Células crecidas con nitrato se repartieron en tres cultivos, añadiéndose a dos ellos 5 mM de metilamonio. Uno de los cultivos con metilamonio se mantuvo en oscuridad y los dos restantes en luz. A los tiempos indicados se midió la actividad GS (100 % de actividad GS =  $1,5 \text{ U (mg Chl)}^{-1}$ ).

del medio de cultivo, no recuperándose alrededor de un 30 % de la actividad original encontrada en células cultivadas con nitrato (Fig. 27). Estos resultados sugieren la existencia de dos componentes en este fenómeno: uno de ellos, con el metilamonio como responsable químico, sería reversible al retirar el inhibidor del medio, mientras que el otro, no reversible al retirar el metilamonio del medio, tendría como responsable directo a la metilglutamina. Uno de estos procesos sería independiente de luz, mientras que el otro, dependiente de luz, podría relacionarse con el conocido efecto desacoplante que tiene el metilamonio (Chaparro et al. 1976).

*Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la disminución de actividad glutamina sintetasa causada por oscuridad y/o amonio*

En células de *C. reinhardtii* cultivadas con nitrato la adición de amonio acompañada del oscurecimiento del cultivo disminuye notablemente la actividad GS tras 90 min de tratamiento. Esta pérdida de actividad es prácticamente igual a la suma de las causadas por ambos tratamientos por separado (Fig. 28A). En células sometidas previamente a carencia de nitrógeno, la actividad GS también disminuye al suprimir la iluminación del cultivo o añadirle amonio. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en células cultivadas con exceso de N, la suma de ambas inactivaciones es mayor que la observada al añadir amonio en oscuridad (Fig. 28B).

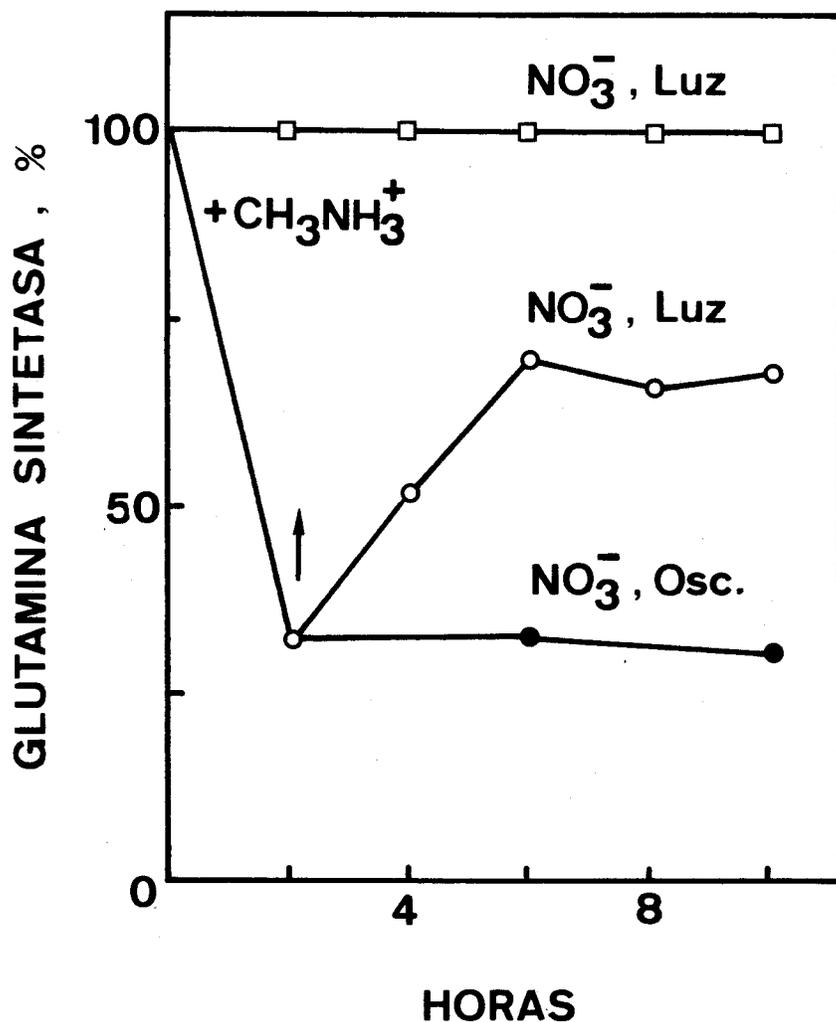


Fig. 27. Efecto de la retirada del metilamonio del medio sobre el nivel de actividad GS en células previamente tratadas con el citado compuesto. Las células de un cultivo crecido con nitrato se recogieron y resuspendieron ( $25 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en presencia de  $\text{KNO}_3$  5 mM. A continuación se repartieron en dos cultivos y se añadió a uno de ellos  $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$  5 mM. Después de 2 h, las células tratadas con metilamonio se resuspendieron nuevamente en presencia de  $\text{KNO}_3$  5 mM, dividiéndose la suspensión resultante en dos, una de las cuales se mantuvo en oscuridad. El 100 % de actividad GS fue  $0,8 \text{ U (mg Chl)}^{-1}$ ).

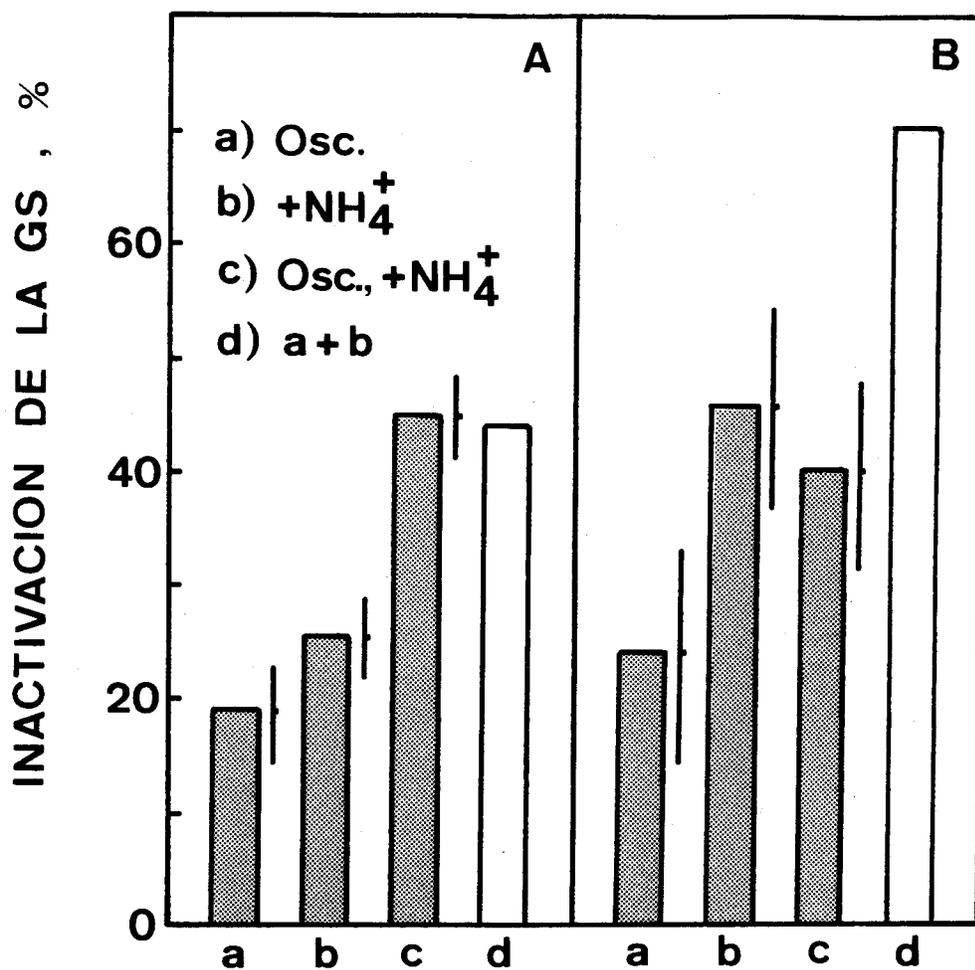


Fig. 28. Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la disminución de actividad GS causada por oscuridad y/o amonio. Células crecidas con nitrato (A) y, en su caso, mantenidas durante 18 h en carencia de nitrógeno (B), se repartieron en tres cultivos. La actividad GS se midió después de 90 min de incubación en las condiciones indicadas. En los experimentos realizados en presencia de amonio, la concentración de éste en el medio fue 5 mM. Se presentan las medias ( $\pm$  SD) de tres experimentos.

Parece probable que la pérdida de actividad por oscuridad o amonio sean fenómenos independientes y que en células deficientes en N la adición de amonio en oscuridad estimule la utilización de las reservas de carbono orgánico, evitándose la ligera reducción de actividad causada por el cese del metabolismo energético. Una apreciable estimulación por amonio de la actividad respiratoria de células deficientes en nitrógeno ha sido descrita en *Chlorella fusca* (Thomas et al. 1976).

*Efecto de la reposición de la fuente de nitrógeno sobre la actividad glutamina sintetasa de células deficientes en este elemento*

En células de *C. reinhardtii* sometidas a carencia de nitrógeno, que presentan un alto nivel de actividad GS, éste disminuye al reponer la fuente de N, siendo la pérdida de actividad mayor cuando se añade amonio en vez de nitrato (Fig. 29). Parece, pues, que los metabolitos que evitan la máxima expresión de la actividad GS se generan en mayor cantidad cuando la fuente de N es amonio.

*Efecto del DTE sobre las actividades  $GS_1$  y  $GS_2$*

La presencia de DTE en el tampón de extracción aumenta la cantidad total de actividad GS extraída y disminuye la relación  $GS_1/GS_2$  (Fig. 30), lo que indica que este compuesto estabiliza ambas enzimas, principalmente la  $GS_2$ . El efecto positivo que el

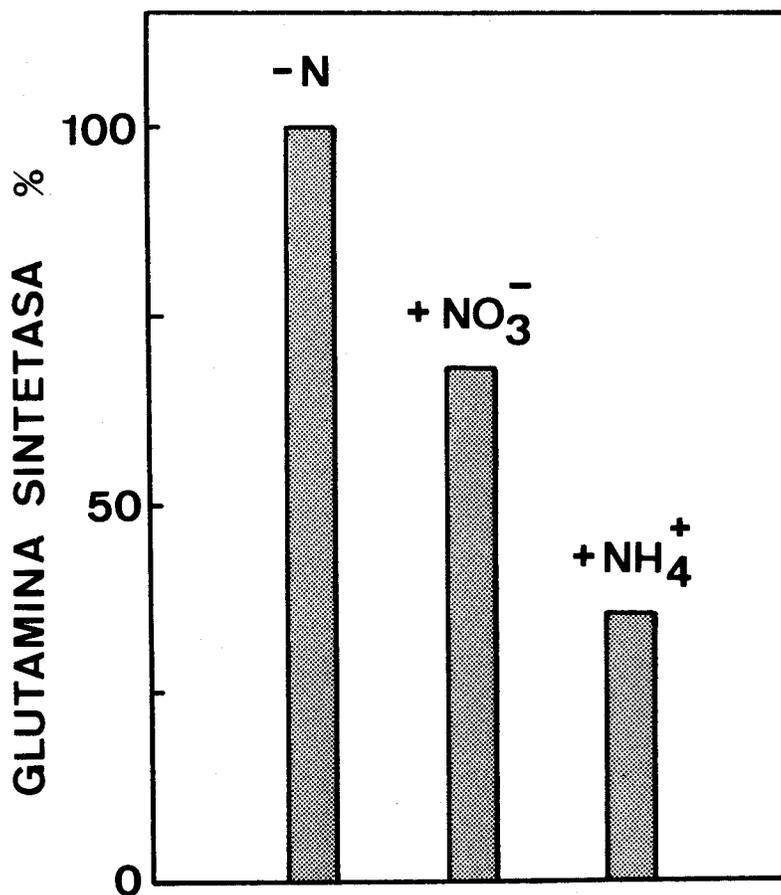


Fig. 29. Efecto de la reposición de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad GS en células deficientes en nitrógeno. Células cultivadas con amonio se recogieron y resuspendieron ( $20 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ) en un medio sin N. Tras 18 h en condiciones de crecimiento, el cultivo se dividió en tres partes, añadiéndose a dos de ellas 5 mM de  $\text{KNO}_3$  o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Después de 2 h de incubación, se midió la actividad GS (100 % de actividad GS =  $3,2 \text{ U (mg chl)}^{-1}$ ).

DTE ejerce sobre las actividades GS de *C. reinhardtii* (Florencio y Vega 1983b) revela la existencia de grupos sulfhidrilo esenciales para la actividad. También las actividades NADH-GOGAT (Gotor 1988) y Fd-GOGAT (Gotor et al., en prensa) son estimuladas por tioles, que, además, mejoran notablemente la actividad Fd-GOGAT en un sistema de cloroplastos reconstituidos (Márquez et al. 1987). Estos resultados sugieren una posible regulación por tioles de los sistemas GS/GOGAT en *C. reinhardtii*. Sin embargo, parece improbable una regulación por la luz a través de compuestos tiólicos generados fotosintéticamente, como se ha propuesto en otras microalgas (Rowell et al. 1979, Tischner y Schmidt 1982), dado que en *C. reinhardtii* no hemos observado ningún efecto apreciable de la luz sobre las actividades citadas. No obstante, puede ocurrir que estas enzimas estén reguladas por poder reductor no relacionado directamente con la cadena fotosintética de transporte electrónico, quizás a través de un sistema NADP/tiorredoxina similar al descrito en células heterotróficas, bacterias fotosintéticas y diversos organismos fotosintéticos (Buchanan 1980, Holmgren 1985, Florencio et al. 1988).

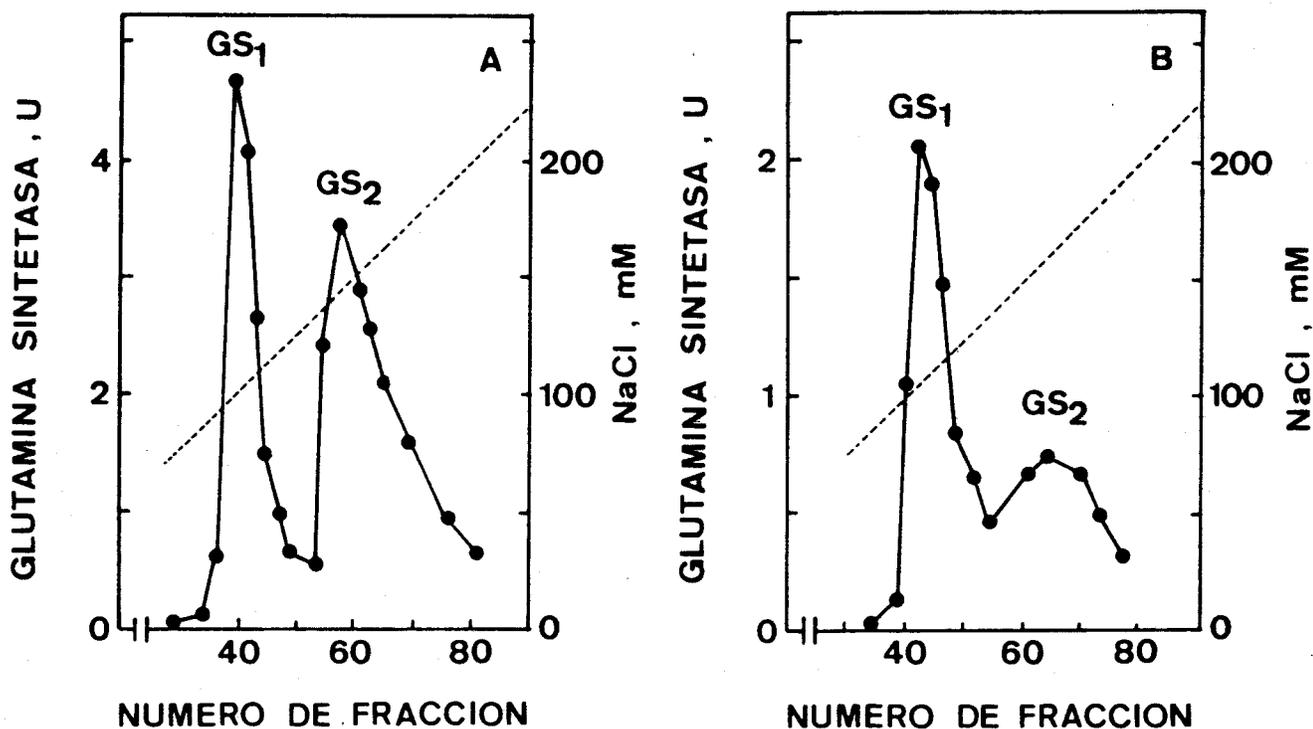


Fig. 30. Efecto del DTE sobre la relación de actividades  $GS_1/GS_2$ . En (A), extractos crudos preparados a partir de 10 g de células cultivadas con nitrato se filtraron a través de una columna de DEAE-celulosa (32 x 1,6 cm) equilibrada con tampón estándar. Tras lavar con el mismo tampón suplementado con NaCl 50 mM, la actividad GS se separó de la columna con un gradiente lineal de NaCl en tampón estándar. En (B) se siguió el mismo procedimiento, pero sin DTE en el tampón.

## CONCLUSIONES

En *Chlamydomonas reinhardtii*, la deficiencia en nitrógeno que se produce al mantener las células en un medio de cultivo carente de este elemento, causa un incremento del nivel intracelular de las actividades glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). La GS<sub>1</sub> y la NADH-GOGAT aumentan 3-4 veces, mientras que la GS<sub>2</sub> y la Fd-GOGAT lo hacen 1,5 veces. Experimentos realizados con MSX, azaserina y metilamonio, en los que se genera en las células una situación de deficiencia en nitrógeno que va acompañada paradójicamente de la acumulación intracelular de determinados compuestos nitrogenados, sugieren que el amonio y/o la L-glutamina evitan la expresión máxima de las actividades GS y Fd-GOGAT, mientras que un producto de la asimilación del amonio puede ser modulador negativo de la NADH-GOGAT. Por otra parte, la carencia de nitrógeno aumenta el consumo de amonio, pero no los de nitrato o nitrito, y permite que se asimile nitrógeno inorgánico en oscuridad a expensas de los compuestos orgánicos de carbono acumulados en la célula.

En *C. reinhardtii*, la limitación de CO<sub>2</sub> produce: (i) una inhibición del consumo de nitrato, que permite que en esas condiciones todo el amonio que resulta de la reducción de nitrato se incorpore como aminoácidos; y (ii) una disminución de las actividades nitrato reductasa (NR) y GS. Mientras que la pérdida parcial de actividad NR puede ser consecuencia de la inhibición previa del transporte de nitrato al interior de la célula, la de actividad GS se debe al funcionamiento de la ruta de asimilación de nitrógeno inorgánico cuando el suministro de

esqueletos carbonados disminuye. Por otra parte, la limitación de  $\text{CO}_2$  también produce una inhibición de la reducción de nitrito. Esta inhibición, que sólo ocurre en presencia de nitrato, no se observa en células tratadas con MSX, sugiriendo la participación en la misma de algún producto de la asimilación del amonio.

Nuestros resultados sugieren que en *C. reinhardtii*, el consumo de nitrato y la actividad GS están regulados por productos tempranos del metabolismo del nitrógeno inorgánico, es decir, el amonio y/o algún producto *primario* de su asimilación (la L-glutamina parece ser un buen candidato). Cuando un cambio en las condiciones nutricionales de las células desequilibra los metabolismos del N inorgánico y del carbono, en el sentido de aumentar el nivel intracelular de los citados compuestos con respecto al de esqueletos carbonados disponibles para su asimilación, la utilización de nitrato y la actividad GS se inhiben. De esta manera, se evita el funcionamiento superfluo de la ruta de asimilación de N inorgánico. La Fig. 31 resume el mecanismo de control que se acaba de mencionar.

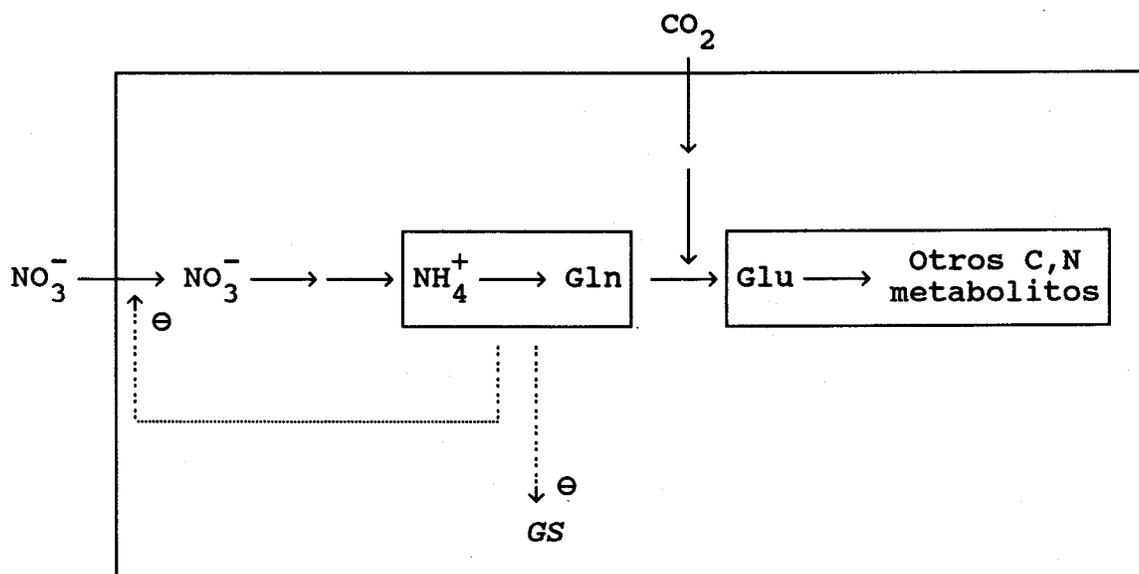


Fig. 31. Regulación del metabolismo del nitrógeno inorgánico en *C. reinhardtii*. Las líneas discontinuas representan señales reguladoras. Para más detalles, véase el texto.

## BIBLIOGRAFIA

- Anderson LE & Avron M (1976) Light modulation of enzyme activity in chloroplasts. *Plant Physiol.* 57, 209-213.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Ahmad I & Hellebust JA (1984) Nitrogen metabolism of the marine microalga *Chlorella autotrophica*. *Plant Physiol.* 76, 658-663.
- Ahmad I & Hellebust JA (1986) Pathway of ammonium assimilation in the soil alga *Stichococcus bacillaris* Naeg. *New Phytol.* 103, 57-68.
- Ahmad I & Hellebust JA (1989) Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in the soil alga *Stichococcus bacillaris* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 25, 48-54.
- Alef K & Zumft W (1981) Regulatory properties of glutamine synthetase from the nitrogen-fixing phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Z. Naturforsch.* 36c, 784-789.
- Azuara MP & Aparicio PJ (1983) *In vivo* blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. *Plant Physiol.* 71, 286-290.
- Azuara MP & Aparicio PJ (1984) Effects of light quality, CO<sub>2</sub> tensions and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations on the inorganic nitrogen metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Res.* 5, 97-103.
- Bagchi SN, Rai UN, Rai AN & Singh AH (1985) Nitrate metabolism in the cyanobacterium *Anabaena cycadae*: regulation of nitrate uptake and reductase by ammonia. *Physiol. Plant.* 63, 322-326.
- Beudeker RF & Tabita FR (1984) Glycollate metabolism is under nitrogen control in *Chlorella*. *Plant Physiol.* 75, 516-520.

- Buchanan BB (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374.
- Caballero FJ, Cejudo FJ, Florencio FJ, Cárdenas J & Castillo F (1985) Molecular and regulatory properties of glutamine synthetase from the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1. *J. Bacteriol.* 162, 804-809.
- Cawse PA (1967) The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92, 311-315.
- Córdoba F, Cárdenas J & Fernández E (1985) Role of the diaphorase moiety on the reversible inactivation of the *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 827, 8-13.
- Cresswell RC & Syrett PJ (1979) Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci. Lett.* 14, 321-325.
- Cresswell RC & Syrett PJ (1984) Effects of methylammonium and of L-methionine-DL-sulfoximine on the growth and nitrogen metabolism of *Phaeodactylum tricornutum*. *Arch. Microbiol.* 139, 67-71.
- Cullimore J & Sims AP (1980) An association between photorespiration and protein catabolism. Studies with *Chlamydomonas*. *Planta* 150, 392-396.
- Cullimore J & Sims AP (1981a) Pathway of ammonia assimilation in illuminated and darkened *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20, 933-940.
- Cullimore J & Sims AP (1981b) Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*.

- Phytochemistry 20, 587-591.
- Cullimore J (1981) Glutamine synthetase of *Chlamydomonas*: rapid reversible deactivation. *Planta* 152, 587-591.
- Chaparro A, Maldonado JM, Diez J, Relimpio AM & Losada M (1976) Nitrate reductase inactivation and reducing power and energy charge in *Chlorella* cells. *Plant Sci. Lett.* 6, 335-342.
- Da Fonseca-Wollheim F, Bergmeyer HU & Gutman I (1974) *En Methoden der enzymatischen analyse*, 2nd edn (Bergmeyer HU, ed.), pp. 1850-1853. Verlag Chemie Weinheim.
- Davis EA (1953) Nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.* 28, 539-544.
- Di Martino Rigano V, Vona V, Fuggi A & Rigano C (1982) Effect of L-methionine-DL-sulfoximine, a specific inhibitor of glutamine synthetase, on ammonium and nitrate metabolism in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Physiol. Plant.* 54, 47-51.
- Di Martino Rigano V, Martello A, Di Martino C & Rigano C. (1985) Effect of CO<sub>2</sub> and phosphate deprivation on the control of nitrate, nitrite and ammonium metabolism in *Chlorella*. *Physiol. Plant.* 63, 241-246.
- Di Martino Rigano V, Vona V, Di Martino C & Rigano C (1986) Effect of darkness and CO<sub>2</sub> starvation on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Physiol. Plant.* 68, 34-38.
- Dixon GK & Syrett PJ (1988) Interactions between the uptake and assimilation of inorganic nitrogen and carbon in *Amphidinium* spp. (dinophyceae). *J. Exp. Bot.* 39, 1299-1311.

- Dortch Q, Clayton Jr JR, Thoreson SS, Bressler SL & Ahmed SI (1982) Response of marine phytoplankton to nitrogen deficiency: decreased nitrate uptake versus enhanced ammonium uptake. *Marine Biology* 70, 13-19.
- Eisele R & Ullrich W (1977) Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH<sup>-</sup> flux in *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Physiol.* 59, 18-21.
- Everest SA, Hipkin CR & Syrett PJ (1986) Enzyme activities in some marine phytoplankters and the effect of nitrogen limitation on nitrogen and carbon metabolism in *Chlorella stigmatofora*. *Marine Biology* 90, 165-172
- Fischer P & Klein U (1988) Localization of nitrogen-assimilating enzymes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 88, 947-952.
- Florencio FJ & Vega JM (1982) Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 21, 1195-1200.
- Florencio FJ & Vega JM (1983a) Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 158, 288-293.
- Florencio FJ & Vega JM (1983b) Separation, purification and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* 38, 531-538.
- Florencio FJ, Marqués S & Candau P (1987) Regulation by ammonia of glutamine synthetase from unicellular cyanobacteria. *In Inorganic nitrogen metabolism* (WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett, F Castillo, eds.), pp. 144-147. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Florencio FJ, Yee BC, Johnson TC & Buchanan BB (1988) An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* 266, 496-507.
- Flores E, Guerrero MG & Losada M (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 128, 137-144.
- Flores E, Guerrero MG & Losada M (1983a) Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 722, 408-416.
- Flores E, Romero JM, Guerrero MG & Losada M (1983b) Regulatory interaction of photosynthetic nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 725, 529-532.
- Franco AR, Cárdenas J & Fernández E (1984) Ammonium (methylammonium) is the co-repressor of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 176, 453-456.
- Franco AR (1986) Estudio de mutantes del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* afectados en la asimilación del nitrógeno inorgánico. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.
- Franco AR, Cárdenas J & Fernández E (1987) Involvement of reversible inactivation in the regulation of nitrate reductase enzyme levels in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 84, 665-669.
- Galván F, Márquez AJ & Fernández E (1985) Physicochemical properties of ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* 40c, 373-378.

- Gotor C (1988) Estudios de regulación e inmunológicos de las glutamato sintasa del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Gotor C, Martínez-Rivas JM, Márquez AJ & Vega JM (1990) Functional properties of purified ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* (en prensa).
- Guerrero MG & Lara C (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. *En Cyanobacteria: current research* (C van Baalen, P Fay, eds.) pp. 163-186. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York.
- Haynes RJ (1986) Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. *En Mineral nitrogen in the plant-soil system* (RJ Haynes) pp. 303-378. Academic Press.
- Hernández G & Mora J (1986) Glutamine synthesis regulates sucrose catabolism in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 3315-3323.
- Hipkin CR & Syrett PJ (1977) Some effects of nitrogen starvation on nitrogen and carbohydrate metabolism in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 133, 209-214.
- Hipkin CR, Everest SA, Rees TA & Syrett PJ (1982) Ammonium generation by nitrogen-starved cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 154, 587-592.
- Hipkin CR, Thomas RJ & Syrett PJ (1983) Effects of nitrogen deficiency on nitrate reductase, nitrate assimilation and photosynthesis in unicellular marine algae. *Marine Biology* 77, 101-105.

- Hirel B & Gadal P (1981) Glutamine synthetase isoforms in pea leaves. Intracellular localization. *Z. Pflanzenphysiol.* 102, 315-319.
- Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237-271.
- Hutner SH, Provosoli L, Schatz A & Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganism. *Proc. Amer. Phil. Soc.* 94, 152-170.
- Johansson BC & Gest H (1977) Adenylation/deadenylation control of the glutamine synthetase of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 81, 365-371.
- Kendall AC, Wallsgrove RM, Hall NP, Turner JC & Lea PJ (1986) Carbon and nitrogen metabolism in barley mutants (*Hordeum vulgare*) lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* 168, 316-323.
- Krämer E, Tischner R & Schmidt A (1988) Regulation of assimilatory nitrate reduction at the level of nitrite in *Chlorella fusca*. *Planta* 176, 28-35.
- Ladha JK, Powell P & Stewart WDP (1978) Effects of 5-hydroxylisine on acetylene reduction and  $\text{NH}_4^+$  assimilation in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 83, 688-696.
- Lara C, Romero JM & Guerrero MG (1987a) Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 169, 376-4378.
- Lara C, Romero JM, Coronil T & Guerrero MG (1987b) Interactions between photosynthetic nitrate assimilation and  $\text{CO}_2$  fixation

- in cyanobacteria. *En Inorganic nitrogen metabolism* (WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett, F. Castillo, eds.), pp. 45-52. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Larsson CM & Anderson M (1981) Uptake and photoreduction of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  in *Scenedesmus*: interactions with  $\text{CO}_2$  fixation. *En Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism* (G Akoyunoglou, ed.), pp. 741-750. Balaban, Philadelphia, PA.
- Larsson CM, Larsson M & Guerrero MG (1985a) Photosynthetic nitrogen metabolism in high and low  $\text{CO}_2$ -adapted *Scenedesmus*. II. Effect of ammonium and methionine sulfoximine on nitrate utilization. *J. Exp. Bot.* 36, 1387-1395.
- Larsson M, Larsson CM & Ullrich WR (1982a) Regulation by amino acids of photorespiratory ammonia and glycollate release from *Ankistrodesmus* in the presence of methionine sulfoximine. *Plant Physiol.* 70, 1637-1640.
- Larsson M, Ingermarsson B & Larsson CM (1982b) Photosynthetic energy supply for  $\text{NO}_3^-$  assimilation in *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.* 55, 301-308.
- Larsson M, Larsson CM & Guerrero MG (1985b) Photosynthetic nitrogen metabolism in high and low  $\text{CO}_2$ -adapted *Scenedesmus*. I. Inorganic carbon-dependent  $\text{O}_2$  evolution, nitrate utilization and nitrogen recycling. *J. Exp. Bot.* 36, 1373-1386.
- Lea PJ & Mifflin BJ (1979) Photosynthetic ammonia assimilation, *En Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, vol. 6 (M. Gibbs, E Latzko, eds.) pp. 445-456. Springer Verlag, Berlin.
- Lopez-Ruiz A, Verbelen JP, Roldán JM & Diez J (1985) Nitrate

reductase of green alga is located in the pyrenoid. *Plant Physiol.* 79, 1006-1010.

Losada M, Guerrero MG & Vega JM (1981) The assimilatory reduction of nitrate. *En Biology of inorganic nitrogen and sulfur* (H Bothe, A Trebst, eds.), pp. 30-63. Springer Verlag, Berlin.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mann AF, Fentem PA & Stewart GR (1980) Tissue localization of barley (*Hordeum vulgare* L.) glutamine synthetase isoenzymes. *FEBS Lett.* 110, 265-267.

Márquez AJ, Galván F & Vega JM (1984) Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Sci. Lett.* 34, 305-314.

Márquez AJ, Galván F & Vega JM (1986) Utilization of ammonium by mutant and wild types of *Chlamydomonas reinhardtii*. Studies on the glutamate synthase activities. *J. Plant Physiol.* 124, 95-102.

Márquez AJ, Serra MA & Vega JM (1987) Characterization of a light-dependent glutamate synthase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Res.* 12, 73-81.

Match T, Ida S & Takahashi E (1980) A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase. *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 43, 1-6.

McCarthy JJ & Goldman JC (1979) Nitrogenous nutrition of marine

- phytoplankton in nutrient-depleted waters. *Science* 203, 670-672.
- Mifflin BJ & Lea PJ (1977) Amino acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329.
- Mifflin BJ, Lea PJ & Wallsgrove RM (1980) The role of glutamine in ammonium assimilation and reassimilation in plants. *En Glutamine metabolism: enzymology and regulation* (J Mora, R Palacios, eds.) pp. 213-234. Academic Press, New York.
- Meeks JC, Wolk CP, Thomas J, Lockau W, Shaffer PW, Austin SM, Chien WS & Galonsky A (1977) The pathway of assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252, 7894-7900.
- Orr J & Haselkorn R (1982) Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* sp. *J. Bacteriol.* 152, 626-635.
- Rideal EK & Roberts R (1951) The photochemistry of native proteins. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A.* 205, 391-408.
- Rhodes D, Rendon GA & Stewart GR (1975) The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. *Planta* 125, 201-211.
- Rhodes D, Sims AP & Stewart GR (1979) Glutamine synthetase and the control of nitrogen assimilation in *Lemna minor* L. *En Nitrogen assimilation of plants* (EJ Hewitt, CV Cutting, eds.) pp. 510-520. Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Romero F, Caballero FJ, Castillo F & Roldán JM (1985a) Immuno-electrophoretic approach to the metabolic regulation of glutamine synthetase in *Rhodospseudomonas capsulata* E1F1: role of glutamine. *Arch. Microbiol.* 143, 111-116.

- Romero JM, Lara C & Guerrero MG (1985b) Dependence of nitrate utilization upon active CO<sub>2</sub> fixation in *Anacystis nidulans*: a regulatory aspect of the interaction between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 237, 396-401.
- Romero JM, Coronil T, Lara C & Guerrero MG (1987) Modulation of nitrate uptake in *Anacystis nidulans* by the balance between ammonium assimilation and CO<sub>2</sub> fixation. Arch. Biochem. Biophys. 256, 578-584.
- Rowell P, Enticott S & Stewart WDP (1977) Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. New Phytol. 79, 41-54.
- Rowell P, Sampaio MJAM, Ladha JK & Stewart WDP (1979) Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity *in vivo* in response to light and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Arch. Microbiol. 120, 195-200.
- Somerville CR & Ogren WL (1980) Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking in leaf glutamate synthase activity. Nature 286, 257-259.
- Snell FD & Snell CT (1949) Colorimetric methods of analysis, vol. 3, pp. 804-805, Van Nostrand, New York.
- Shapiro BM & Stadtman ER (1970a) Glutamine synthetase (*E. coli*). Methods Enzymol. 17, 910-922.
- Shapiro BM & Stadtman ER (1970b) The regulation of glutamine synthetase in microorganism. Annu. Rev. Microbiol. 24, 501-524.
- Solorzano L (1969) Determination of ammonia in natural water by the phenolhypochlorite method. Limnol. Oceanogr. 14, 799-801.

- Stevens SE & Baalen C van (1973) Characteristics of nitrate reduction in a mutant of the blue-green algae *Agmenellum quadruplicatum*. *Plant Physiol.* 51, 350-356.
- Stewart GR & Rhodes D (1976) Evidence for the assimilation of ammonia via the glutamine pathway in nitrate-grown *Lemna minor* L. *FEBS Lett.* 64, 296-299.
- Stewart WDP & Rowell (1975) Effect of L-methionine-D,L-sulfoximine on the assimilation of newly fixed  $\text{NH}_3$ , acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 846-856.
- Sueoka N, Chiang KS & Kates JR (1967) Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* 25, 47-66.
- Sumar N, Casselton PJ, McNally SF & Stewart GR (1984) Occurrence of isoenzymes of glutamine synthetase in the alga *Chlorella kessleri*. *Plant Physiol.* 74, 204-207.
- Suzuki A & Gadal P (1984) Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms. *Physiol. Veg.* 22, 4, 471-486.
- Syrett PJ & Morris I (1963) The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 566-575.
- Syrett PJ & Leftley JW (1976) Nitrate and urea assimilation by algae. *En Perspectives in experimental biology*, vol. 2, Botany (N Sutherland, ed.), pp. 221-234. Pergamon Press, Oxford.

- Syrett PJ (1981) Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish Aquat. Sci.* 210, 182-210.
- Syrett PJ (1987) Nitrogen assimilation by eukaryotic algae. *En Inorganic nitrogen metabolism* (WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett, F. Castillo, eds.), pp. 25-31. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Syrett PJ (1988) Uptake and utilization of nitrogen compounds. *En Biochemistry of the algae and cyanobacteria* (LJ Rogers, JR Gallon, eds.), pp. 23-39. Oxford University Press, Oxford.
- Taylor AA & Stewart GR (1980) The effect of ammonia and light/dark transitions on the level of glutamine synthetase activity in *Osmunda regalis*. *Plant Sci. Lett.* 20, 125-131.
- Thacker A & Syrett PJ (1972) The assimilation of nitrate and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 71, 423-433.
- Thomas RJ, Hipkin CR & Syrett PJ (1976) The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen-deficient cells of *Chlorella*. *Planta* 133, 9-13.
- Thomas J, Meeks JC, Wolk CP, Shaffer PW, Austin SM & Chien WS (1977) Formation of glutamine from ( $^{13}\text{N}$ ) ammonia, ( $^{13}\text{N}$ ) dinitrogen and ( $^{14}\text{C}$ ) glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bact.* 129, 1545-1555.
- Tischner R & Hüttermann A (1980) Regulation of glutamine synthetase by light and during nitrogen deficiency in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 66, 805-808.
- Tischner R & Schmidt A (1982) A thioredoxin-mediated activation

- of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiol.* 70, 113-116.
- Ullrich WR (1983) Uptake and reduction of nitrate: algae and fungi. *Encyclopedia of Plant Physiology* 15A, 376-397.
- Ullrich WR(1987) Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. *En Inorganic nitrogen metabolism* (WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett, F Castillo) pp. 32-38, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- van der Meulen PY & Bassham JA (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 2233-2239.
- Vega JM, Cárdenas J, Losada J (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods Enzimol.* 69, 255-270.
- Wallsgrave RM, Kendall AC, Turner JC & Hall NP (1986) Glutamine synthetase-deficient mutants of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol.* 80, 283.
- Wolk CP, Thomas J, Shaffer PW, Austin SM & Galonsky A (1976) Pathway of nitrogen metabolism after fixation of  $^{13}\text{N}$ -labelled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251, 5027-5034.
- Wolosiuk RA & Buchanan BB (1977) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266, 565-567.
- Yates MG (1980) Biochemistry of nitrogen fixation. *En The biochemistry of plants*, vol. 5 (BJ Mifflin, ed.) pp. 1-64. Academic Press.

ALBERTO MENACHO APARICIO

CONTRIBUCION A LOS ESTUDIOS DE REGULACION  
DEL METABOLISMO DEL NITROGENO INORGANICO DEL  
ALGA VERDE *Chlamydomonas reinhardtii*

ARTO "CUM LAUDE"

POR UNANIMIDAD

~~El Vocal~~  
~~El Vocal~~  
~~El Vocal~~  
El Secretario



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672477