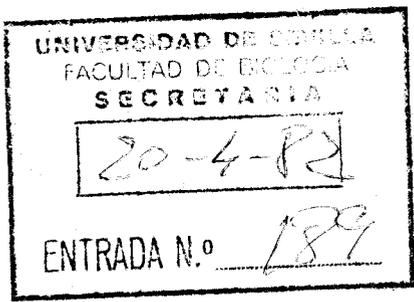


TD 653
653

R. 4325



UTILIZACION DE NITRATO POR LA CIANOBACTERIA
Anacystis nidulans. MECANISMO Y REGULACION.



Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por el Licenci
ciado ENRIQUE FLORES GARCIA

Enrique Flores

Sevilla, Abril de 1982

DIRECTOR:

PONENTE:

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

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

A mis padres

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla que dirige el Profesor Manuel Losada Villasante, a quien agradezco el haberme acogido en su equipo de investigación, así como su orientación, interés y estímulo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Miguel García Guerrero, Director de esta Tesis, agradezco su dedicación e interés, al igual que su valiosa aportación de ideas y ayuda tanto científica como humana.

A Toñi, mi mujer, le agradezco su constante ayuda a lo largo de estos años de trabajo en el laboratorio. Su presencia humana en los momentos más difíciles es el mejor estímulo que he podido recibir.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a José María Romero por su participación directa en la obtención de algunos de los resultados que se presentan en este trabajo, así como a los Dres. Carlos Manzano y Pedro Candau por su inestimable labor en los comienzos de mi formación científica.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a la Fundación Ramón Areces por su ayuda económica para la financiación de esta investigación.

INDICE

Abreviaturas y símbolos	1
1. <u>INTRODUCCION</u>	4
1.1. LA FOTOSINTESIS	5
1.2. LAS CIANOBACTERIAS	8
1.3. EL NITROGENO	10
1.4. LA ASIMILACION DEL NITRATO EN MICROORGANISMOS	12
1.4.1. <u>Transporte al interior de la célula</u>	12
1.4.2. <u>Reducción hasta amonio</u>	14
1.4.3. <u>Incorporación del amonio a esqueletos carbonados</u> ...	16
1.5. ESTUDIOS FISIOLÓGICOS DE LA ASIMILACION DEL NITRATO	20
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	26
2.1. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO	27
2.2. RECOGIDA DE CELULAS	29
2.3. ESTIMACION DE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	30
2.3.1. <u>Permeabilización de las membranas celulares</u>	30
2.3.2. <u>Nitrato reductasa</u>	31
2.3.3. <u>Glutamina sintetasa (actividad transferasa)</u>	32
2.4. ESTIMACION DE ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS	34
2.4.1. <u>Desprendimiento de oxígeno asociado a la fijación de CO_2</u>	34
2.4.2. <u>Desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato y de nitrito</u>	36
2.4.3. <u>Absorción de oxígeno dependiente de metil viológeno</u>	38
2.4.4. <u>Reducción de ferricianuro dependiente de p-benzoquinona</u>	39
2.5. ESTIMACION DEL CONSUMO DE LOS IONES NITROGENADOS INORGANICOS	41
2.6. ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE AMONIO A PARTIR DE AMINOACIDOS	45
2.7. EXTRACCION DE METABOLITOS CELULARES	47

2.8. METODOS ANALITICOS	49
2.8.1. <u>Determinación de nitrato</u>	49
2.8.2. <u>Determinación de nitrito</u>	49
2.8.3. <u>Determinación de amonio</u>	50
2.8.4. <u>Determinaciones de desprendimiento o absorción de oxígeno</u>	50
2.8.5. <u>Determinación de glutamato</u>	51
2.8.6. <u>Determinación de glutamina</u>	52
2.8.7. <u>Cromatografía en papel de aminoácidos</u>	52
2.8.8. <u>Determinación de γ-glutamil-hidroxamato</u>	53
2.8.9. <u>Determinación de ferricianuro</u>	53
2.8.10. <u>Determinación del volumen de células empaquetadas</u> ..	53
2.8.11. <u>Determinación de clorofila</u>	54
2.8.12. <u>Determinación de proteína</u>	54
2.8.13. <u>Determinaciones espectrofotométricas</u>	55
2.8.14. <u>Medidas del pH</u>	55
2.8.15. <u>Medidas de intensidades de iluminación</u>	56
2.8.16. <u>Medidas de flujos gaseosos</u>	56
2.9. REACTIVOS	57
3. <u>RESULTADOS</u>	58
3.1. <u>LA ASIMILACION DEL NITRATO EN <i>Anacystis nidulans</i></u>	59
3.1.1. <u>Utilización de nitrato, nitrito y amonio</u>	59
3.1.1.1. <u>Caracterización del consumo de iones inorgánicos nitrogenados</u>	60
3.1.1.2. <u>El consumo implica la metabolización intracelular de los sustratos</u>	66
3.1.2. <u>Entrada de nitrato (y de nitrito) en la célula</u>	73
3.1.2.1. <u>Participación de una permeasa en la entrada del nitrato</u>	75
3.1.2.2. <u>Naturaleza activa del transporte del nitrato</u> ..	80
3.1.2.3. <u>El sistema de entrada de nitrito</u>	90
3.1.2.4. <u>Existencia de un elemento común al transporte de nitrato y de nitrito</u>	98
3.1.3. <u>Reducción fotosintética de nitrato y nitrito</u>	104
3.1.3.1. <u>Requerimiento de luz para el consumo de nitrato (y nitrito)</u>	105

3.1.3.2. Desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato (y nitrito)	108
3.1.4. <u>Asimilación de amonio mediante su incorporación a esqueletos carbonados</u>	119
3.1.4.1. Caracterización de la utilización de amonio por las células	119
3.1.4.2. Glutamina sintetasa-glutamato sintasa: la ruta de asimilación del amonio en <u>A. nidulans</u>	125
3.2. REGULACION DE LA ASIMILACION DEL NITRATO	133
3.2.1. <u>Papel del amonio en la regulación de la utilización del nitrato</u>	134
3.2.1.1. Inhibición de la utilización del nitrato conectada con el consumo de amonio	134
3.2.1.2. Intervención de productos de la asimilación del amonio	138
3.2.1.3. Punto de acción de la regulación por amonio ...	149
3.2.2. <u>Papel del anhídrido carbónico en la regulación de la utilización del nitrato</u>	158
3.2.2.1. Identificación del CO ₂ como sustrato de la asimilación fotosintética del carbono	158
3.2.2.2. Afinidad por el CO ₂ de los procesos de utilización de nitrato y de fijación de CO ₂	161
3.2.2.3. Liberación por MSX del requerimiento de CO ₂ para la utilización de nitrato	164
3.2.2.4. Efecto del CO ₂ sobre el consumo de nitrito	171
3.2.3. <u>Efecto de la deficiencia en nitrógeno sobre la utilización del nitrato y su regulación</u>	174
3.2.3.1. Respuesta del consumo de nitrato al ayuno en nitrógeno	174
3.2.3.2. Deficiencia en nitrógeno causada por el ayuno de este elemento	176
3.2.3.3. Características fisiológicas de las células deficientes en nitrógeno	180
3.2.3.4. Regulación de la utilización del nitrato en las células deficientes en N	185
3.2.4. <u>Efecto de los aminoácidos sobre el consumo de nitrato</u>	191
3.2.4.1. Cambios en los niveles de glutamato y glutamina provocados por el amonio	191
3.2.4.2. Respuesta del consumo de nitrato a la presencia de aminoácidos en el medio	192

3.2.4.3. Caracterización de la inhibición por aminoácidos básicos	202
3.3. INHIBICION POR AMONIACO DE LA FOTOSINTESIS EN <u>A. nidulans</u>	206
3.4. PRODUCCION DE AMONIO DEPENDIENTE DE L-AMINOACIDOS BASICOS POR <u>A. nidulans</u>	212
3.4.1. <u>Caracterización de sustratos</u>	213
3.4.2. <u>Participación de una aminoácido oxidasa de L-aminoácidos básicos en la generación de amonio a partir de arginina, lisina y ornitina</u>	218
4. <u>DISCUSION</u>	227
5. <u>CONCLUSIONES</u>	251
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	254

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	absorbancia
ADP	adenosín 5'-difosfato
ATP	adenosín 5'-trifosfato
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
DCMU	N'-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetil urea
$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}}$	coeficiente de extinción milimolar para un paso de luz de 1 cm
$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}}$	coeficiente de extinción mg/ml para un paso de luz de 1 cm
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FCCP	trifluorometoxicarbonilcianuro fenil-hidrazona
Fd	ferredoxina
<u>g</u>	aceleración de la gravedad
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GOGAT	glutamato sintasa
GS	glutamina sintetasa

HEPES	N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfonato
h	hora
Km	constante de Michaelis
l	litro
m	metro
min	minuto
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MV	metil viológeno
NAD ⁺	nicotinamida adenín dinucleótido
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
s	segundo
Tricina	N-Tris (hidroximetil) metilglicina

U unidad de actividad enzimática

v/v volumen/volumen

1.- INTRODUCCION

1.1.- LA FOTOSINTESIS

La fuente última de energía que mantiene e impulsa la vida en la Tierra es la que emite el Sol en forma de radiación electromagnética, que es captada y convertida en energía química por los organismos fototrofos, dentro de los que se incluyen algunas bacterias, las cianobacterias o algas verde-azuladas, las algas eucarióticas y las plantas superiores. El resto de los organismos que pueblan la Tierra dependen de la energía química transformada y almacenada por los fototrofos.

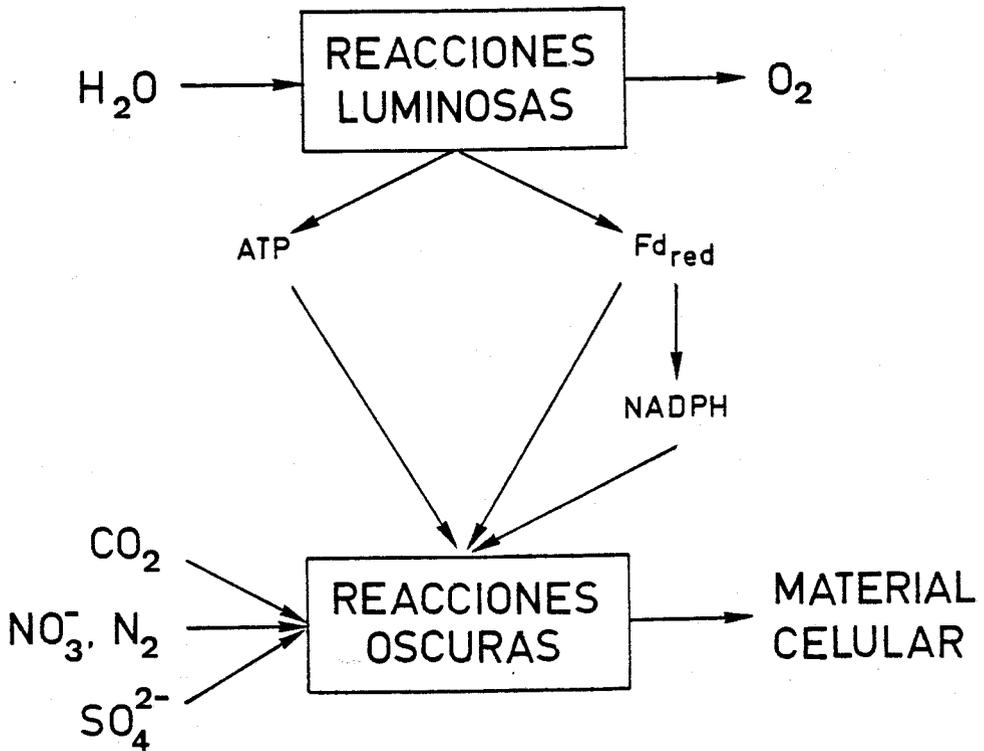
El proceso mediante el cual los organismos fototrofos transforman la energía electromagnética en energía química recibe el nombre de Fotosíntesis. En una primera etapa histórica se creyó que la reacción básica de este proceso era la escisión, promovida por la luz, de la molécula de anhídrido carbónico para rendir oxígeno molecular y carbono, seguida por la hidratación de éste hasta azúcar (véase Warburg, 1964).

Hoy, sin embargo, gracias a los experimentos iniciales de van Niel y de Hill (véase Losada, 1972), se sabe que la reacción básica de la fotosíntesis en algas y en plantas superiores es la fotólisis del agua, promovida por la luz y catalizada por la clorofila, que da lugar a la formación de poder reductor y al desprendimiento de oxígeno. Se conoce además que el flujo de electrones fotosintético va acompañado de la formación de ATP. Siguiendo a Arnon (1971), los dos productos básicos del

proceso fotosintético, poder reductor y enlaces fosfato ricos en energía, se denominan conjuntamente poder asimilatorio.

En la fotosíntesis se distinguen dos fases, una luminosa, que rinde el poder asimilatorio mencionado, y otra oscura, en la que dicho poder asimilatorio se utiliza de forma directa en distintos procesos del metabolismo celular. Entre éstos, el universalmente reconocido, quizás por ser cuantitativamente el más importante, es la fijación fotosintética del CO_2 , durante la cual el anhídrido carbónico es reducido hasta el nivel de carbohidrato con la participación de poder reductor y de enlaces fosfato ricos en energía (Bassham, 1971). Sin embargo, existen otros muchos procesos que, sin duda, también utilizan de forma directa el poder asimilatorio generado fotosintéticamente (Anderson, 1981). Entre ellos se encuentran la reducción de nitrato a amonio y la síntesis de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato, reacciones que requieren poder reductor, así como el proceso de asimilación de sulfato, que requiere tanto poder reductor como ATP. La participación directa del poder asimilatorio fotosintético en otros procesos, entre los que se encuentra la reducción del nitrato a nitrito, es, sin embargo, una cuestión controvertida.

En el Esquema 1 se resume la relación existente entre la generación fotosintética del Poder Asimilatorio y su utilización en diversas reacciones metabólicas en tejidos verdes.



Esquema 1. Utilización del Poder Asimilatorio generado en las reacciones luminosas de la fotosíntesis en distintos procesos metabólicos que constituyen las reacciones oscuras de la fotosíntesis. Se destaca el papel del Poder Asimilatorio fotosintético en la asimilación de las formas oxidadas de los elementos biogénicos fundamentales.

1.2.- LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos cuya presencia sobre la Tierra data de hace 2 a 3 x 10⁹ años (Brock, 1973). Estos organismos presentan la peculiaridad de que en una estructura celular precariótica contienen un aparato fotosintético capaz de utilizar el agua como donador de electrones, siendo similar, por tanto, al de las algas eucarióticas y plantas superiores (Wolk, 1973, 1981; Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Desde un punto de vista nutricional, las cianobacterias son organismos fundamentalmente fotolitoautótrofos (Whittenbury, 1978). Aunque algunas estirpes son facultativas y pueden crecer heterotróficamente en la oscuridad, Anacystis nidulans, la especie que se ha utilizado en este trabajo, pertenece al amplio grupo de fotoautótrofas estrictas (Kratz y Myers, 1955).

Cuando las cianobacterias se cultivan autotróficamente, la fijación del anhídrido carbónico tiene lugar fundamentalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Pelroy y Bassham, 1972; Ihlenfeldt y Gibson, 1975), con una posible contribución de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (Jansz y MacLean, 1973; Colman et al., 1976; Döhler, 1976; Peschek, 1979).

Dos aspectos a resaltar en el metabolismo intermedio de las cianobacterias son el papel prioritario del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato en el catabolismo de azúcares

(Pelroy et al., 1972) y la existencia de un ciclo del ácido cítrico incompleto, debido a la ausencia de actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa en estos microorganismos (Smith et al., 1967).

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos tipos fundamentales de cianobacterias: las unicelulares y las filamentosas (Rippka et al., 1979). En estas últimas las células se presentan formando tricomas. Anacystis nidulans es una cianobacteria unicelular típica.

1.3.- EL NITROGENO

El nitrógeno es uno de los elementos cualitativa y cuantitativamente más importantes de la materia viva, en la que se encuentra como componente de algunas de las biomoléculas más representativas, tales como son las proteínas y los ácidos nucleicos. Se ha calculado que la biomasa total almacenada sobre la tierra es de alrededor de 2×10^{12} Tm, de las cuales el nitrógeno representa sobre un 5% (10^{11} Tm). Cada año se incorporan a material orgánico alrededor de 10^{10} Tm de nitrógeno. La mayor parte de esta asimilación tiene lugar a partir de nitrato, con una contribución de la fijación de dinitrógeno de unas 2×10^8 Tm de N y un valor incierto de asimilación directa a partir de amonio (Lieth y Whittaker, 1975; Losada et al., 1981).

Con excepción de los animales, la utilización del nitrato como fuente nitrogenada se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de organismos, siendo realizada tanto por algas y plantas superiores como por distintos géneros de hongos y bacterias.

Aunque algunas cianobacterias pueden fijar dinitrógeno, las fuentes de nitrógeno más comúnmente usadas por estas células son el nitrato y el amonio, siendo destacable la amplia distribución de la capacidad de reducción del nitrato en este grupo de organismos (Wolk, 1981). La cianobacteria Anacystis nidulans puede usar para su crecimiento tanto nitrato como amonio, pero no dinitrógeno (Kratz y Myers, 1955).

El nitrógeno presente en los compuestos nitrogenados orgánicos se encuentra en su estado de máxima reducción, teniendo que encontrarse este elemento reducido a nivel de amonio para poder combinarse con compuestos carbonados y formar así los distintos compuestos nitrogenados de las células.

1.4.- LA ASIMILACION DEL NITRATO EN MICROORGANISMOS

En organismos unicelulares carentes de grandes vacuolas donde puedan almacenarse iones, como es el caso de Anacystis nidulans, se pueden distinguir tres fases fundamentales en la asimilación del nitrato: la entrada del nitrato al interior de la célula; la reducción del nitrato hasta el término de amonio; y la incorporación del amonio a esqueletos carbonados para dar lugar, a continuación, a los diversos compuestos orgánicos nitrogenados de la célula.

1.4.1.- Transporte al interior de la célula

Los estudios publicados sobre el paso de entrada del nitrato al interior de la célula en microorganismos son muy escasos (véase Losada et al., 1981) y, en el caso concreto de cianobacterias, virtualmente inexistentes.

Esta falta de datos sobre el transporte se debe, sin duda, a la dificultad existente para estudiar de forma aislada esta etapa de la ruta de asimilación del nitrato. En la mayoría de los microorganismos que asimilan nitrato, éste es rápidamente reducido tras su entrada en la célula. Las medidas de desaparición del nutriente del medio corresponden, por lo tanto, no sólo a su entrada en la célula sino también a su metabolización intracelular.

Por otra parte, la determinación del nitrato intracelular se encuentra dificultada porque la concentración de nitrato que se puede alcanzar en la célula es limitada, como consecuencia de la rápida reducción intracelular del mismo, aunque pueda llegar a ser mayor que su concentración en el medio externo. Dada la baja sensibilidad de los métodos de medir nitrato usualmente disponibles, las determinaciones del nitrato acumulado en las células se encuentran faltas de fiabilidad. En consecuencia, sólo se podría estudiar aisladamente el transporte de nitrato al interior de la célula en dos situaciones experimentales en particular: en microorganismos con vacuolas de almacenamiento, en los que puede tener lugar una notable acumulación de nitrato al margen del funcionamiento del sistema reductor, o, para cualquier tipo de microorganismos, cuando se dispusiese del isótopo radiactivo N^{13} , cuya vida media es de aproximadamente 10 min, el cual puede ser detectado con gran sensibilidad. En ambos casos los estudios se podrían optimizar bloqueando la reducción del nitrato.

Se ha descrito, con apoyo experimental sólido, la participación de sistemas de transporte activo en la entrada del nitrato al interior de la célula en diatomeas (Eppley y Rogers, 1970; Cresswell y Syrett, 1979), en Neurospora (Schloemer y Garrett, 1974), y en las bacterias Pseudomonas fluorescens (Betlach et al., 1981) y Klebsiella pneumoniae (Thayer y Huffaker, 1982). En todos estos casos se ha podido estudiar la concentración de nitrato en el interior celular, gracias a la acumula-

ción que eran capaces de llevar a cabo los organismos o, en los estudios con bacterias, a la disponibilidad del trazador N^{13} .

1.4.2.- Reducción hasta amonio

La diferencia existente entre los estados de reducción que presenta el nitrógeno en el nitrato (+ 5) y en el amonio (- 3) implica la necesidad de una transferencia de 8 electrones para la conversión de nitrato en amonio, la cual ocurre en sólo dos etapas: a) reducción de nitrato a nitrito, catalizada por la enzima nitrato reductasa, y b) reducción de nitrito a amonio, mediada por la nitrito reductasa, en reacciones que implican 2 y 6 electrones respectivamente (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979; Guerrero et al., 1981; Losada et al., 1981).

Tanto la reducción del nitrato como la reducción del nitrito se han estudiado ampliamente a los niveles subcelular y enzimático en los más diversos tipos de organismos, habiéndose caracterizado las propiedades moleculares de las enzimas del sistema reductor del nitrato y la naturaleza de sus donadores fisiológicos de electrones, que difieren notablemente según el material biológico estudiado (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979; Guerrero et al., 1981; Losada et al., 1981).

La nitrato reductasa de la cianobacteria A. nidulans es una molibdo proteína de 75 kdaltons en cuya actividad catalítica participa el molibdeno, pudiendo encontrarse implicados, además, átomos de hierro no hemínico (Candau, 1979). La nitrito reductasa se ha aislado de varias cianobacterias, entre las que se encuentra A. nidulans. En todos los casos se trata de una proteína de alrededor de 55 kdaltons (Hattori y Uesugi, 1968; Manzano, 1977; Méndez y Vega, 1981). La enzima parece contener como grupos prostéticos un cromóforo hemínico y una agrupación sulfoférrica (Méndez y Vega, 1981).

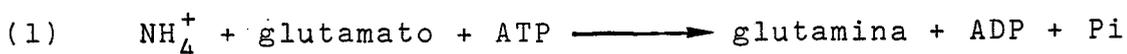
La nitrato reductasa y la nitrito reductasa utilizan como donador fisiológico de electrones a la ferredoxina reducida, tanto en cianobacterias unicelulares, como A. nidulans (Manzano et al., 1976, 1978; Candau et al., 1980), como en cianobacterias filamentosas (Ortega et al., 1976; Méndez et al., 1981). En el caso de Anacystis se ha demostrado que la flavodoxina puede sustituir a la ferredoxina como donador de electrones, tanto para la reducción del nitrato como del nitrito (Manzano, 1977; Candau, 1979).

Especial mención merece el hecho de que en A. nidulans las dos enzimas del sistema reductor del nitrato se encuentren asociadas estructural y funcionalmente a membranas con actividad fotosintética (Guerrero et al., 1974a; Manzano et al., 1976). Se han aislado a partir de A. nidulans preparaciones membranosas subcelulares (tilacoides) capaces de catalizar la reducción

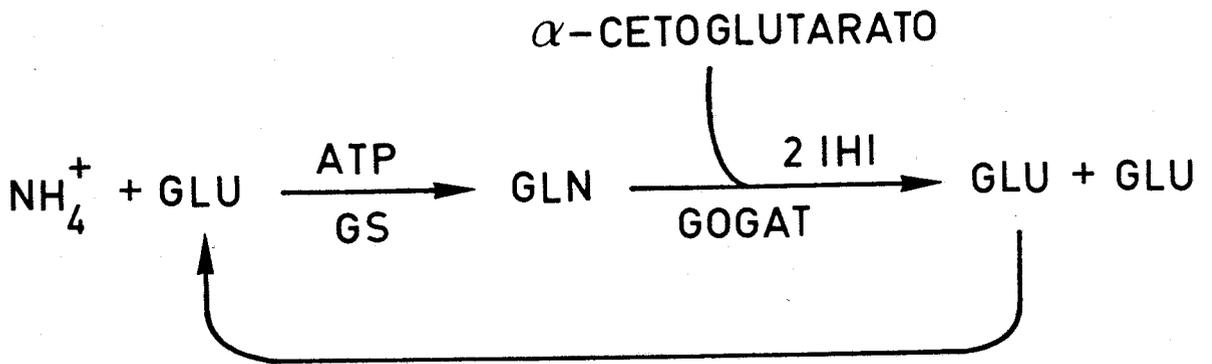
de nitrato hasta amonio utilizando agua como fuente última de electrones, en un proceso que representa, quizás, el ejemplo más simple de fotosíntesis que se ha descrito (Candau et al., 1976). En otras cianobacterias, como Anabaena 7119, mientras que la nitrato reductasa se presenta también como una enzima unida a membranas (Ortega et al., 1976), la nitrito reductasa parece ser una enzima soluble (Méndez et al., 1981).

1.4.3.- Incorporación del amonio a esqueletos carbonados

Aparte de otras reacciones menores, existen fundamentalmente dos rutas mediante las que el amonio puede incorporarse a esqueletos carbonados. Una de ellas implica una sola reacción enzimática y consiste en la reducción aminativa del α -cetoglutarato, que cataliza la enzima glutamato deshidrogenasa (Tyler, 1978; Lea y Mifflin, 1979). La otra ruta, que se resume en el Esquema 2, implica dos reacciones en serie y consiste, en esencia, en la utilización de glutamina, sintetizada en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa (1), como donador de nitrógeno al α -cetoglutarato para sintetizar glutamato en la reacción catalizada por la glutamato sintasa (2) (Tempest et al., 1970; véase Tyler, 1978, y Lea y Mifflin, 1979):



El resultado neto del funcionamiento de esta ruta es el mismo



Esquema 2. La ruta glutamina sintetasa (GS)- glutamato sintasa (GOGAT) para la incorporación del amonio a esqueletos carbonados. Nótese el caracter cíclico de la misma en lo referente al glutamato, sustrato y producto de las reacciones catalizadas por GS y GOGAT, respectivamente.

que el de la glutamato deshidrogenasa en lo que se refiere a incorporación de nitrógeno en un esqueleto carbonado (síntesis de una molécula de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato) y a consumo de poder reductor (gasto de dos equivalentes de reducción por cada molécula neta de glutamato formada). Sin embargo, la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa hace un gasto extra de un enlace fosfato rico en energía por cada molécula de glutamato sintetizada. Este hecho debe estar relacionado con la mayor efectividad de esta ruta, en comparación con la glutamato deshidrogenasa, en la incorporación del amonio a esqueletos carbonados (Lea y Mifflin, 1979).

Existen varios grupos de bacterias en los que la ruta mediante la que tiene lugar la asimilación del amonio, glutamato deshidrogenasa o glutamina sintetasa/glutamato sintasa, depende de las condiciones de cultivo (véase Tyler, 1978). Sin embargo, para organismos fototrofos se ha propuesto que, en general, la ruta funcional en la asimilación del amonio es la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (véase Lea y Mifflin, 1979), teniendo la glutamato deshidrogenasa, cuando se encuentra presente, un papel catabólico dentro del metabolismo celular.

En la mayor parte de las cianobacterias en las que se ha estudiado, se ha demostrado concluyentemente que la ruta principal que es operativa en la asimilación de amonio, independientemente de las condiciones de cultivo, es la glutamina sintetasa/ glutamato sintasa. Los acercamientos experimentales utilizados incluyen análisis de los primeros productos celulares formados tras

suministrar a las células el isótopo radiactivo N^{13} , llevado a cabo por el grupo de C.P.Wolk (Wolk et al., 1976; Meeks et al., 1977, 1978); la identificación de la enzima característica de esta ruta, la glutamato sintasa, en extractos de cianobacterias (Lea y Mifflin, 1975; Meeks et al., 1977; Thomas et al., 1977); y estudios del efecto de inhibidores de las enzimas de la ruta sobre la asimilación del amonio (Stewart y Rowell, 1975; Rowell et al., 1977). Anacystis nidulans, la especie utilizada en este trabajo, es precisamente la única cianobacteria de las estudiadas en la que hay desacuerdo en torno a cuál es la ruta principal de incorporación del amonio a esqueletos carbonados (véase Stewart, 1980).

1.5.- ESTUDIOS FISIOLÓGICOS DE LA ASIMILACION DEL NITRATO

Los puntos básicos alrededor de los que han girado las investigaciones fisiológicas sobre la asimilación del nitrato han sido, por un lado, el papel del CO_2 en la utilización del nitrato y la relación entre el sistema reductor del nitrato y la generación fotosintética de poder reductor (véase Losada et al., 1981), y, por otra parte, la regulación por amonio de la asimilación del nitrato (véase Guerrero et al., 1981).

Los primeros estudios de reducción de nitrato in vivo datan de 1920, cuando Warburg y Negelein describieron el desprendimiento de oxígeno por suspensiones de Chlorella expuestas a la luz e incubadas en presencia de nitrato. Dado que estas mismas células desprendían CO_2 en la oscuridad en presencia de nitrato, los autores interpretaron que el desprendimiento de oxígeno era debido a la fotólisis del CO_2 producido en la reducción oscura de nitrato a expensas de carbohidratos celulares. Van Niel, tras introducir el nuevo concepto de fotosíntesis, interpretó los resultados de Warburg y Negelein en términos de la actuación del nitrato como un reactivo de Hill natural. Esta interpretación se encontraba apoyada por la existencia de un desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato en suspensiones de células de Chlorella expuestas a la luz en presencia de concentraciones saturantes de CO_2 (van Niel et al., 1953).

La existencia de una relación entre asimilación de nitrato y fotosíntesis se ha visto confirmada por varias descrip-

ciones de desprendimiento de oxígeno asociado a la asimilación del nitrato en distintas especies de algas (Cramer y Myers, 1949; Davis, 1953; Bongers, 1958; Larsson, 1980) y en la cianobacteria filamentosa Anabaena cylindrica (Hattori, 1962). La utilización del nitrato es, además, un proceso que generalmente se estimula por la luz en organismos fototrofos (Hattori, 1962; Grant y Turner, 1969; Thacker y Syrett, 1972; Stevens y Van Baalen, 1973; Ullrich-Eberius, 1973; Tischner y Lorenzen, 1979; Calero et al., 1980; véase Ullrich, 1982). Este es un hecho que puede estar relacionado, además de con el suministro de poder reductor para la reducción del nitrato, con el suministro de energía para el transporte de este sustrato al interior de la célula.

Se plantea la cuestión de cuán íntima es la relación existente entre el sistema reductor del nitrato y la generación fotosintética de poder asimilatorio. En los experimentos clásicos que se han discutido más arriba no se solían hacer estimaciones del nitrato consumido por las células, pero, cuando se hicieron, sólo en contadas ocasiones se observó la estequiometría teórica de desprendimiento de oxígeno asociado a asimilación de nitrato esperada si los 8 electrones necesarios para reducir el nitrato a amonio fueran de origen fotosintético (Bongers, 1958; Grant y Turner, 1969). Por otra parte, en algas verdes, mientras que el nitrito provoca una notable amortiguación de la fluorescencia de la clorofila, el nitrato no lo hace (Kessler y Zumft, 1973; Kulandaivelu et al., 1976). Se conside-

ra que estos datos apoyan la idea de que, en algas verdes, mientras que la reducción del nitrito hasta amonio es una reacción íntimamente ligada a fotosíntesis, la reducción del nitrato a nitrito es una reacción algo más alejada. De hecho, mientras que la nitrito reductasa usa ferredoxina reducida como donador de electrones, la nitrato reductasa de estos organismos utiliza piridín nucleótidos reducidos (Guerrero et al., 1981; Losada et al., 1981).

La situación en cianobacterias puede ser distinta, ya que ambas enzimas del sistema de reducción del nitrato utilizan ferredoxina como sustrato. En favor de la idea de que en este grupo de organismos la reducción del nitrato in vivo sea un proceso íntimamente ligado a fotosíntesis, se encuentra la observación de que en cianobacterias filamentosas (sometidas a un tratamiento ligero de sonicación) la adición de nitrato provoca una amortiguación en la fluorescencia de la clorofila (Serrano et al., 1981).

En el marco del apoyo experimental para su noción del mecanismo de la fotosíntesis, Warburg describió el hecho de que suspensiones de células de Chlorella incubadas a la luz en presencia de nitrato no desprendían oxígeno en condiciones de ausencia total de CO₂ (Warburg et al., 1965). Ya dentro del esquema de las nociones actuales sobre fotosíntesis, esta observación ha sido verificada por numerosos autores, en algunos casos en condiciones peculiares (Davis, 1953; Kessler, 1955; Grant y Turner, 1969; Thacker y Syrett, 1972; Eisele y Ullrich, 1977). El

requerimiento de CO_2 para la asimilación del nitrato fué interpretado por Kessler (1955) en términos de que el poder reductor necesario para la reducción del nitrato ha de ser suministrado por carbohidratos resultantes de la fijación fotosintética del CO_2 . Este autor observó, además, que la reducción del nitrito, a diferencia de la del nitrato, tenía lugar en ausencia de CO_2 en suspensiones de células de Ankistrodesmus (Kessler, 1955). Otros autores han sugerido que el papel del CO_2 en la utilización del nitrato en algas verdes puede interpretarse en base a un efecto protector del CO_2 sobre el sistema de transporte del nitrato (Eisele y Ullrich, 1977).

En la cianobacteria filamentosa Anabaena cylindrica (Hattori, 1962) se ha descrito una apreciable estimulación por CO_2 del consumo de nitrato, efecto que era menos pronunciado sobre la utilización del nitrito. El CO_2 parecía tener, sin embargo, poco efecto sobre la reducción del nitrato en la cianobacteria unicelular Agmenellum quadruplicatum (Stevens y Van Baalen, 1973).

El amonio se comporta como un notable antagonista de la asimilación del nitrato en prácticamente todos los tipos de organismos. Un hecho muy bien documentado es la represión de la síntesis de las enzimas del sistema reductor del nitrato (Guerrero et al., 1981; Losada et al., 1981), que también tiene lugar en Anacystis nidulans (Manzano et al., 1976; Herrero et al., 1981). Se ha descrito, además, que el amonio provoca una inactivación reversible de la nitrato reductasa en algas (Guerrero

et al., 1981; Losada et al., 1981).

Entre los efectos del amonio que se han observado sobre el metabolismo del nitrato se encuentra una rápida inhibición del consumo de nitrato causada por la presencia de bajas concentraciones de amonio en el medio. Este efecto se ha descrito, entre otras especies, en diferentes estirpes de Chlorella (Cramer y Myers, 1949; Syrett y Morris, 1963; Pistorius et al., 1978; Tischner y Lorenzen, 1979), en Chlamydomonas reinhardtii (Thacker y Syrett, 1972; Syrett y Leftley, 1976), y en la cianobacteria Anabaena cylindrica (Ohmori et al., 1977). El mecanismo mediante el cual tiene lugar este efecto inhibitor del amonio no se conoce. Cabe destacar, sin embargo, dos propuestas de Syrett al respecto, quien ha estudiado la inhibición por amonio de la utilización del nitrato en diversas algas eucarióticas. Este autor, por un lado, ha sugerido que el efecto inhibitor del amonio puede estar mediado por productos de su asimilación (Syrett y Morris, 1963), y, por otro lado, ha demostrado que la rápida inhibición por amonio de la utilización del nitrato en Phaeodactylum tricornutum opera a nivel de transporte del nitrato al interior de la célula (Cresswell y Syrett, 1979).

En este trabajo se presentan una serie de investigaciones sobre el proceso de la utilización del nitrato en la cianobacteria unicelular Anacystis nidulans, incluyéndose con fines complementarios estudios sobre el consumo de nitrito y de amonio. En primer lugar se describe la naturaleza de las distintas etapas de dicho proceso. Cabe destacar la íntima relación que

existe entre la asimilación del nitrato y la generación fotosintética de poder reductor en este microorganismo. La otra parte del trabajo se centra sobre el mecanismo de regulación de la asimilación del nitrato. El transporte de nitrato al interior de la célula parece estar modulado por un sistema de regulación que incluye productos de la asimilación del amonio y que integra los procesos de asimilación de nitrógeno y carbono (fijación de CO_2).

Parte de este trabajo ha sido ya publicado (Flores et al., 1980, 1982a) o se encuentra en vías de publicación (Flores et al., 1982b), habiendo sido también objeto de comunicaciones a Reuniones y Congresos (Flores et al., 1978a, 1978b; Flores y Guerrero, 1979a, 1979b, 1980; Guerrero y Flores, 1980; Ramos et al., 1980; Flores, 1981; Flores et al., 1981; Herrero et al., 1981b).

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Este trabajo se ha llevado a cabo utilizando como material biológico la cianobacteria Anacystis nidulans, estirpe L 1402-1. Las muestras originales de este organismo se obtuvieron de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Göttingen (R.F.A.).

El organismo se cultivaba fotoautotróficamente en condiciones axénicas en un medio sintético que contenía los siguientes nutrientes por litro de agua destilada: NO_3K , 20 mmol; SO_4Mg , 0,5 mmol; Cl_2Ca , 0,1 mmol; ClNa , 2 mmol; MoO_4Na_2 , 4 μmol ; PO_4HK_2 , 12 mmol; CO_3HNa , 10 mmol; 1 ml de una disolución de SO_4Fe 0,5 M y EDTA 0,5 M, preparada según Arnon et al., (1974); y 1 ml de una disolución de micronutrientes que contenía por litro de agua destilada: BO_3H_3 , 46 mmol; Cl_2Mn , 9 mmol; SO_4Zn , 0,77 mmol; y SO_4Cu , 0,32 mmol. El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes, excepto fosfato y bicarbonato, se esterilizaba en autoclave, durante 20 min, a la presión de 2 atm (121°C). La disolución conteniendo fosfato y bicarbonato se esterilizaba por separado en las mismas condiciones y se añadía a la que contenía el resto del medio de cultivo, una vez enfriada a temperatura ambiente.

Un volumen de 35 ml de este medio, contenido en un tubo de 23 mm de diametro por 200 mm de largo tapado con algodón grueso, se inoculaba en condiciones asépticas con aproximadamente 2 a 5 μl de células (15 a 30 μg de clorofila a). Esta suspensión celular se incubaba en un baño termostatzado a 40°C, con ilumi-

nación continua (25 W/m^2 , luz blanca) proporcionada por lámparas fluorescentes. A través de la suspensión celular se burbujeaba aire esteril enriquecido con CO_2 aproximadamente al 5% (v/v), lo que proporcionaba agitación al cultivo además de la fuente de carbono. En estas condiciones la masa celular inoculada se duplicaba en unas 4 h.

Todos los experimentos presentados en este trabajo se hicieron con células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, ya que las células cultivadas con amonio no presentan actividad de consumo de nitrato, excepto la serie de experimentos presentada en el apartado 3.4, que se realizó con células cultivadas con amonio ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 10 mM en el medio de cultivo, en lugar del NO_3K). En este último caso, sin embargo, se obtuvieron resultados similares a los aquí presentados cuando se utilizaron células cultivadas con nitrato.

2.2.- RECOGIDA DE CELULAS

Para los distintos experimentos se utilizaron células procedentes de cultivos conteniendo alrededor de 5 μ l de células por ml de medio. Las células se recogieron por centrifugación a baja velocidad (1500-2000 g durante 5-10 min) a temperatura ambiente, o por filtración al vacío empleando filtros Millipore tipo HA de 0,45 μ m de diámetro de poro. El procedimiento de filtración es especialmente útil cuando se desea lavar exhaustivamente las células.

2.3.- ESTIMACION DE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

En el curso de este trabajo se han determinado los niveles celulares de las enzimas nitrato reductasa y glutamina sintetasa. Debido a la necesidad de estimar dichos niveles inmediatamente después de exponer las células de Anacystis a distintas situaciones experimentales, las actividades enzimáticas citadas se determinaron in situ. Además de otras virtudes, los ensayos de actividad in situ tienen la ventaja, sobre los ensayos de actividad con extractos de células, de que la preparación de las células para las determinaciones in situ puede hacerse de forma mucho más rápida que la preparación de los extractos. La peculiaridad de la determinación de una actividad enzimática in situ consiste esencialmente en la utilización como material biológico, en el ensayo standard de la actividad enzimática en cuestión, de células cuyas membranas se han hecho permeables a sustancias de bajo peso molecular.

2.3.1.- Permeabilización de las membranas celulares

Las membranas celulares se hacían permeables a los componentes de las mezclas de reacción para el ensayo de las actividades enzimáticas por tratamiento con tolueno o con etanol. El tratamiento con tolueno consistía en mezclar mediante agitación vigorosa, durante 2 min, tolueno (20 μ l) con una suspensión celu

lar (1 ml) conteniendo de 1 a 2 μ l de células por ml de tampón o de medio de cultivo. Una alícuota de la suspensión celular tratada con tolueno se utilizaba, poco después de la permeabilización, directamente en el ensayo de la actividad enzimática correspondiente.

La permeabilización con etanol consistía en un tratamiento de las células con etanol al 75% (A. Herrero, Tesis Doctoral, en prep.). Se mezclaba un volumen de suspensión celular con tres volúmenes de etanol absoluto y, tras agitación vigorosa durante 5-10 s, la suspensión de células en etanol-agua se filtraba rápidamente, lavándose exhaustivamente con agua, a continuación, sobre el mismo filtro. Las células se mantenían en el filtro hasta ser resuspendidas en tampón Tricina-NaOH justo antes de utilizarlas en el ensayo de la actividad enzimática, que podía realizarse sin que se observasen cambios significativos de los niveles de actividad hasta una hora después de la permeabilización.

2.3.2.- Nitrato reductasa

Para estimar el nivel celular de actividad nitrato reductasa se añadía una alícuota de la suspensión de células permeabilizadas a la mezcla de reacción para la determinación de esta actividad enzimática. Esta mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml (Manzano, 1977): tampón $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$, pH 10,5, 100 μ mol; NO_3K , 20 μ mol; metil viológeno, 4 μ mol; y

10 μmol de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ añadido en 0,1 ml de CO_3HNa 0,3 M. La mezcla de reacción se incubaba a 30°C , durante 5 min, y la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa. Tras la adición de 0,1 ml de SO_4Zn 1 M y de 0,1 ml de NaOH 1 N, la mezcla de reacción se centrifugaba a 1500-2000 g durante 5 min, procediéndose a la determinación del nitrito formado durante la reacción en una alícuota del sobrenadante. Los valores de nitrito encontrados se corregían para el nitrito presente en un control en el que la alícuota de suspensión de células se añadía a la mezcla de reacción tras la oxidación de ditionito. Una unidad de actividad enzimática corresponde a un μmol de nitrito formado por min.

2.3.3.- Glutamina sintetasa (actividad transferasa)

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). El ensayo se llevaba a cabo con 0,5-1 μl de células permeabilizadas en una mezcla de reacción que contenía en 1 ml de volumen final: tampón Hepes, pH 7,3, 50 μmol ; L-Glutamina, 30 μmol ; Cl_2Mn , 3 μmol ; ADP, 0,4 μmol ; AsO_4HNa_2 , 20 μmol ; y 0,1 ml de una mezcla de un volumen de clorhidrato de hidroxilamina 1,2 M con un volumen de NaOH 1,2 M, preparada un momento antes de comenzar la reacción. La mezcla de reacción se incubaba a 30°C durante 10 min, con agitación ocasional, y la reacción se paraba por adición de 2 ml de una disolución de Cl_3Fe en medio ácido, que es

el reactivo revelador del γ -glutamil hidroxamato, producto de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa. Los valores de γ -glutamil hidroxamato formado en la reacción enzimática se determinaban espectrofotométricamente en los sobrenadantes resultantes de centrifugar a baja velocidad la mezcla de reacción suplementada con el reactivo revelador, y se corregían para la cantidad de hidroxamatos que se encontraba en un control al que no se añadía la mezcla hidroxilamina-NaOH. Una unidad de actividad enzimática corresponde a un μmol de γ -glutamil hidroxamato formado por min.

2.4.- ESTIMACION DE ACTIVIDADES FOTOSINTETICAS

Se han determinado distintas actividades fotosintéticas en células intactas de A.nidulans, utilizando como aceptores de electrones tanto reactivos de Hill naturales (CO_2 , nitrato o nitrato) como oxidantes artificiales (p-benzoquinona o metil viológeno).

2.4.1.- Desprendimiento de oxígeno asociado a la fijación de CO_2

La actividad fotosintética de fijación de CO_2 se ha determinado midiendo el desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 y luz. En las condiciones que se describen a continuación el desprendimiento de oxígeno era prácticamente nulo en la oscuridad o en ausencia de bicarbonato añadido o de CO_2 en la fase gaseosa. Las velocidades de fijación de CO_2 pueden calcularse a partir de las estimaciones de desprendimiento de oxígeno, de acuerdo con la estequiometría de 1 mol de oxígeno desprendido por mol de CO_2 asimilado (véase por ejemplo Miller y Colman, 1980). El desprendimiento de oxígeno se determinó mediante técnicas manométricas o polarográficas.

Las determinaciones manométricas de actividad fotosintética se llevaban a cabo utilizando vasijas de Warburg calibradas, con volumen total aproximado de 14 a 15 ml, acopladas a los correspondientes manómetros. En el compartimento principal de estas vasijas se disponía la suspensión celular, que contenía

2,75 a 5 μ l de células en 2,75 ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo). En el pocillo central se disponía un papel de filtro (1 cm de ancho por 10 cm de largo) doblado e impregnado con 0,25 ml de tampón $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,5 M, pH 9,6. Este tampón debe determinar una concentración de CO_2 disuelto en la suspensión celular de aproximadamente 0,2 mM (véase Guerrero et al., 1974b). Estos ensayos de actividad fotosintética se desarrollaban con agitación continua a 40°C, y se iniciaban encendiendo la luz (100 W/m², luz blanca) tras 15 min de incubación a la temperatura citada, en la oscuridad, con los manómetros cerrados para homogeneizar la temperatura y permitir que se alcanzase el equilibrio entre la tensión de CO_2 en el tampón del pocillo central y en la fase gaseosa y entre la de ésta y la de la suspensión celular. La reacción se seguía durante diversos períodos de tiempo, usualmente entre 30 y 60 min.

Las determinaciones polarográficas de actividad fotosintética dependiente de CO_2 se llevaban a cabo con un electrodo de oxígeno de tipo Clark (véase Relimpio et al., 1977). En la cámara termostatzada del electrodo de oxígeno se disponían 3 ml de suspensión conteniendo entre 1 y 3 μ l de células en tampón de ensayo suplementado con la concentración de CO_3HNa que se indica en cada experimento particular. Al valor de pH empleado (8,3), la concentración de CO_2 disuelto es aproximadamente la centésima parte de la concentración de bicarbonato añadido. Los experimentos se llevaban a cabo con agitación continua a 40°C y se iniciaban encendiendo la fuente de luz (la lámpara de un pro-

vector de diapositivas, que proporcionaba luz blanca de 200 W/m² de intensidad sobre la superficie de la cámara del electrodo), tras 5 min de incubación de la suspensión celular en la cámara para homogeneizar la temperatura. Los cambios en la concentración de oxígeno en la suspensión se seguían durante 5-10 min.

2.4.2.- Desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato y de nitrito

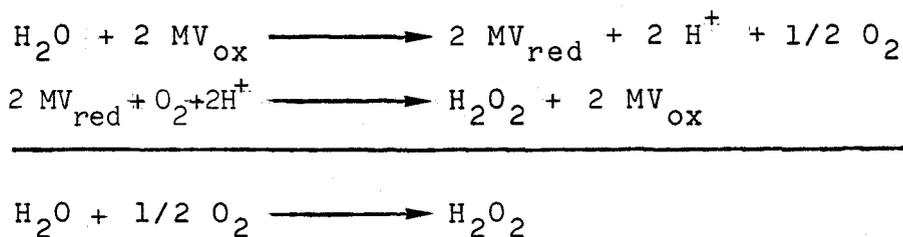
Como se indica en la sección de Resultados, los procesos de reducción del nitrato y del nitrito en A.nidulans tienen naturaleza fotosintética. En este apartado se presenta el método utilizado para la determinación de estos procesos fotosintéticos según la medida de su desprendimiento de oxígeno asociado.

Cuando las determinaciones del desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato o nitrito se llevaban a cabo en condiciones de fijación simultánea de CO₂, los experimentos se realizaban en vasijas de Warburg en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, pero con los tampones en los que se suspendían las células suplementados con NO₃K o con NO₂K (concentración final, 0,5-1 mM). La diferencia entre el oxígeno desprendido por suspensiones suplementadas con los sustratos nitrogenados y suspensiones control sin suplementar constituye el oxígeno desprendido asociado a la asimilación de dichos sustratos.

El desprendimiento de oxígeno asociado al consumo de nitrato o de nitrito en condiciones de ausencia de cualquier otro aceptor de electrones se ha podido estudiar empleando células tratadas con MSX (véase apartado 3.2.2.). En estas condiciones todo el oxígeno desprendido por las células corresponde a las actividades fotosintéticas de reducción de nitrato y nitrito. El método empleado consistía en la utilización de vasijas de Warburg conteniendo en el pocillo central un papel de filtro (1 cm de ancho por 10 cm de largo), doblado e impregnado con 0,25 ml de KOH al 20% (p/v), disolución fuertemente alcalina que atrapa CO_2 mediante su conversión en carbonato. En el compartimento principal se disponía la suspensión celular: 2,75 a 5 μl de células en 2,65 ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo) suplementado con MSX 1 mM. En el brazo lateral de la vasija se disponían 0,1 ml de NO_3K o NO_2K , a concentración 20 mM. La vasija se incubaba con agitación continua a 40°C , con los manómetros cerrados, durante 15 min en oscuridad, encendiéndose la luz (100 W/m^2 , luz blanca) a continuación. Tras un período de incubación de 30 min en estas condiciones, durante el cual se aseguraba la acción del MSX y se agotaban los aceptores fotosintéticos endógenos presentes, se iniciaba la reacción añadiendo el contenido del brazo lateral al compartimento principal. Inmediatamente comenzaba el desprendimiento de oxígeno, que se seguía durante un período de 30-60 min.

2.4.3.- Absorción de oxígeno dependiente de metil viológeno

El metil viológeno oxidado puede actuar como aceptor de electrones en la cadena de transporte fotosintética a nivel de Fotosistema I (Hauska, 1977). El metil viológeno es, por tanto, reducido por los electrones procedentes de la fotólisis del agua, siendo a continuación oxidado por el oxígeno molecular en una reacción que origina, como producto, peróxido de hidrógeno. Este último se descompone, dando agua y oxígeno, en una reacción catalizada por la enzima catalasa, presente en Anacystis. Si la catalasa se inactiva con alguno de sus inhibidores característicos, como cianuro o azida, el peróxido de hidrógeno no se descompone y las células intactas de A.nidulans, incubadas a la luz en presencia de metil viológeno, manifiestan un notable consumo de oxígeno, de acuerdo con las siguientes reacciones:



La medida de la absorción de oxígeno en estas condiciones, reacción de Mehler dependiente de metil viológeno (Chua, 1971), constituye una estimación de la actividad fotosintética de las células, que incluye la actividad de los Fotosistemas I y II y de los transportadores de electrones que actúan entre ambos Fotosistemas.

Las determinaciones de actividad fotosintética según la reacción de Mehler se llevaban a cabo midiendo el oxígeno polaro

gráficamente. En la cámara termostatzada del electrodo de oxígeno se disponían 3 ml de suspensión conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo) suplementado con CNK 1 mM y metil viológeno 2 mM. Tras 2 min de incubación, la reacción se iniciaba encendiendo la fuente de luz (ver 4.2.) y se desarrollaba durante 2-5 min. Los experimentos se llevaban a cabo a 40°C.

2.4.4.- Reducción de ferricianuro dependiente de p-benzoquinona

La p-benzoquinona oxidada es un aceptor de electrones en la cadena de transporte fotosintética, que actúa a nivel del "pool" de plastoquinonas (Hauska, 1977). Por su parte, la p-benzoquinona reducida actúa como donador de electrones al ferricianuro. Mientras que el ferricianuro no atraviesa las membranas celulares, la p-benzoquinona lo hace fácilmente (Clendenning y Ehrmantrant, 1950). Como consecuencia de estos hechos, cuando se incuban células intactas de A.nidulans en presencia de ferricianuro y de una concentración catalítica de p-benzoquinona, se observa una notable reducción de ferricianuro a ferrocianuro en respuesta a la iluminación de la suspensión celular (Saha et al., 1971). Dada la localización del "pool" de plastoquinonas en la cadena fotosintética de transporte de electrones, la medida de desaparición de ferricianuro del medio, por su reducción a ferrocianuro, constituye una estimación de la actividad del Fotosistema II de las células.

Las determinaciones de la actividad del Fotosistema II por este método se llevaban a cabo en erlenmeyers de 25 ó 50 ml de capacidad abiertos al aire, que se incubaban en un baño con iluminación (100 W/m^2 , luz blanca), a 40°C . En los erlenmeyers se disponían 5 ó 10 ml de una suspensión conteniendo alrededor de 1 μl de células por ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo) suplementado con ferricianuro 2 mM. La reacción se iniciaba por adición de p-benzoquinona disuelta en etanol absoluto (concentración final de p-benzoquinona, 0,2 mM, y de etanol, 0,2-0,3%). El ensayo se desarrollaba con agitación continua durante aproximadamente 10 min, siendo retiradas varias muestras de 1 ó 2 ml a distintos intervalos durante este período de tiempo. Las muestras se filtraban inmediatamente al vacío a través de filtros Millipore tipo HA de 0,45 μm de diámetro de poro, con lo que se detenía la reacción al quedar separadas las células del medio. La concentración de ferricianuro presente en el medio filtrado se determinaba espectrofotométricamente una vez concluido el experimento.

2.5.- ESTIMACION DEL CONSUMO DE LOS IONES NITROGENADOS INORGANICOS

La utilización de nitrato, nitrito y amonio por células de A.nidulans se determinó siguiendo la desaparición de estos sustratos del medio en el que estaban suspendidas las células. Los experimentos se llevaban a cabo en erlenmeyers abiertos al aire o en vasijas de Warburg cerradas, en las que se mantenía una concentración específica de CO_2 en la fase gaseosa.

Se utilizaron erlenmeyers de 25, 50 ó 100 ml, según el volumen total de suspensión celular empleado en el experimento correspondiente. En los erlenmeyers se disponían entre 5 y 30 ml de una suspensión conteniendo entre 1 y 2,5 μl de células por ml de, generalmente, tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo). La utilización de un medio distinto en la suspensión celular se indica en el caso concreto correspondiente. En ocasiones, el tampón se suplementaba con CO_3HNa 10 mM con objeto de favorecer la fijación de CO_2 por las células. Para seguir el consumo del sustrato correspondiente, la suspensión celular se suplementaba con NO_3K , NO_2K o ClNH_4 , a concentración final usualmente entre 0,2 y 0,5 mM. El experimento se iniciaba encendiendo la luz o añadiendo el sustrato o, en algunos casos, las células, y se desarrollaba durante 15-30 min. Las incubaciones se hacían con agitación continua en un baño termostatzado, a 40°C , iluminado (100 W/m^2 , luz blanca) por su parte inferior. La reacción se seguía mediante la determinación del sustrato remanente en el medio libre de células, en distintas muestras tomadas sucesi-

vamente durante la incubación. La muestra, usualmente de 2 ml, se filtraba al vacío, inmediatamente después de ser tomada, a través de filtros Millipore tipo HA de 0,45 μm de diámetro de poro. La concentración de nitrato, de nitrito o de amonio en los filtrados se determinaba al concluir el experimento.

Los experimentos llevados a cabo en vasijas de Warburg se hicieron de forma similar a los descritos previamente para las determinaciones manométricas de actividades fotosintéticas (véase 2.4.1. y 2.4.2.). En el compartimento principal se disponía la suspensión celular, que se suplementaba con el sustrato correspondiente (NO_3K , NO_2K ó ClNH_4) usualmente a concentración final 0,73 mM. En el pocillo central se disponía un papel de filtro impregnado con 0,25 ml de KOH al 20% ó de tampón $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,5 M, pH 9,6. La incubación se realizaba con iluminación y agitación continua, a 40°C, durante 30-60 min, y al finalizar la misma una alícuota del contenido del compartimento principal de la vasija se filtraba o se centrifugaba, determinándose en el filtrado o en el sobrenadante la concentración de sustrato remanente.

En la mayoría de los experimentos llevados a cabo en presencia de algún inhibidor, las células se incubaban en presencia del inhibidor durante un período de tiempo determinado antes de la adición del sustrato. Salvo que se indique lo contrario, estas incubaciones se hacían en las mismas condiciones que los ensayos de consumo, es decir, a 40°C y con iluminación. Aunque normalmente el inhibidor se mantenía presente durante el ensayo

de utilización del sustrato en cuestión, a veces los ensayos de consumo se llevaban a cabo en un medio sin suplementar con ningún inhibidor, con células tratadas previamente con un inhibidor. En estos casos, que se especifican cuando se presentan en la sección de Resultados, las células se recogían por filtración después de la incubación con el inhibidor y se lavaban exhaustivamente con agua destilada o con tampón de ensayo antes de usarse en el ensayo de consumo correspondiente.

Los inhibidores FCCP, DCCD y DCMU se añadían disueltos en etanol absoluto. El volumen añadido era tal que la concentración final de etanol en el ensayo no excedía del 0,4%, concentración que no tiene un efecto negativo significativo sobre las actividades de las células intactas que se han ensayado.

Las células tratadas con MSX se han empleado frecuentemente en las distintas fases de este trabajo. La inactivación de la glutamina sintetasa celular se alcanzaba incubando durante 10-15 min, a la luz y a 40°C, una suspensión conteniendo 1-2 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3, suplementado con MSX a concentración 1 mM. Estas células, en las que el nivel de glutamina sintetasa era indetectable durante al menos 30 min después de ser retirado el inhibidor, y durante un tiempo mucho más largo si el MSX se mantenía en la suspensión celular, eran especialmente adecuadas para estudios de consumo de nitrato o nitrito por dos razones: en ellas el transporte y reducción de estos dos sustratos tienen lugar sin las interferencias resultantes de la incorporación del amonio a compuestos orgánicos y, por

otra parte, al ser liberado al medio en cantidades estequiométricas el amonio resultante de la reducción del nitrato y del nitrito, el consumo de estos sustratos por las células se puede estimar siguiendo la aparición de amonio, dependiente de nitrato o de nitrito, en el medio externo. En estos casos, en los filtrados de las muestras tomadas de la suspensión celular, se determinaba, además de o en lugar de el nitrato o el nitrito, la concentración de amonio.

2.6.- ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE AMONIO A PARTIR DE AMINO- ACIDOS

La generación de amonio a partir de ciertos aminoácidos tenía lugar con células de A.nidulans cultivadas tanto con nitrato como con amonio. Debido al hecho de que la acción del MSX se ve dificultada por la presencia de aminoácidos en el medio, tanto en los experimentos de producción de amonio dependiente de aminoácidos como en otros experimentos en los que se estudiaba la acción de aminoácidos sobre algún proceso llevado a cabo por células tratadas con MSX, se utilizaban células incubadas en presencia del MSX previamente a la adición de los aminoácidos.

Una suspensión conteniendo 2 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 25 mM, pH 8,3, suplementado con MSX 1 mM, se incubaba con agitación continua durante 15 min, a 40°C y a la luz (100 W/m², luz blanca), en erlenmeyers abiertos al aire. Tras esto, las células se recogían, se lavaban y se utilizaban en el ensayo de producción de amonio. Salvo que se indique lo contrario, los ensayos se llevaban a cabo con un volumen total de 5 ml de mezcla de reacción contenida en erlenmeyers de 25 ml abiertos al aire, que se incubaban con agitación continua, a 40°C con iluminación ambiental. La mezcla de reacción consistía en una disolución de aminoácido en tampón Tricina 25 mM, pH 8,3 (tampón de ensayo), y el ensayo se iniciaba por adición de una alícuota de una preparación de células tratadas con MSX, suspendidas en el mismo tampón de ensayo. La reacción se desarrollaba durante 15 min, y el amonio presente en el medio externo se esti

maba en alícuotas de la suspensión celular, tras retirar rápidamente las células por filtración. Los valores obtenidos se corregían para la cantidad de amonio presente en la suspensión celular a tiempo cero.

Los ensayos desarrollados en condiciones anaeróbicas se llevaban a cabo en tubos de 10 ml cerrados con tapones de goma (Becton-Dickinson Vacutainer). El ensayo se empezaba resuspendiendo las células, presentes dentro del tubo adheridas a un filtro Millipore, en la mezcla de reacción, también contenida en el tubo, tras tres ciclos de evacuación de aire y llenado con argon.

2.7.- EXTRACCION DE METABOLITOS CELULARES

Las determinaciones de los niveles celulares de glutamato y glutamina se llevaron a cabo en extractos celulares obtenidos por tratamiento con ácido perclórico. Con objeto de evitar cualquier cambio en el contenido celular de los metabolitos que pudiera tener lugar durante el proceso de recogida de las células, estas se mataban instantáneamente por adición de ácido perclórico (0,6 N, concentración final) a las suspensiones celulares objeto de estudio. Tras una incubación de 10 min a 0°C, con agitación ocasional, las muestras se centrifugaban en frío durante 10-15 min a 40.000 g. Los sobrenadantes, que contenían los materiales intracelulares solubles de bajo peso molecular, se neutralizaban a 0°C con KOH. Los precipitados de ClO_4K formados se retiraban por centrifugación en frío (10.000 g durante 10 min). Dependiendo de la concentración de células en la suspensión celular sometida a extracción, los extractos neutralizados se utilizaban directamente para la determinación de los metabolitos o se sometían a liofilización. En este último caso, el material liofilizado se resuspendía en un pequeño volumen de agua, para ser utilizado a continuación en la determinación de metabolitos.

Cuando los extractos celulares se obtuvieron por tratamiento con etanol, los niveles celulares de glutamina y glutamato encontrados fueron similares a los obtenidos en la extracción ácida. El tratamiento con etanol consistía en la adición de etanol absoluto a la suspensión celular para alcanzar una concentración final de etanol del 68%. Tras 24 h de extracción en frío,

las mezclas se centrifugaban para retirar los materiales celulares insolubles, siendo secado en un rotavapor el sobrenadante resultante de la centrifugación. El material seco se resuspendía en un pequeño volumen de agua, utilizándose a continuación en la determinación de los metabolitos.

2.8.- METODOS ANALITICOS

2.8.1.- Determinación de nitrato

El nitrato se determinó por absorbancia a 210 nm en disolución ácida (Cawse, 1967). Un volumen de 1,5 ml de muestra conteniendo entre 0 y 250 nmol de nitrato se suplementaba con 0,1 ml de ácido amido-sulfúrico al 10% (p/v). Tras incubar unos 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 0,4 ml de ácido perclórico al 20% (p/p). La concentración de nitrato se estimaba midiendo la absorbancia de la disolución a 210 nm, empleando un coeficiente de extinción $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 7,4$. El tratamiento con ácido amido-sulfúrico eliminaba cualquier pequeña cantidad de nitrito presente en la disolución, el cual absorbe también la luz ultravioleta en medio ácido.

2.8.2.- Determinación de nitrito

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). A 1 ml de muestra conteniendo entre 0 y 30 nmol de nitrito se le añadía 1 ml de una disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH 2,4 N y 1 ml de una disolución de N-(1-Naftil)etilendiamina diclorhidrato al 0,02% (p/v) en agua. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se determinaba espectrofotométricamente la concentración de complejo coloreado utilizando un

coeficiente de extinción a 540 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 55$.

2.8.3.- Determinación de amonio

El amonio se determinó enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de este último (Bergmeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón trietanolamina, pH 8,6, 100 μmol ; α -cetoglutarato, 10 μmol ; ADP, 1,2 μmol ; NADPH, 0,2-0,25 μmol ; y una alícuota de muestra conteniendo entre 0 y 80 nmol de amonio. La reacción se iniciaba por adición de 20 μl de una preparación de glutamato deshidrogenasa de muy bajo contenido en amonio (7-10 unidades de enzima) y se desarrollaba durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción, antes y después de desarrollarse esta, se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 340 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 6,2$. Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido se corregían con blancos a los que no se añadía amonio.

2.8.4.- Determinaciones de desprendimiento o absorción de oxígeno

Las determinaciones de oxígeno se llevaron a cabo como ya se ha descrito (apartado 2.4.1.) utilizando un aparato de

Warburg Braun Melsungen modelo V166 o un electrodo de oxígeno Rank Bross del tipo Clark con registrador incorporado Servoscribe ls. A 40°C, $\alpha_{O_2} = 0,0231$.

2.8.5.- Determinación de glutamato

El glutamato se determinó enzimáticamente midiendo la reducción de NAD^+ catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de oxidación desaminativa del glutamato, con cantidades limitantes de éste (Bergmeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1,25 ml: tampón glicina-hidrazina, pH 9, 375 y 300 μmol , respectivamente; ADP, 1,25 μmol ; NAD^+ , 2 μmol ; y una alícuota de muestra conteniendo entre 0 y 100 nmol de glutamato. La reacción se iniciaba por adición de 20 μl de una preparación de glutamato deshidrogenasa (7-10 U) y se desarrollaba a temperatura ambiente hasta que cesaba el aumento en la concentración de la forma reducida del piridín nucleótido, lo que ocurría tras unos 45 min de reacción. La concentración de NADH se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 340 nm $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 6,2$. Los valores de reducción de NAD^+ en presencia de glutamato añadido se corregían con blancos a los que no se añadía glutamato.

2.8.6.- Determinación de glutamina

La glutamina se determinaba como glutamato tras hidrólisis ácida de las preparaciones. Los extractos se incubaban en presencia de SO_4H_2 2N durante 90 min a 100°C . La concentración de glutamina se deducía de la diferencia entre la concentración de glutamato presente en preparaciones sometidas y preparaciones sin someter a hidrólisis ácida.

2.8.7.- Cromatografía en papel de aminoácidos

Al objeto de separar los aminoácidos presentes en extractos celulares, alícuotas de los correspondientes extractos, que contenían alrededor de 10 nmol de glutamato, se sometían a cromatografía ascendente sobre papel Whatman nº 1 de 25 cm x 25 cm, utilizándose como eluyente una disolución de fenol al 80% (p/v) en agua. Paralelamente se sometían a cromatografía disoluciones patrón de aminoácidos. Tras 6-8 h de desarrollo, los papeles se secaban y se trataban con reactivo de ninhidrina para visualizar los aminoácidos. Los papeles se empapaban con el reactivo por inmersión rápida en una disolución de ninhidrina al 0,2% (p/v) en acetona. Tras calentar a $80-100^\circ\text{C}$ durante 5 min se hacían visibles las posiciones de los aminoácidos sobre el cromatograma.

2.8.8.- Determinación de γ -glutamyl-hidroxamato

El γ -glutamyl-hidroxamato formado en el ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinó por reacción con Cl_3Fe en medio ácido (Shapiro y Stadtman, 1970). A 1 ml de disolución conteniendo γ -glutamyl-hidroxamato se le añadían 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido, que incluía en 1 litro de volumen final: ClH (37%, p/p), 7,73 ml; ácido tricloroacético (20%, p/p), 60,24 ml; y $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 33,33 g. La concentración del producto coloreado formado se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mM}} = 3$.

2.8.9.- Determinación de ferricianuro

La concentración de ferricianuro presente en el medio libre de células (ver apartado 2.4.4.) se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 420 nm $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mM}} = 0,9$.

2.8.10.- Determinación del volumen de células empaquetadas

El volumen de células empaquetadas se determinaba por centrifugación de alícuotas (de hasta 5 ml) de la suspensión celular en tubos hematocritos graduados. Tras establecer la existencia de la correspondencia entre los valores de concentración

celular y turbidez, el volumen de células empaquetadas por ml de medio se estimaba a partir de la turbidez de la suspensión celular. Como medida de la turbidez se tomaba la absorbancia de la suspensión a 750 nm. La relación entre la absorbancia a 750 nm y la concentración de células en la suspensión celular era lineal hasta un valor de absorbancia de aproximadamente 0,2, equivalente a 0,2 μ l de células por ml. Un μ l de células empaquetadas contenía 5-8 μ g de clorofila a y 150-175 μ g de proteína.

2.8.11.- Determinación de clorofila

El contenido celular en clorofila a se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos de las células (Mackinney, 1941). Las células contenidas en un volumen de usualmente 3 ml de suspensión celular se recogían por centrifugación, resuspendiéndose a continuación en 2 a 5 ml de metanol. Tras agitación vigorosa, la preparación se centrifugaba, procediéndose a continuación a determinar la concentración de clorofila en el sobrenadante, utilizándose un coeficiente de extinción a 665 nm

$$E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mg/ml}} = 74,46.$$

2.8.12.- Determinación de proteína

El contenido celular de proteína se estimaba en células tratadas con ácido tricloroacético. Un volumen de 1 ml de suspensión celular se suplementaba con ácido tricloroacético

hasta una concentración final del 11% (p/v). Tras incubar durante 10 min a 0°C, la preparación se centrifugaba (1.500-2.000 g, durante 10 min), descartándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendía en ácido tricloroacético al 11% (p/v), repitiéndose la misma operación. El nuevo sedimento era finalmente resuspendido en agua (1 ml), utilizándose una alícuota de esta preparación como muestra para la determinación de proteína, que se llevaba a cabo por el método de Lowry, según la modificación de Bailey (1967), empleando seroalbúmina bovina como patrón.

2.8.13.- Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron empleando un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1750 UV dotado de salida digital. Las cinéticas enzimáticas y los espectros de absorción se siguieron en un registrador acoplado al espectrofotómetro.

2.8.14.- Medidas del pH

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

2.8.15.- Medidas de intensidades de iluminación

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

2.8.16.- Medidas de flujos gaseosos

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

2.9.- REACTIVOS

ADP, aminoxiacetato, L-canavanina, L-glutamato deshidrogenasa (tipo II, de hígado de vaca), hidroxilisina, Hepes, Mops, MSX, NAD^+ , ninhidrina y Tricina eran productos de Sigma Chemical Co., St. Louis (U.S.A.). FCCP y NADPH eran productos de Boehringer, Mannheim (R.F.A.) y azaserina, DCMU y metil viológeno de Serva, Heidelberg (R.F.A.). Todos los demás productos usados procedían de Merck, Darmstadt (R.F.A.), o de Sigma, St. Louis (U.S.A.).

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA. Los gases utilizados, anhídrido carbónico y argón, eran de alta pureza y fueron suministrados por la S.E.O.

3.- RESULTADOS

3.1.- LA ASIMILACION DEL NITRATO EN Anacystis nidulans

En este apartado se aporta una serie de datos experimentales obtenidos en el estudio del mecanismo de la asimilación del nitrato en A.nidulans, proceso en virtud del cual el nitrógeno nítrico que se encuentra presente en el medio extracelular llega a formar parte de compuestos orgánicos nitrogenados en el interior de la célula. Tras una presentación de las propiedades del sistema en su conjunto, se procede a la descripción del mecanismo mediante el cual tiene lugar, in vivo, cada una de las etapas implicadas en la asimilación del nitrato: la entrada del sustrato al interior de la célula, su reducción hasta amonio y, finalmente, la incorporación de éste en esqueletos carbonados para formar los primeros compuestos orgánicos nitrogenados. Paralelamente, se presentan algunos hechos relevantes de la asimilación del nitrito y del amonio por las células de Anacystis cultivadas en nitrato.

3.1.1.- Utilización de nitrato, nitrito y amonio

Con el objeto fundamental de caracterizar las propiedades del sistema de asimilación de nitrato en A.nidulans, se ha puesto a punto un método para estimar la utilización del sustrato nitrogenado por las células. Las características fundamentales del método, cuyo procedimiento experimental se detalla en la sección de Materiales y Métodos, pueden resumirse como sigue. El consumo de nitrato se valora siguiendo su desaparición

del medio extracelular en suspensiones de A.nidulans, conteniendo de 1 a 2,5 μl de células por ml de tampón tricina-NaOH de pH 8,1-8,3, incubadas a 40°C en vasijas abiertas al aire y expuestas a la luz. En estas condiciones, y para una concentración inicial de sustrato de 0,1-0,5 mM, las células manifiestan actividades de consumo de nitrato del orden de 1,5-3,0 nmol/ μl células .min. Como ya se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos y como se verá más adelante, para estos estudios se han empleado, además de las células normales, células tratadas con MSX. Estas células manifiestan capacidades de consumo de nitrato, que puede estimarse como desaparición de éste o como aparición de amonio en el medio, del orden de 6-8 nmol/ μl células.min.

El método que se acaba de describir es válido también para medir el consumo de nitrito y de amonio. En análogas condiciones, el consumo de nitrito por células normales de A.nidulans cultivadas en nitrato es de alrededor de 3 nmol/ μl células.min (los valores son de 10-11 nmol/ μl células.min para células tratadas con MSX), mientras que el de amonio es de alrededor de 4 nmol/ μl células.min. Las células tratadas con MSX tienen drásticamente reducida su capacidad de consumo de amonio.

3.1.1.1.- Caracterización del consumo de iones inorgánicos nitrógenados

En la Figura 1 se presenta el efecto de la temperatura sobre la velocidad de utilización del nitrato en A.nidulans, pu

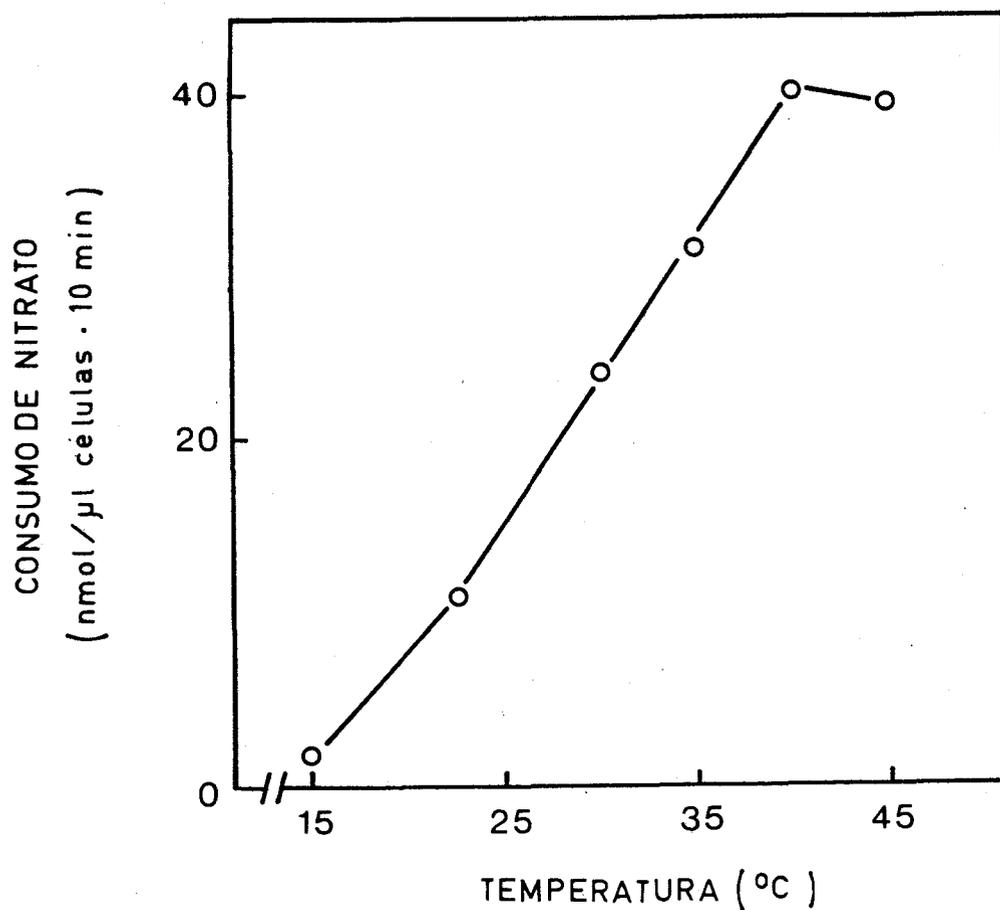


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre el consumo de nitrato por Anacystis nidulans

Las células (2,95 μl por ml de tampón de ensayo) se incubaron a la temperatura indicada, a la luz, desde 5 min antes de la adición de NO_3K a concentración 0,133 mM (tiempo cero).

diéndose observar que la temperatura óptima para el proceso es de 40°C, la cual se corresponde con la óptima para el crecimiento de esta cianobacteria. La Figura 2 muestra la capacidad de consumo de nitrato de Anacystis en función del pH del medio. El proceso se encuentra muy favorecido a pH alcalino, en el intervalo de pH entre 9,0 y 10,0 (a pH 10,8 la velocidad de consumo de nitrato es solamente un 10% inferior a la velocidad máxima, véase apartado 3.2.2.). A pesar de que el óptimo de pH para el consumo de nitrato sea superior a pH 9,0, en los estudios que se presentan en este trabajo se han utilizado tampones de pH 8,1-8,3, siguiendo el criterio de mantener una similitud con las condiciones de crecimiento del microorganismo. En estas condiciones, la velocidad del proceso es de aproximadamente un 70% de la que se alcanza a pH 9,5.

La iluminación de la suspensión celular (Tabla 1) y la presencia de CO₂ (Tabla 2) son requerimientos muy estrictos para el consumo de nitrato en A.nidulans. Más adelante se presentan estudios detallados sobre ambos requerimientos. En la Tabla 1 se muestra también la notable dependencia de la luz que manifiestan los procesos de consumo de nitrito y de amonio. Aunque la presencia de CO₂ en el medio es también un requerimiento absoluto para el consumo de amonio, no lo es para el de nitrito (Tabla 2), cuyo consumo se inhibe sólo en forma parcial por la ausencia de CO₂ (una posible interpretación para este hecho se presenta en el apartado 3.2.2.).

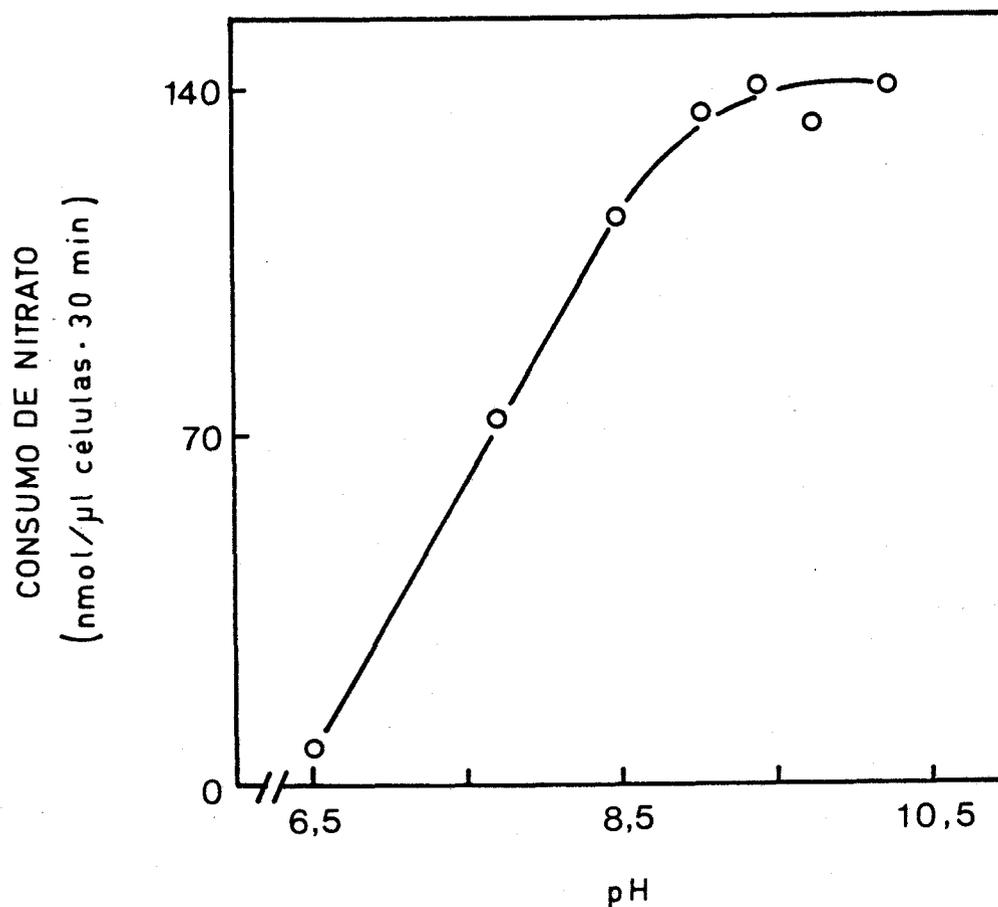


Figura 2. Efecto del pH del medio sobre el consumo de nitrato por A.nidulans

Se utilizaron suspensiones conteniendo 2 μ l de células por ml de tampón MOPS (3 mM)/tricina (3 mM)/glicina (3 mM), ajustado al pH correspondiente con NaOH. El experimento se inició por adición de NO_3K 0,4 mM, concentración final).

Tabla 1. Efecto de la luz sobre el consumo de nitrato, nitrito y amonio por Anacystis nidulans

Sustrato	Sustrato consumido (nmol/ μ l células)	
	Luz	Oscuridad
Nitrato	50	0
Nitrito	99	16
Amonio	78	22

Los datos corresponden a sustrato consumido en 20 min. Los sustratos se añadieron como NO_3K , NO_2K o ClNH_4 , a concentración 0,4 mM.

Tabla 2. Efecto del CO_2 sobre el consumo de nitrato, nitrito y amonio por A. nidulans

Sustrato	Sustrato consumido (nmol/ μl células)	
	+ CO_2	- CO_2
Nitrato	176	0
Nitrito	193	46*
Amonio	181	0

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg, con atmósfera libre de CO_2 (KOH al 20% en el pocillo central) o con una tensión de CO_2 determinante de una concentración 0,2 mM de CO_2 en la suspensión celular (tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6, en el pocillo central). Los datos corresponden a las cantidades de sustrato consumidas en 30 min. Los sustratos se añadieron como NO_3K , NO_2K o ClNH_4 a concentración 0,4 mM.

* En el medio extracelular se encontró una acumulación de amonio equivalente a 45 nmol/ μl células.

Finalmente, se ha estudiado también la capacidad de consumo de nitrato, nitrito y amonio por A.nidulans en suspensiones celulares que contenían mezclas de dos de los sustratos citados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, donde se incluyen también, para su comparación, datos del consumo de cada ión en suspensiones celulares que contenían sólo uno de los sustratos. La capacidad de las células para consumir nitrógeno inorgánico parece ser bastante constante e independiente de la naturaleza del sustrato nitrogenado que se les suministre. En el caso de las combinaciones de sustratos nitrato/nitrito y nitrito/amonio la asimilación total de nitrógeno es la resultante del consumo conjunto de ambos sustratos, mientras que en el caso de la combinación nitrato/amonio toda la asimilación de nitrógeno corresponde a consumo de amonio, sin que se detecte consumo alguno de nitrato. Estos resultados indican la existencia de una capacidad limitada de asimilación de N en las células de A.nidulans.

3.1.1.2.- El consumo implica la metabolización intracelular de los sustratos

Como ya se ha comentado, la utilización de los sustratos nitrogenados se estima siguiendo su desaparición del medio en suspensiones de células de A.nidulans. Una cuestión que se plantea es si el sustrato desaparecido del medio es simplemente tomado por la célula y acumulado en su interior o si, por el contrario, el consumo, tal y como se estima en este trabajo, impli

Tabla 3. Consumo de nitrato, nitrito y amonio por suspensiones de A. nidulans conteniendo uno o dos de los iones nitrogenados sustratos

Sustrato	Sustrato consumido (nmol/ μ l células)			
	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	N total
Nitrato	85	-	-	85
Nitrito	-	75	-	75
Amonio	-	-	81	81
Nitrato, nitrito	26	49	-	75
Nitrito, amonio	-	47	37	84
Nitrato, amonio	0	-	84	84

Los sustratos se añadieron como NO_3K , NO_2Na o ClNH_4 a concentración 0,32 mM. Los datos corresponden al sustrato consumido en 25 min.

ca la entrada del nutriente en la célula y su posterior metabolización.

El tratamiento de las células de Anacystis con MSX resulta en una drástica inhibición de la conversión de amonio en nitrógeno orgánico (véase apartado 3.1.4.2.) En estudios de consumo de nitrato por células tratadas con MSX se encontró una acumulación de amonio en el medio de una magnitud próxima a la de nitrato desaparecido (Fig. 3). Estas células no liberaban nitrito al medio. La acumulación de amonio en el medio no se observaba en las células normales de Anacystis no tratadas con MSX. Por otra parte, en ausencia del sustrato nitrogenado las células tratadas con MSX sólo mostraban una producción basal de amonio. Estos hechos indican que el nitrato se metaboliza inmediatamente siguiendo su entrada en la célula. Esta metabolización se limita a su reducción hasta el nivel de amonio en las células tratadas con MSX, y ha de implicar la posterior incorporación del amonio resultante a esqueletos carbonados en las células normales, no tratadas.

La Figura 4 muestra que la generación de amonio por células tratadas con MSX también tiene lugar cuando el sustrato utilizado es nitrito en lugar de nitrato. Al igual que ocurría con este último nutriente, la cantidad de amonio acumulado en el medio era próxima a la de nitrito desaparecido. El nitrito tomado por las células es, por tanto, metabolizado rápidamente.

El consumo de amonio por células de Anacystis nidulans, en las condiciones usadas en este trabajo, parece implicar, además de su entrada en la célula, la metabolización del nutriente.

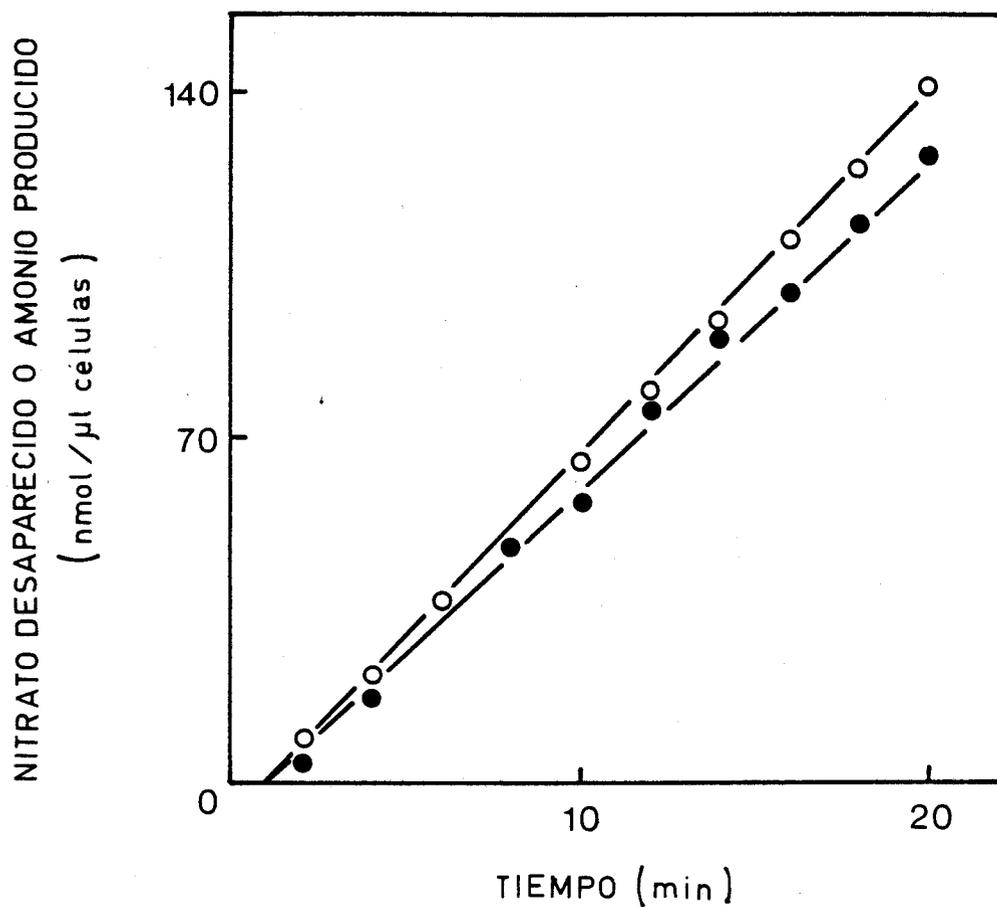


Figura 3. Producción de amonio asociada a la utilización de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX

La suspensión contenía 0,8 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado con 1 mM de MSX. El experimento se inició por adición de NO_3K (concentración final, 147 μM) tras 10 min de preincubación con MSX. (○) Nitrato; (●) amonio.

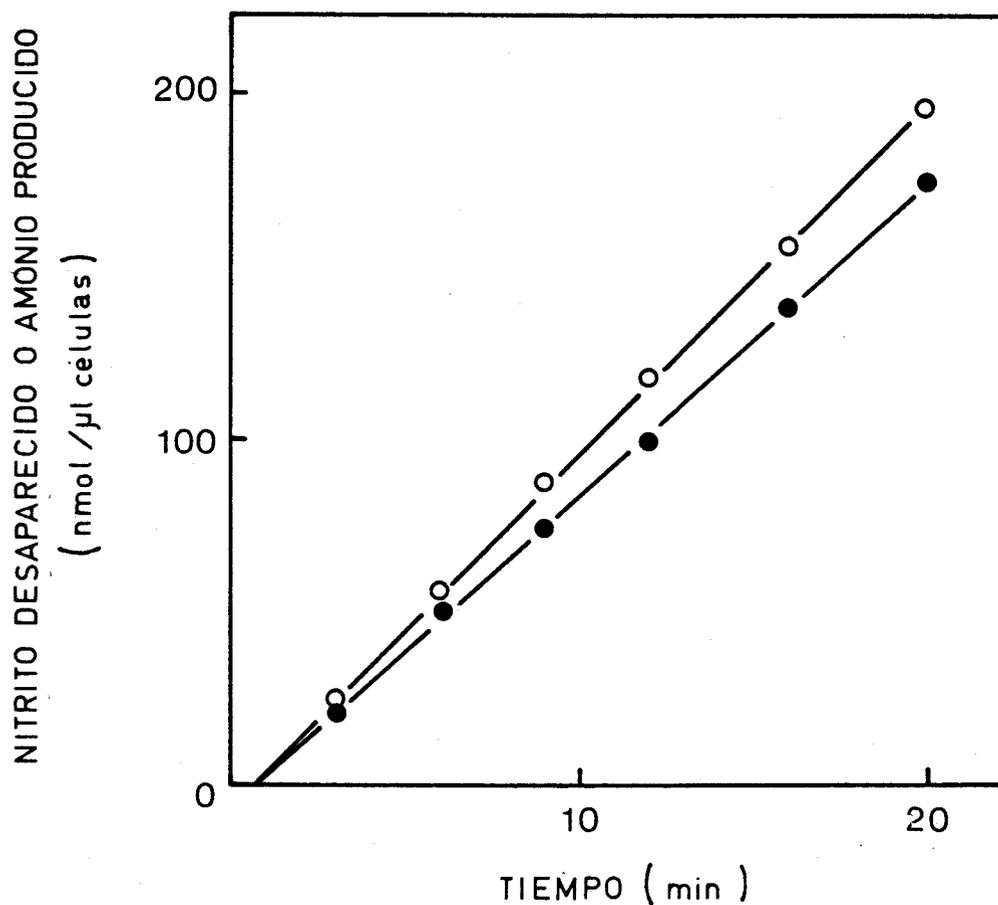


Figura 4. Producción de amonio asociada a la utilización de nitrito por células de A.nidulans tratadas con MSX

La suspensión contenía 1,05 μ l de células por ml de tampón de ensayo suplementado con 1 mM de MSX. El experimento se inició por adición de NO_2K (concentración final, 263 μM) tras 10 min de preincubación con MSX. (o) Nitrito; (●) amonio.

Dos observaciones que se detallarán más adelante son de interés a este respecto: a) la prevención de la incorporación del amonio a esqueletos carbonados mediante inhibidores de las enzimas clave implicadas, resulta en una drástica disminución de la capacidad de las células para consumir amonio (apartado 3.1.4.2.), y b) cuando se añade amonio a una suspensión celular en activo consumo de nitrato, el amonio se comienza a asimilar inmediatamente, provocándose una rápida alteración en los niveles celulares de los aminoácidos glutamato (que disminuye) y glutamina (que aumenta), lo que se explica por una incorporación del amonio catalizada por la enzima glutamina sintetasa (apartado 3.2.4.1.).

Así, la utilización de los tres sustratos nitrogenados inorgánicos que se estudian en este trabajo implica la entrada del nutriente en la célula y su inmediata metabolización. De acuerdo con esto, células cultivadas en medio con nitrato, pero conteniendo sólo niveles basales de nitrato reductasa debido a un envenenamiento con tungstato (Candau, 1979), presentan una capacidad de utilización de nitrato muy disminuída (Tabla 4). La especificidad de acción del tungstato, que afecta a la nitrato reductasa, pero no a otros factores celulares relacionados con la asimilación fotosintética de nutrientes nitrogenados, queda patente por su falta de efecto negativo sobre la capacidad de consumo de nitrito de las células (Tabla 4). La mayor actividad de utilización del nitrito por las células tratadas con tungstato en comparación con las células no tratadas

Tabla 4. Efecto de la incubación con diferentes concentraciones de tungstato sobre la actividad nitrato reductasa y sobre la capacidad de consumo de nitrato y de nitrito en A. nidulans

{WO ₄ Na} (μM)	Nitrato reductasa (mU/μl células)	Consumo de NO ₃ ⁻ (nmol/μl células·20 min)	Consumo de NO ₂ ⁻
0	23,4	63,2	54,2
10	0,7	12,5	N.D.
100	0,6	13,9	106,0

El experimento se llevó a cabo con células procedentes de un cultivo de amonio, tras incubación durante 48 h en medio de cultivo con nitrato carente de molibdato y suplementado con las concentraciones de volframato indicadas. Tras ser recogidas y lavadas, las células se utilizaron en el ensayo de consumo de los sustratos indicados, en condiciones "standard".

N.D.= no determinado.

(Tabla 4) ha de estar relacionada con el carácter de células deficientes en N de las primeras. Las células tratadas con tungstato se califican como deficientes en nitrógeno en función de su bajo contenido en ficocianinas (véase apartado 3.2.3.), y las células deficientes en N presentan actividades incrementadas de asimilación de nitrógeno (apartado 3.2.3.).

Los datos presentados en este apartado indican que la entrada del nitrato en la célula y su reducción y posterior asimilación son procesos estrechamente relacionados: la existencia de una desaparición estimable de nitrato del medio requiere la metabolización intracelular de este nutriente. Esta consideración parece ser también válida para los casos de la utilización de nitrito y de amonio.

3.1.2.- Entrada de nitrato (y de nitrito) en la célula

La velocidad de entrada del nitrato a la célula ha de ser lo suficientemente alta como para cubrir los requerimientos celulares de nitrógeno. La disyuntiva que se plantea es si el nitrato entra en la célula por simple difusión a través de la membrana plasmática (de naturaleza lipófila) o si, por el contrario, es transportado del exterior al interior celular por una permeasa. Por otra parte, y dentro de la segunda opción, la permeasa podría actuar simplemente facilitando el establecimiento del equilibrio entre concentraciones externa e interna o, en cambio, podría actuar transportando el nitrato al interior de

la célula en contra de su gradiente electroquímico, en un proceso que constituiría un transporte activo y que, por tanto, sería dependiente de energía metabólica. El transporte concentrativo es un fenómeno general para los más diversos nutrientes, que permite el mantenimiento de un ambiente intracelular adecuado para el funcionamiento de las enzimas implicadas en su asimilación.

Existe una gran dificultad para estudiar en forma aislada la fase de entrada del nitrato al interior de la célula. Para obtener información acerca de la misma se ha utilizado un acercamiento experimental consistente en estudiar las características del consumo de nitrato en células tratadas con MSX, en las que el proceso consiste esencialmente de dos pasos: entrada del nutriente a la célula y reducción del mismo a amonio, el cual se libera al medio extracelular. La comparación de las características del consumo de nitrato en estas células con las propiedades bien conocidas del sistema reductor del nitrato en Anacystis (Manzano, 1977; Candau, 1979) puede proporcionar información acerca del paso de entrada.

Las características de la utilización del nitrato estudiadas para A.nidulans incluyen el efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre la velocidad del proceso y el requerimiento de energía metabólica del consumo de este nutriente, estimado según la sensibilidad del proceso a inhibidores del metabolismo energético.

3.1.2.1.- Participación de una permeasa en la entrada del nitrato

El estudio de la relación entre la concentración de nitrato y la velocidad de consumo de este nutriente en A.nidulans se ha llevado a cabo tanto en células normales como en células tratadas con MSX. En ambos casos se ha estudiado la velocidad del proceso en función de distintas concentraciones iniciales de nitrato (de 0,2 a 1,0 mM en células normales, Tabla 5; de 0,1 a 100 mM en células tratadas con MSX, Tabla 6), habiéndose encontrado que dentro del intervalo de concentración de 0,1 a 1,0 mM la velocidad de consumo de nitrato es prácticamente constante. Con objeto de estimar el límite inferior de concentración de nitrato hasta el cual la velocidad de su consumo se mantiene inalterada, se siguió la desaparición de una baja cantidad del nutriente hasta su agotamiento en el medio, tanto en suspensiones de células normales (Fig. 5) como de células tratadas con MSX (Fig. 6). Los resultados indican que desde el comienzo (aproximadamente 80 μ M de nitrato), la velocidad permanece constante hasta que la concentración de nitrato disminuye hasta llegar a ser del orden de 10 μ M. Esta observación se puede interpretar en términos de la participación en la utilización del nitrato de un elemento saturable con K_m para el nitrato inferior a 10 μ M. Dado que la nitrato reductasa, primera enzima implicada en el metabolismo intracelular del nitrato, tiene una K_m para su sustrato de 0,7 mM (Candau, 1979), se puede sugerir que el elemento de alta afinidad por el nitrato particici

Tabla 5. Efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre la velocidad de su consumo por células de A. nidulans

{Nitrato} (mM)	Consumo (nmol/ μ l células·5 min)
0,2	41
0,4	45
0,6	49
0,8	45
1,0	41

El nitrato se añadía como NO_3K .

Tabla 6. Efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre la velocidad de producción de amonio por células de A. nidulans tratadas con MSX

{Nitrato} (mM)	Producción de amonio (nmol/ μ l células·10 min)
0,1	57
0,2	57
0,3	57
0,5	59
1	73
2	70
5	74
10	79
20	79
50	88
100	83

Los ensayos se iniciaron por adición de NO_3K a suspensiones celulares incubadas con MSX 1 mM desde 10 min antes de la adición de dicho sustrato.

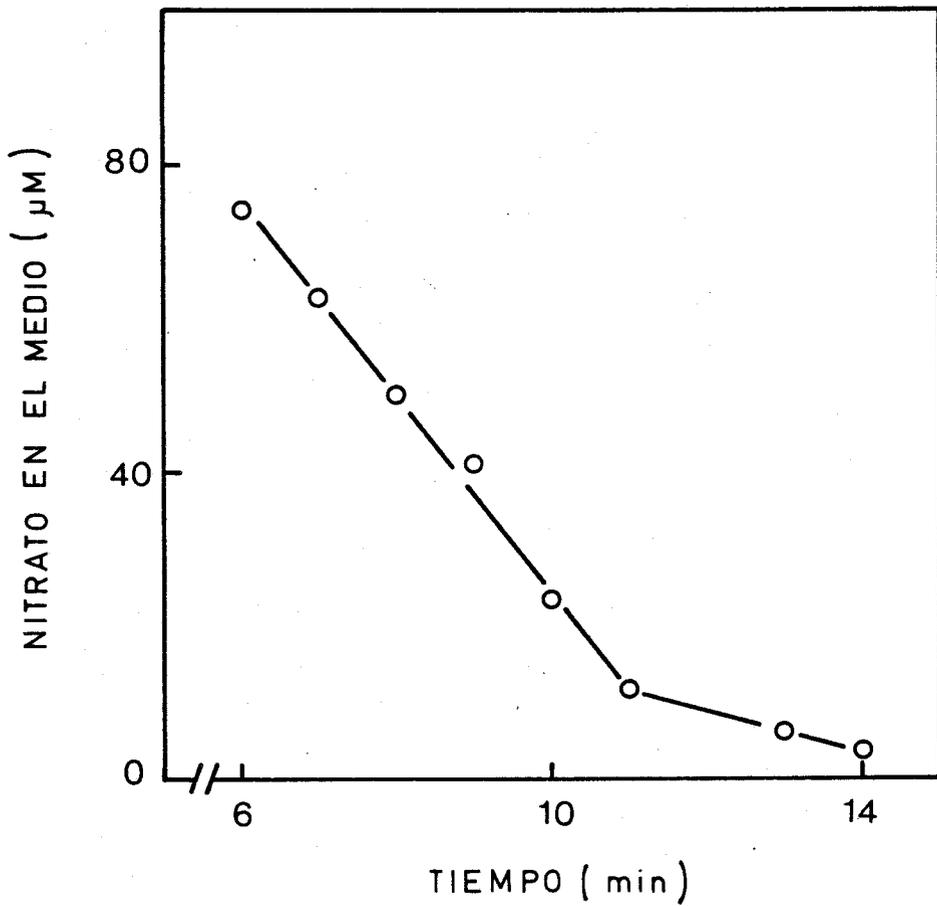


Figura 5. Cinética del consumo de nitrato por A.nidulans

La suspensión contenía 2 µl de células por ml de tampón de ensayo.
El nitrato se añadió como NO₃K.

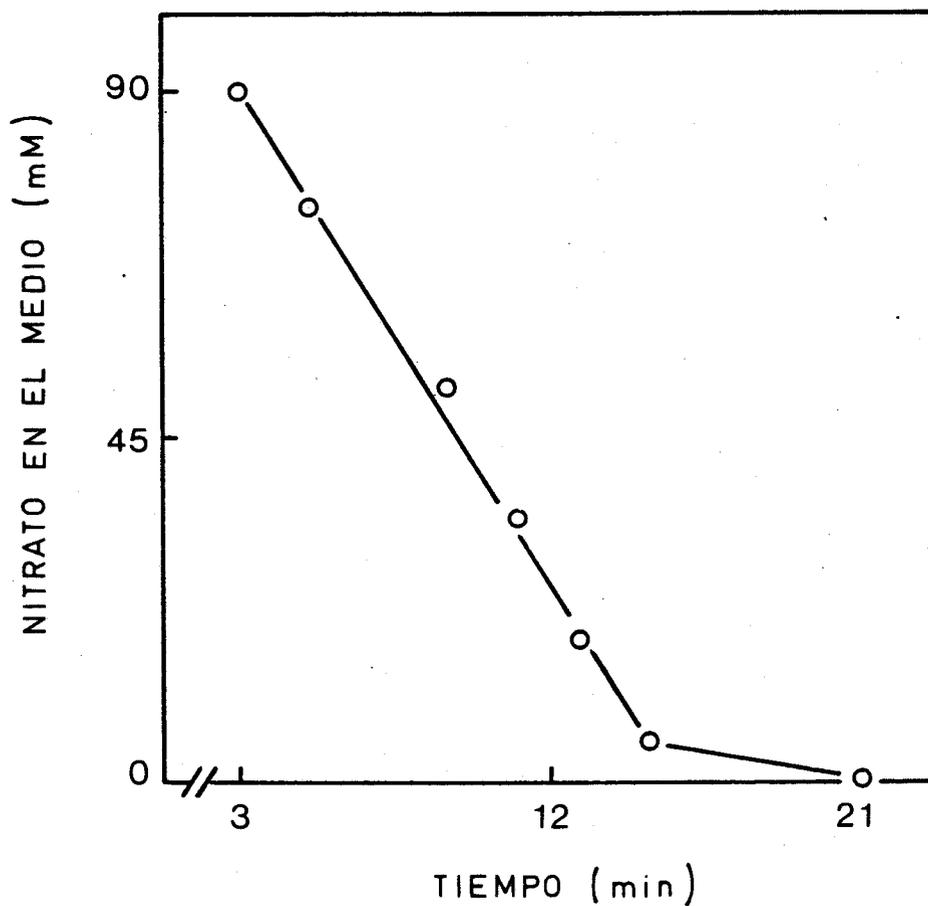


Figura 6. Cinética del consumo de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX

La suspensión celular contenía 1 μ l de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM. El nitrato se añadió como NO_3K , tras una incubación de las células de 10 min con MSX.

pa en la asimilación del nutriente antes de la fase de reducción. El hecho de que la entrada del nitrato en la célula sea un proceso saturable por el sustrato es indicativo de la participación de una permeasa en el mismo.

El aumento en la velocidad de reducción de nitrato que se registra con el incremento de la concentración extracelular del mismo por encima de 1 mM (Tabla 6) podría explicarse como una contribución al proceso de consumo de una entrada de nitrato en la célula por difusión, lo que resultaría especialmente evidente a altas concentraciones del sustrato.

3.1.2.2.- Naturaleza activa del transporte del nitrato

Para estudiar si el transporte de nitrato al interior de la célula es de carácter activo, hemos investigado su dependencia por energía metabólica mediante el uso de inhibidores de la conservación de energía. Los inhibidores metabólicos empleados han sido el FCCP, un conocido agente desacoplante (Padan et al., 1976), y el DCCD, que es un inhibidor irreversible de ATPasas (Harold et al., 1969).

Antes de aplicarlos al estudio del transporte de nitrato, investigamos el efecto de los compuestos citados en A.nidulans sobre un proceso cuya dependencia por energía metabólica es bien conocida: la fijación fotosintética de CO₂, que aquí se estima como desprendimiento de oxígeno dependiente de CO₂ y luz.

La Figura 7 muestra los valores de velocidad de desprendimiento de oxígeno encontrados en presencia de distintas concentraciones de FCCP, observándose la casi completa inhibición causada por el FCCP a concentraciones de 4 μM o mayores. La inhibición de la fijación de CO_2 tras la adición de FCCP 10 μM a la suspensión celular es inmediata (Fig. 8), mimetizando la parada del proceso que tiene lugar al interrumpir la iluminación. Por otra parte, el carácter de agente desacoplante de este compuesto queda de manifiesto por la estimulación que provoca sobre el consumo de oxígeno debido a la respiración de sustratos endógenos (Fig. 9). En esta Figura se incluyen también, a modo de comparación, los efectos de otro agente desacoplante, el DNP, que también estimula la respiración endógena, y el del cianuro, un inhibidor del transporte de electrones respiratorio que provoca una drástica, aunque no absoluta (véase también Biggins, 1969), inhibición de la respiración en Anacystis.

La presencia de DCCD a concentración 4,7 μM en la suspensión celular provocaba una inhibición total de la fijación del CO_2 . El estudio cinético del efecto del DCCD sobre el desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 (Fig. 10) muestra que este agente tarda un cierto período de tiempo en ejercer su inhibición, período que es inversamente proporcional a la concentración de DCCD. Cuando se estudia la capacidad de fijación de CO_2 de células previamente incubadas con DCCD y posteriormente lavadas, se encuentra que se conserva el efecto del inhibidor. La preincubación, durante 15 min a 40°C de una sus-

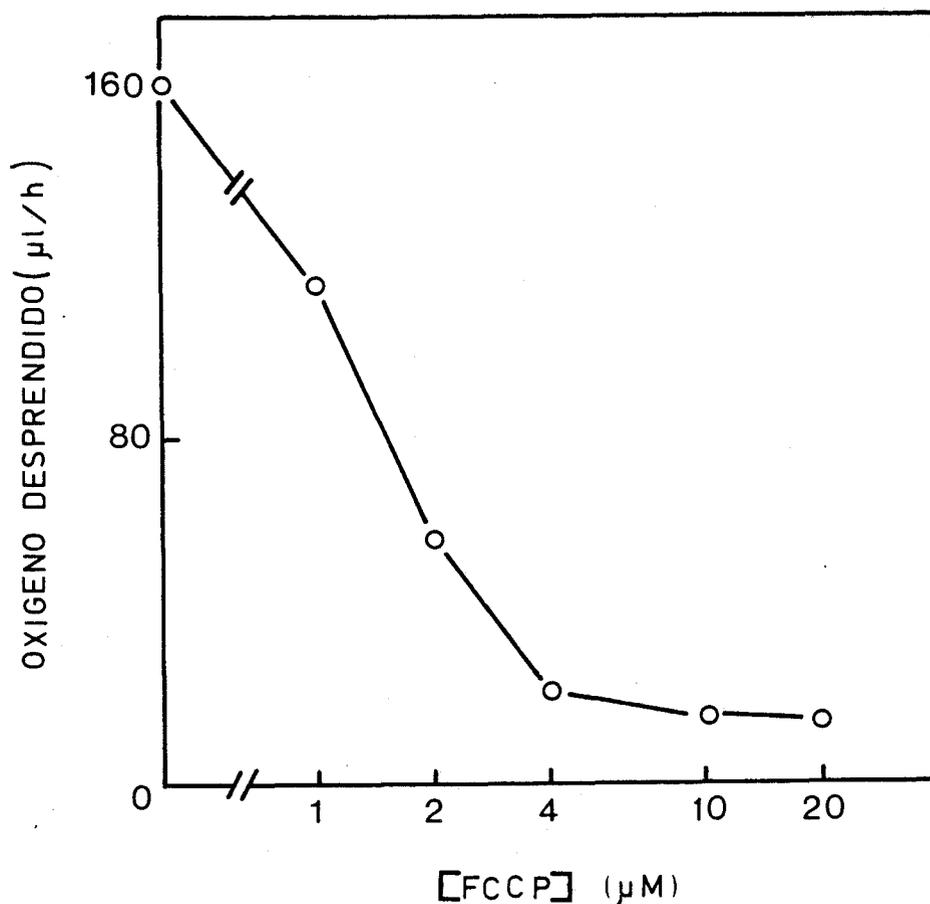


Figura 7. Desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de CO_2 por células de A.nidulans en presencia de distintas concentraciones de FCCP

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo 2,15 µl de células en 2,5 ml de tampón de ensayo en el compartimento principal y 0,5 ml de tampón $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$ 0,5 M, pH 9,6, en el pocillo central.

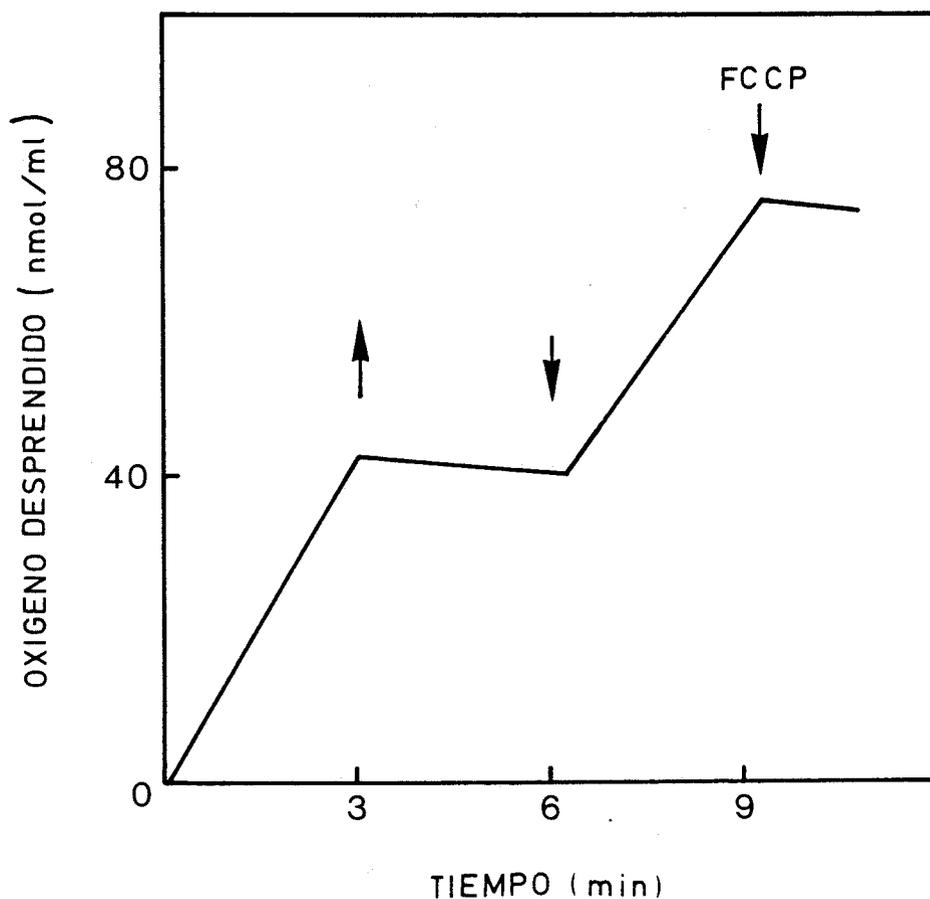


Figura 8. Efecto de la oscuridad y de la adición de FCCP (10 μ M) sobre el desprendimiento de oxígeno asociado a la fijación fotosintética del CO_2 por células de A.nidulans

El experimento se desarrolló en la cámara de un electrodo de oxígeno conteniendo 1,2 μ l de células en 3 ml de tampón de ensayo suplementado con 1 mM de CO_3HNa . La cámara se mantuvo iluminada a lo largo del experimento, excepto en el periodo comprendido entre las dos primeras flechas ($\uparrow\downarrow$). La tercera flecha indica el momento en que se añadió FCCP para alcanzar una concentración final de 10 μ M.

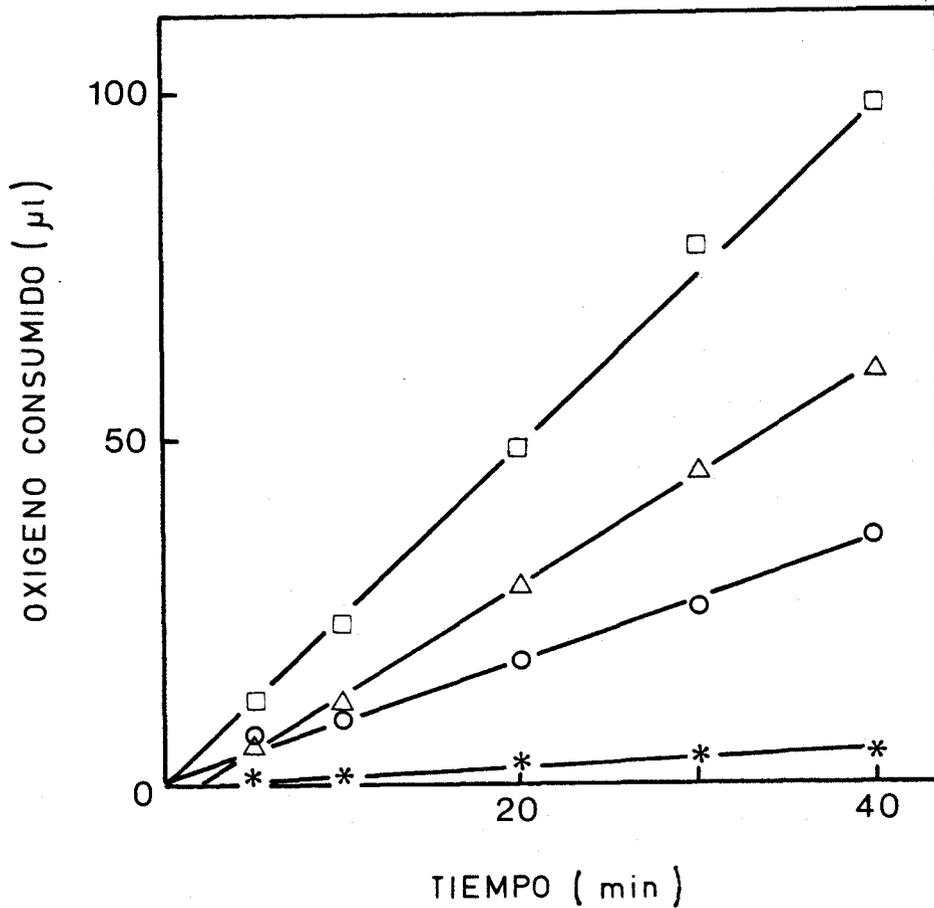


Figura 9. Efecto de FCCP, DNP y cianuro sobre la respiración endógena en A.nidulans

Los experimentos se desarrollaron en vasijas de Warburg que contenían 36,3 μl de células en 2,75 ml de tampón de ensayo en el compartimento principal y 0,25 ml de KOH al 20% en el pocillo central. Adiciones: ninguna (o); CNK, 5 mM (*); DNP, 1 mM (△); FCCP, 10 μM (□).

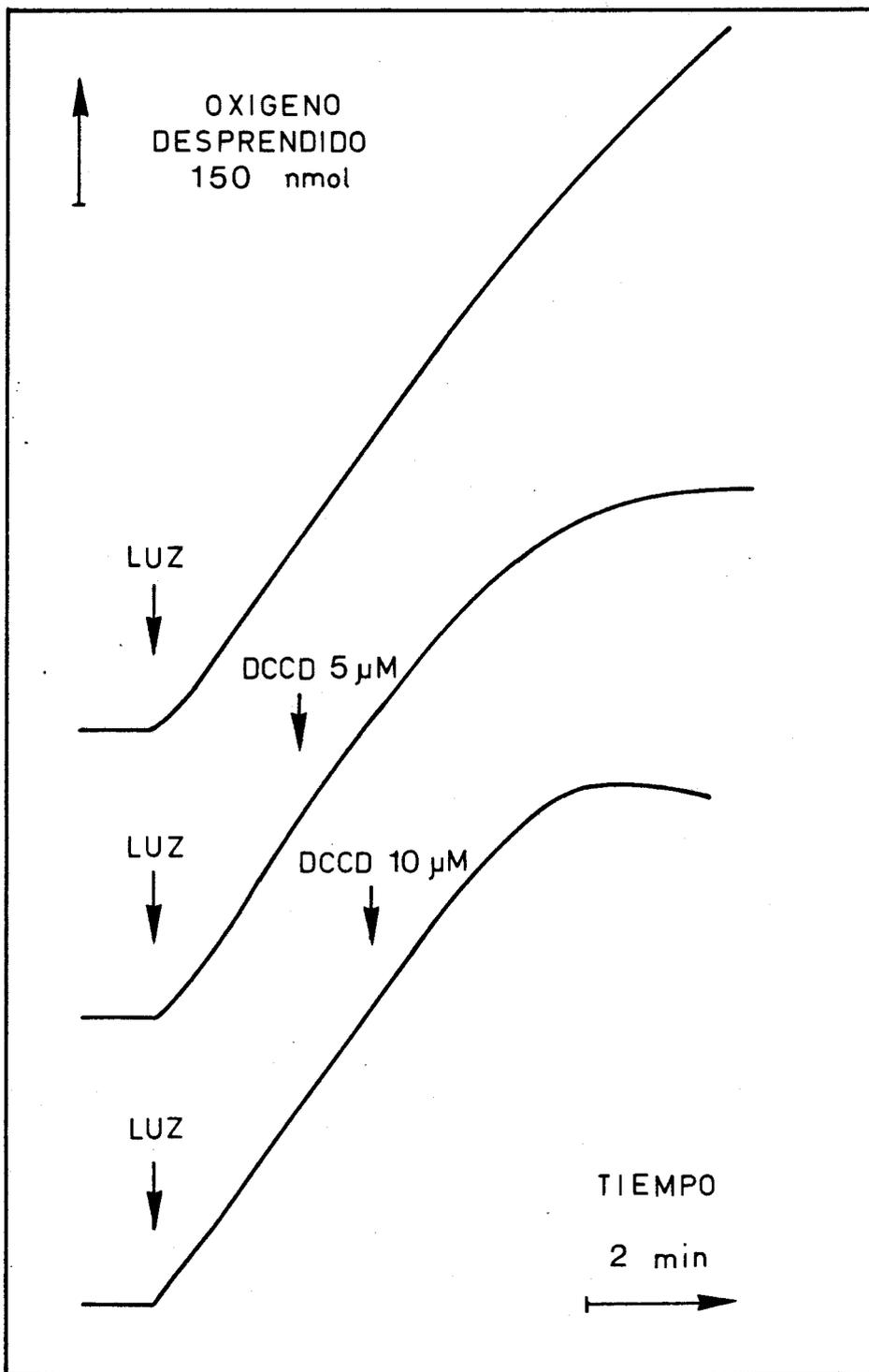


Figura 10. Efecto del DCCD sobre el desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de CO_2 en A. nidulans

El experimento se realizó en la cámara de un electrodo de oxígeno conteniendo en cada caso 2,4 μ l de células en 3 ml de tampón de ensayo suplementado con 2 mM de CO_3HNa . A los tiempos señalados por las flechas se iluminó el sistema o se añadió DCCD para alcanzar la concentración final que se indica.

pensión celular de Anacystis (1 μ l de células por ml) con DCCD 10 μ M, provoca una inhibición total del desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 durante al menos 45 min. Estos resultados son los esperados si el DCCD actúa sobre la ATPasa reversible de las membranas en Anacystis de la misma forma en que se ha descrito para otros organismos (Harold et al., 1969), esto es, como un inhibidor irreversible.

Se ha estudiado el efecto de la adición de FCCP a suspensiones celulares de Anacystis que se encontraban consumiendo nitrato. Los resultados obtenidos con células tratadas con MSX se muestran en la Fig. 11, habiéndose encontrado una respuesta similar en células normales. La inhibición inmediata del consumo del nutriente en respuesta a la presencia de FCCP sugiere la dependencia de energía del proceso de utilización del nitrato. El FCCP es un compuesto muy reactivo que a altas concentraciones puede inhibir el flujo de electrones fotosintético (Good, 1977), habiéndose descrito, además, una inhibición por este agente de la nitrato reductasa de algas verdes (Pistorius et al., 1976). Por ello, se han controlado estos posibles puntos de acción del FCCP, ya que la desaparición de nitrato del medio que aquí se mide depende de su reducción intracelular, en la que participan el aporte de poder reductor de origen fotosintético (ver apartado 3.1.3.) y la nitrato reductasa. El flujo de electrones no cíclico de la fotosíntesis se midió usando metil viológeno oxidado como aceptor de electrones (véase Materiales y

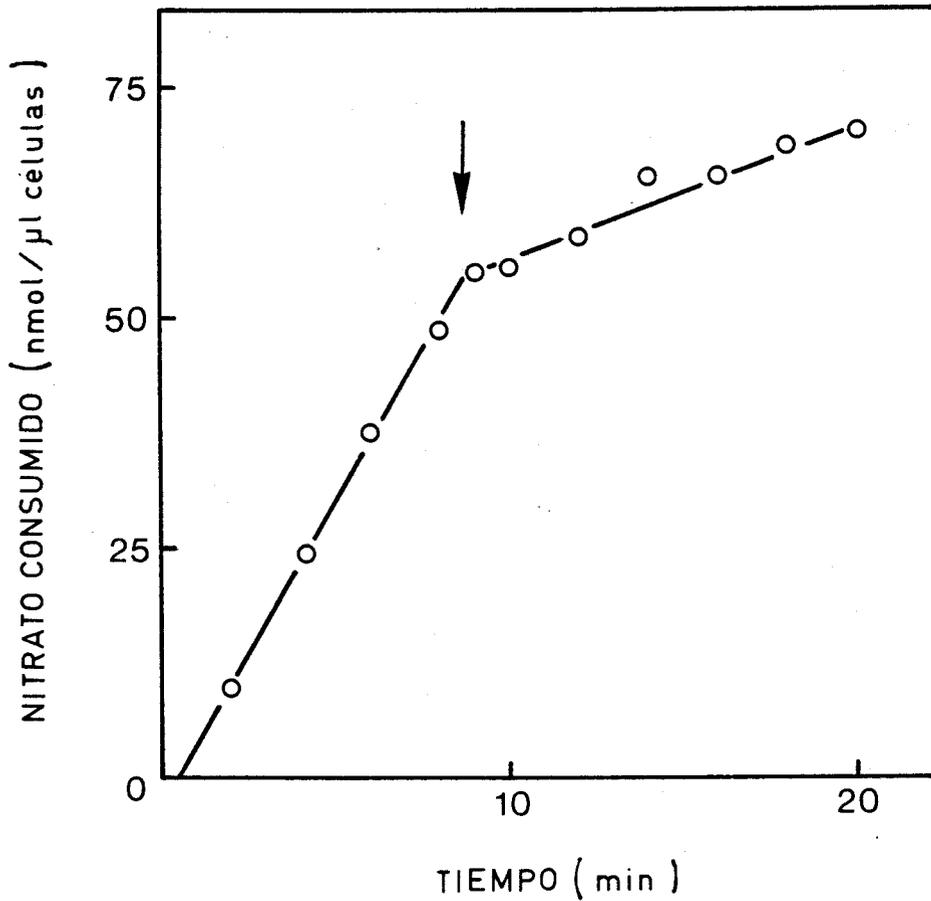


Figura 11. Efecto del FCCP sobre la utilización del nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX

El experimento se llevó a cabo con una suspensión conteniendo 1 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM, y se inició por adición de NO_3K (concentración final, 0,32 mM), tras 10 min de incubación de las células con el MSX. La flecha indica el momento de adición del FCCP (concentración final, 10 μM).

Métodos). Se ha encontrado que, en efecto, el FCCP afecta negativamente al flujo de electrones fotosintético no cíclico, pero, a diferencia de lo que ocurre con los procesos fisiológicos que estamos estudiando, la inhibición no es inmediata, tardando un cierto período de tiempo en desarrollarse. La actividad nitrato reductasa se ha medido en células toluenizadas, en muestras de la suspensión celular tomadas antes y 5 min después de la adición del FCCP. La presencia de este agente causaba una disminución variable (20%-70%, en cuatro experimentos distintos) del nivel celular de actividad nitrato reductasa, sin una relación aparente con el grado de inhibición del consumo de nitrato. (Por ejemplo, una concentración $1 \mu\text{M}$ de FCCP, que no inhibía el consumo de nitrato, ya afectaba negativamente al nivel celular de actividad nitrato reductasa, la cual disminuía en un proceso dependiente del tiempo, pasando de un 57% de inhibición, 2 min después de la adición del FCCP, a un 71% de inhibición, 10 min después de la adición del inhibidor). Ninguno de estos dos efectos del FCCP sobre el flujo no cíclico de electrones y sobre la actividad nitrato reductasa, parece pues ser el responsable de la drástica e inmediata inhibición que este compuesto ejerce sobre el consumo de nitrato, prevaleciendo en consecuencia la posibilidad de que inhiba al proceso en virtud de su carácter de agente desacoplante.

Suspensiones celulares de A.nidulans conteniendo 1-2 μl de células por ml pierden totalmente la capacidad de consumir nitrato tras ser incubadas a 40°C durante 5-10 min con DCCD

10-20 μM , tanto en lo que se refiere a células normales como a células tratadas con MSX. Por otra parte, la incubación de las células con DCCD en las condiciones descritas no provoca una disminución apreciable del nivel celular de actividad nitrato reductasa y este agente sólo determina una ligera inhibición de la actividad enzimática (15-20%) cuando se añade a altas concentraciones (0,1-0,5 mM) a la mezcla de ensayo de actividad nitrato reductasa. El flujo de electrones no cíclico de la fotosíntesis tampoco se inhibe por DCCD, según se desprende de los estudios del efecto de este agente sobre la asimilación del nitrito (véase apartado 3.1.2.3.). En consecuencia, ninguno de estos dos elementos, cuyo concurso es necesario para el proceso de utilización del nitrato, puede ser el responsable de la inhibición de éste por el DCCD.

Estos resultados confirman pues la sugerencia de un requerimiento de energía metabólica para la utilización del nitrato hecha en base a la inhibición del proceso por FCCP. Dado que el efecto del DCCD consiste en inhibir la ATPasa reversible de las membranas, los resultados indican además que la relación entre el metabolismo energético de la célula y el proceso de utilización del nitrato se encuentra mediada a algún nivel por ATP.

3.1.2.3.- El sistema de entrada de nitrito

Al igual que se hizo para el nitrato, se ha estudiado la relación entre la velocidad de consumo de nitrito por Anacystis y la concentración de este sustrato en el medio extracelular. Se ha encontrado que en el intervalo de concentración de 40 a 140 μM , la velocidad de consumo de nitrito por las células permanece prácticamente constante (Tabla 7).

Con objeto de estimar el límite inferior de concentración de nitrito hasta el cual la velocidad de su consumo se mantiene inalterada, se siguió la desaparición de una baja cantidad de nitrito hasta su agotamiento en el medio, en suspensiones de células tratadas con MSX, encontrándose que, desde el comienzo (aproximadamente 100 μM de nitrito), la velocidad de utilización permanecía constante hasta que la concentración de nitrito disminuía hasta llegar a ser del orden de 8 μM (Fig.12). El valor de la K_m de las células para el nitrito debe ser pues menor que esta concentración. Dado que la K_m para el nitrito de la nitrito reductasa es de 70 μM (Candau, 1979), se deduce que esta enzima no puede ser la responsable de la afinidad de las células para el nitrito. En consecuencia, se propone que en la asimilación del nitrito participe una permeasa que sería la responsable de la alta afinidad de las células por este ión.

La relación entre el proceso de consumo de nitrito en A.nidulans y el aporte de energía metabólica se investigó con el concurso de los inhibidores metabólicos FCCP y DCCD (véase apartado 3.1.2.2.). En la Tabla 8 se resume el efecto de la

Tabla 7. Efecto de la concentración extracelular de nitrito sobre la velocidad de su consumo por células de A. nidulans

{Nitrito} (μM)	Consumo ($\text{nmol}/\mu\text{l células}\cdot\text{min}$)
40	3,2
65	2,9
90	2,9
115	3,5
140	3,5

El experimento se desarrolló con suspensiones conteniendo 2,3 μl de células por ml. El nitrito se añadió como NO_2K .

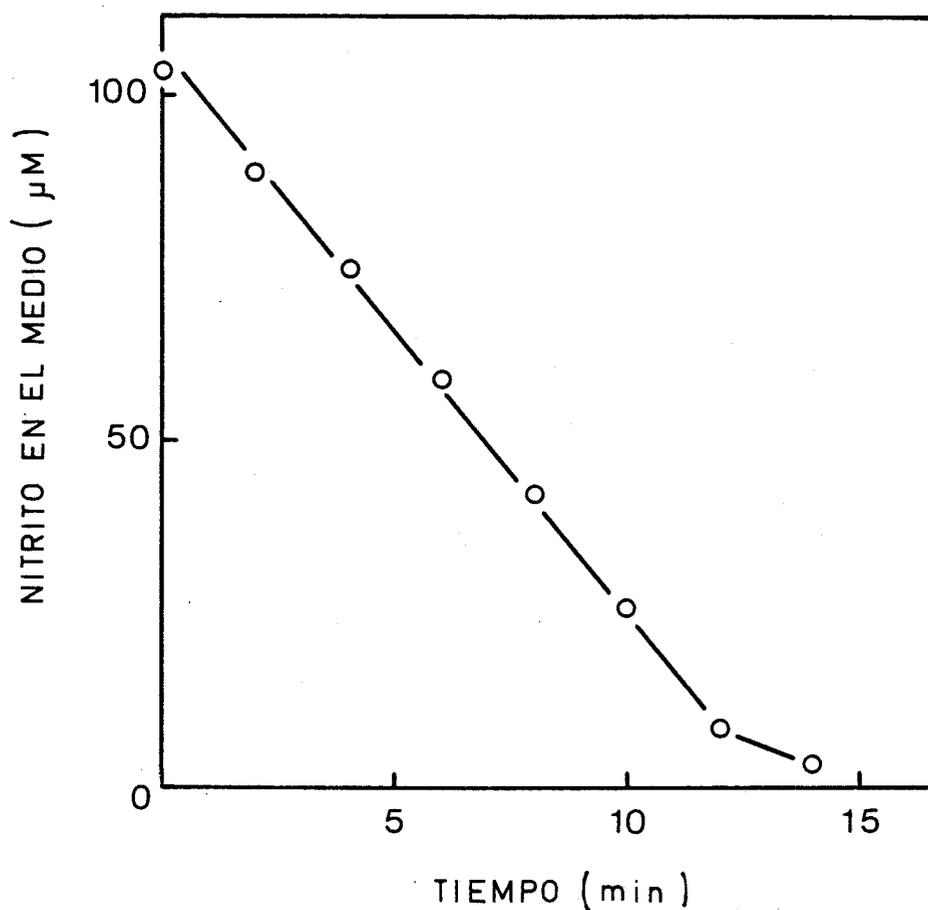


Figura 12. Cinética del consumo de nitrito por células de A.nidulans tratadas con MSX

La suspensión celular contenía 1,04 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM. El nitrito se añadió como NO_2K , tras una incubación de las células de 10 min con MSX.

Tabla 8. Efecto del FCCP y del DCCD sobre el consumo de nitrito por células de A. nidulans normales y tratadas con MSX

Inhibidor	Nitrito consumido (nmol/ μ l células)	
	sin MSX	con MSX
Ninguno	73	214
FCCP	19	52
DCCD	26	31

El FCCP (10 μ M) se añadió a la suspensión celular a tiempo cero, mientras que en el caso del DCCD se realizó una preincubación previa de las células en presencia de 40 μ M del inhibidor durante 10 min antes de la adición de NO_2K 0,2 mM. Cuando se indica, las células se trataron con MSX 1 mM durante 10 min antes de la adición del nitrito. Los datos corresponden a nitrito desaparecido en 20 min.

adición de FCCP y de la preincubación con DCCD sobre el consumo de nitrito, tanto en células normales como en células tratadas con MSX. Los resultados indican una fuerte inhibición por estos compuestos del consumo de nitrito, lo que sugiere la participación de un sistema de transporte activo en dicho proceso.

La inhibición por DCCD o FCCP de la utilización del nitrito no es, sin embargo, tan drástica como la que se observa en el caso del consumo de nitrato (apartado 3.1.2.2.). Este hecho se ilustra claramente en la Fig. 13 para el caso de inhibición por DCCD. Como se observa en dicha figura, a partir de una concentración de DCCD de aproximadamente 10 μ M, mientras que la utilización del nitrato se inhibe totalmente, la inhibición del consumo de nitrito no aumenta. La menor sensibilidad a agentes inhibidores de la síntesis de ATP del transporte de nitrito con respecto al de nitrato se ha descrito también en el alga verde Scenedesmus (Larsson y Andersson, 1981). Se ha sugerido que la causa de esta diferencia puede radicar en la existencia de una entrada pasiva de ácido nitroso ($pK_a = 3,35$) al interior de la célula, que tendría lugar a la vez que el transporte activo de nitrito; la concentración de ácido nítrico ($pK_a = -1,32$) en la suspensión celular al pH al que se llevan a cabo los experimentos sería, por el contrario, demasiado baja para que éste pueda contribuir significativamente a la entrada de nitrato en la célula.

Si la entrada pasiva de ácido nitroso en la célula es realmente la causa de la falta de inhibición total por DCCD ó

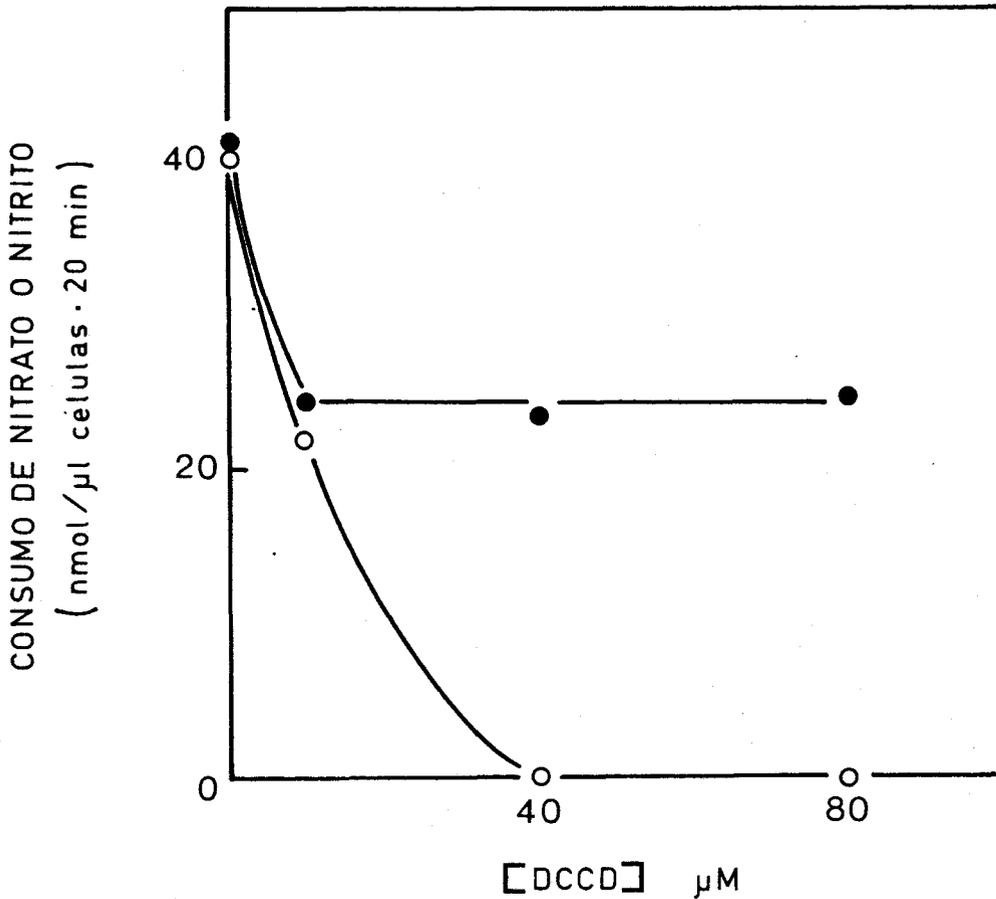


Figura 13. Efecto de la concentración de DCCD sobre el consumo de nitrato y nitrito en A.nidulans

El experimento se inició por adición de (o) NO_3K (0,2 mM) o de (●) NO_2K (0,2 mM) a suspensiones celulares (2,3 μl de células por ml de tampón de ensayo) que habían sido incubadas durante 10 min con las concentraciones de DCCD indicadas.

FCCP del consumo de nitrito, el grado de esta inhibición debe depender del pH extracelular. Se ha estudiado la inhibición por DCCD de la utilización del nitrito a distintos valores de pH (Tabla 9), habiéndose observado que dicha inhibición se hace mayor a medida que aumenta el pH. El aumento de pH establece una disminución de la concentración de ácido nitroso en el medio extracelular y, por tanto, determinaría una disminución en la posible contribución de su entrada pasiva al consumo de nitrito. Es decir, al incrementar el pH aumentaría la contribución relativa del transporte activo a la entrada del nitrito en la célula. En consecuencia, la inhibición por DCCD sería, tal y como se ha encontrado (Tabla 9), mayor a pH más altos. Aunque no se puedan descartar otras interpretaciones, los datos apoyan la hipótesis de la contribución de un influjo pasivo de ácido nitroso en la entrada de nitrito en la célula.

Por otra parte, la inhibición por DCCD del consumo de nitrito es más acusada en el caso de células tratadas con MSX que para las no tratadas (Tabla 8). Este hecho podría estar relacionado con la desregulación del consumo de nitrato y de nitrito que causa el MSX (sección 3.2.1.), y que conduce a que las células tratadas con este agente muestren velocidades incrementadas de consumo de ambos nutrientes. Si este incremento se debe, como aquí se sugiere, a la pérdida de regulación del transporte activo de nitrato y de nitrito en las células tratadas con MSX, sin que se afecte la entrada pasiva e inespecífica de ácido nitroso, en estas células el componente activo de la en-

Tabla 9. Efecto del tratamiento con DCCD sobre el consumo de nitrito por A. nidulans a distintos valores de pH

pH	Consumo de nitrito (nmol/ μ l células)		Inhibición (%)
	Células normales	Células tratadas con DCCD	
7,5	193	209	-
8,5	115	91	21
9,5	133	68	49

Los datos se refieren al nitrito consumido en 30 min. Donde se indica, se utilizaron células que habían sido tratadas con 10 μ M de DCCD durante 15 min, en suspensiones celulares conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH de pH 8,1. Los ensayos se llevaron a cabo en tampones Tricina 15 mM-Glicina 15 mM- NaOH del pH indicado en cada caso, y se iniciaron por adición de NO_2K 0,5 mM.

trada de nitrito será proporcionalmente más importante que en las células normales. Esto explicaría, por tanto, que la inhibición del consumo de nitrito causada por el inhibidor de la síntesis de ATP sea mayor en las células tratadas con MSX que en las normales, no tratadas.

En el apartado 3.1.1.2. se demostró que la desaparición del medio de nitrato y de nitrito que se mide en los experimentos que se presentan en este trabajo implica la inmediata metabolización de estos nutrientes en la célula. Este es también el caso para el consumo remanente de nitrito en las células tratadas con DCCD, ya que estas liberan cuantitativamente al medio como amonio el nitrito asimilado (ver Fig. 25 en apartado 3.1.4.). Por otra parte, esta reducción de nitrito a amonio que tiene lugar en las células tratadas con DCCD es, al igual que en las células normales (apartado 3.1.3.), de carácter fotosintético, ya que el consumo de nitrito por las células tratadas con DCCD presenta un desprendimiento de oxígeno asociado (Fig. 14). Este hecho indica, además, que el DCCD no se comporta como un inhibidor del flujo fotosintético de electrones no cíclico en las condiciones en las que este agente se ha utilizado en este trabajo.

3.1.2.4.- Existencia de un elemento común al transporte de nitrato y de nitrito

Suspensiones de células de Anacystis nidulans incubadas en presencia de nitrato y de nitrito consumen preferentemente

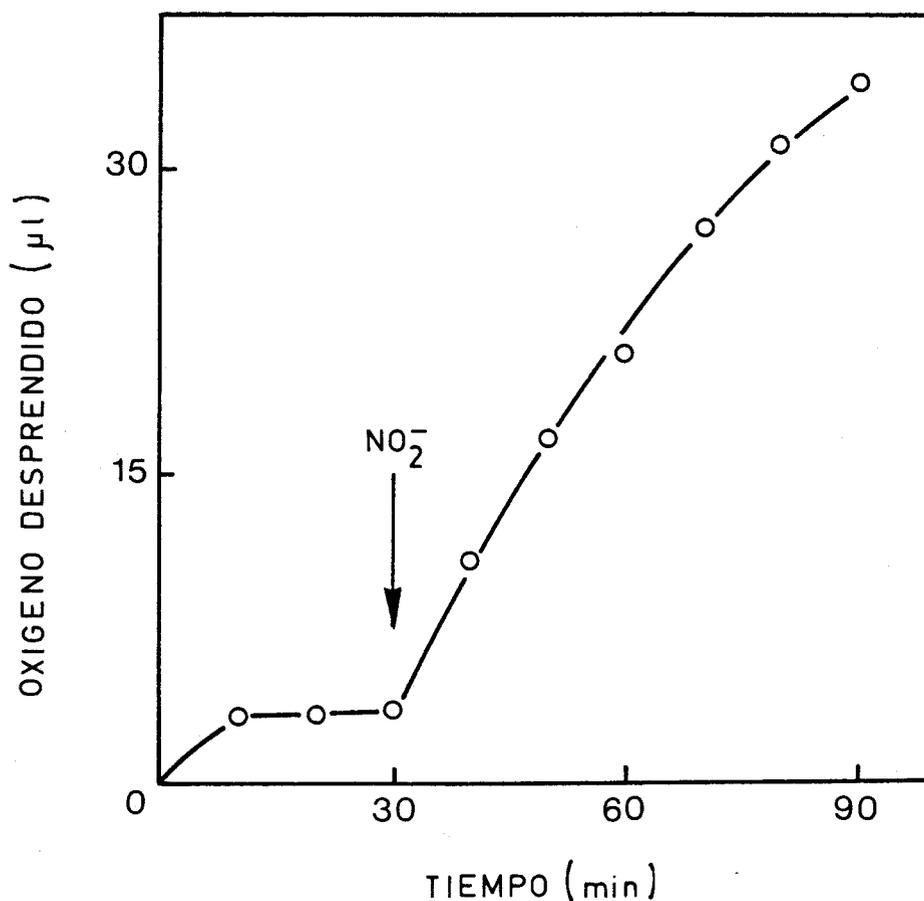


Figura 14. Desprendimiento de oxígeno asociado a la utilización de nitrato por células de A.nidulans tratadas con DCCD

El experimento se llevó a cabo con vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 2,75 ml de tampón de ensayo con 2,46 µl de células que habían sido previamente sometidas al tratamiento con DCCD que se describe en el apartado 3.1.2.2, y en el pocillo central 0,25 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6. En el momento indicado se añadió desde el brazo lateral NO_2K para dar una concentración final de 0,73 mM en la suspensión celular.

te nitrito, aunque la utilización del nitrato no se encuentra totalmente inhibida (Tabla 3). Dado que a este resultado podría contribuir el efecto inhibitor de productos de la asimilación del amonio sobre el consumo, sobre todo, de nitrato (véase apartado 3.2.1.), se ha investigado la utilización simultánea de nitrato y de nitrito en suspensiones de células de Anacystis tratadas con MSX, incapaces por tanto de asimilar amonio. En la Tabla 10 se puede observar que estas células, cuando se incuban en presencia de nitrato y de nitrito, consumen simultáneamente ambos aniones. Sin embargo, la comparación de los valores de consumo de cada uno de los sustratos en estas condiciones con los valores que se obtienen en suspensiones celulares en las que sólo se encuentra presente uno de ellos, indica la existencia de un cierto grado de competencia entre la utilización del nitrato y la del nitrito también en las células tratadas con MSX (Tabla 10).

Esta competencia podría tener lugar a nivel de reducción y/o a nivel de transporte. Con objeto de discernir entre ambas opciones se estudió el efecto del nitrato sobre el consumo de nitrito por células incapaces de reducir nitrato (prácticamente carentes de actividad nitrato reductasa por incubación prolongada en presencia de tungstato, apartado 3.1.1.2.) y tratadas con MSX. Estas células manifiestan de hecho una notable actividad de consumo de nitrito tanto a pH 7,2 como a pH 9,6 (Tabla 11), no presentando, sin embargo, capacidad apreciable de consumo de nitrato, como se evidencia por la falta de pro-

Tabla 10. Competencia entre la utilización del nitrato y la del nitrito por células de A. nidulans tratadas con MSX

Sustrato añadido	Sustrato consumido ($\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ células)	
	Nitrato	Nitrito
Nitrato	134	-
Nitrito	-	176
Nitrato, nitrito	105	131

El experimento se inició por adición de NO_3K (0,4 mM) y/o NO_2K (0,6 mM) a suspensiones celulares (2,8 μl de células por ml de tampón de ensayo) incubadas con MSX a concentración 1 mM desde 15 min antes de la adición de los sustratos. Los datos corresponden al nitrato o nitrito consumido en 30 min.

Tabla 11. Efecto del nitrato sobre la utilización del nitrito en células de A. nidulans tratadas con MSX y carentes de actividad nitrato reductasa

pH	Adiciones	Nitrito consumido (nmol/ μ l células)	Amonio producido (nmol/ μ l células)
7,2	Nitrato	-	0
	Nitrito	183	191
	Nitrito, nitrato	182	183
9,6	Nitrato	-	16
	Nitrito	176	133
	Nitrito, nitrato	27	20

En el experimento se utilizaron células incubadas durante 37 h en condiciones de cultivo en un medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno, carente de molibdeno y suplementado con WO_4Na_2 a concentración 2 mM. Su contenido de nitrato reductasa era de 1,07 mU/ μ l células (las células normales cultivadas con nitrato contienen alrededor de 30 mU de nitrato reductasa/ μ l células). Estas células, suspendidas en tampón de ensayo, se sometieron a tratamiento de inactivación de la glutaminá sintetasa con MSX a concentración 1 mM (véase Materiales y Métodos). El ensayo se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 0,9 μ l de células por ml de tampón MOPS 25 mM-Glicina 25 mM-NaOH, del pH indicado, y se inició por adición de NO_2K (0,4 mM, concentración final) y/o NO_3K (20 mM, concentración final). Los datos corresponden al nitrito consumido o al amonio producido en 20 min.

ducción de amonio cuando las células se incuban con nitrato como único sustrato nitrogenado (Tabla 11). La presencia de nitrato a alta concentración causa, por otra parte, una drástica inhibición del consumo de nitrito a pH 9,6, pero no a pH 7,2.

El hecho de que el nitrato pueda inhibir la utilización del nitrito en condiciones en las que no tiene lugar reducción del nitrato sugiere la localización a nivel de transporte de un factor determinante de competencia entre ambos sustratos para su utilización. Esta interpretación se confirma por la observación de que la inhibición por nitrato del consumo de nitrito se manifiesta particularmente a un valor de pH 9,6, al que el componente fundamental de la entrada del nitrito a la célula es el transporte activo del mismo, mientras que a pH 7,2, condiciones en las que existe una contribución muy importante de la difusión pasiva de ácido nitroso al consumo de nitrito, no se manifiesta ningún efecto del nitrato sobre la utilización del nitrito. Aparte de otras posibilidades, el factor común en el transporte de nitrato y de nitrito implicado en la competencia podría ser la propia permeasa.

En este apartado se han presentado observaciones que permiten sugerir la participación de una permeasa en la asimilación del nitrato. Asimismo se han presentado resultados que indican que el proceso de utilización del nitrato requiere energía metabólica. Dado que el requerimiento de energía es una propiedad de los sistemas de transporte activo y que el sistema reductor del nitrato no necesita aporte de energía metabólica

para ser operativo, se sugiere que el factor dependiente de energía que participa en los pasos iniciales de la asimilación del nitrato es la entrada de éste en la célula. En conclusión, el nitrato parece entrar en la célula mediante un mecanismo de transporte activo.

Similarmente, el nitrito parece poder entrar en la célula vía una permeasa que cataliza un transporte activo del mismo. Sin embargo, también parece ocurrir una entrada neta de nitrito al interior celular mediante un proceso pasivo, probablemente consistente en difusión de ácido nitroso a través de la membrana plasmática. Ambos procesos parecen poder operar simultáneamente, dependiendo del pH del medio externo la contribución de cada uno a la entrada total de nitrito en la célula.

3.1.3.- Reducción fotosintética de nitrato y nitrito

Dado que las enzimas del sistema reductor del nitrato en Anacystis nidulans utilizan ferredoxina reducida como donador de electrones (Manzano et al., 1976; Candau et al., 1980), se planteó el estudio de la posible relación existente entre la generación fotosintética de poder reductor y la reducción del nitrato in vivo, presentándose en este apartado los resultados obtenidos.

3.1.3.1.- Requerimiento de luz para el consumo de nitrato (y nitrito)

Como ya se ha mencionado en el apartado 3.1.1., la utilización de nitrato y de nitrito por A.nidulans es un proceso que depende de luz. La Figura 15 muestra cómo la introducción de un período de oscuridad durante un experimento de consumo de nitrato por células tratadas con MSX resulta en el cese inmediato de la utilización del nitrato por estas células. Un efecto similar se encontró cuando el sustrato utilizado era el nitrito, aunque en este caso la inhibición del consumo en la oscuridad no es tan drástica (Fig. 16).

La dependencia por la luz que presentan los procesos de utilización del nitrato y del nitrito podría deberse a un requerimiento por los dos componentes del Poder Asimilatorio generado fotosintéticamente (ATP y poder reductor, Arnon, 1971), o por sólo uno de ellos. Los resultados que se han presentado en el apartado 3.1.2. indican la participación de ATP en el transporte de ambos nutrientes, nitrato y nitrito, al interior de la célula. La cuestión que se plantea en este punto es si el otro componente del Poder Asimilatorio fotosintético, el poder reductor generado en la fotólisis del agua, participa también en los procesos de utilización del nitrato y del nitrito en Anacystis, ya que éstos consisten no sólo en el transporte de los nutrientes sino también en su metabolización intracelular (apartado 3.1.1.2.)

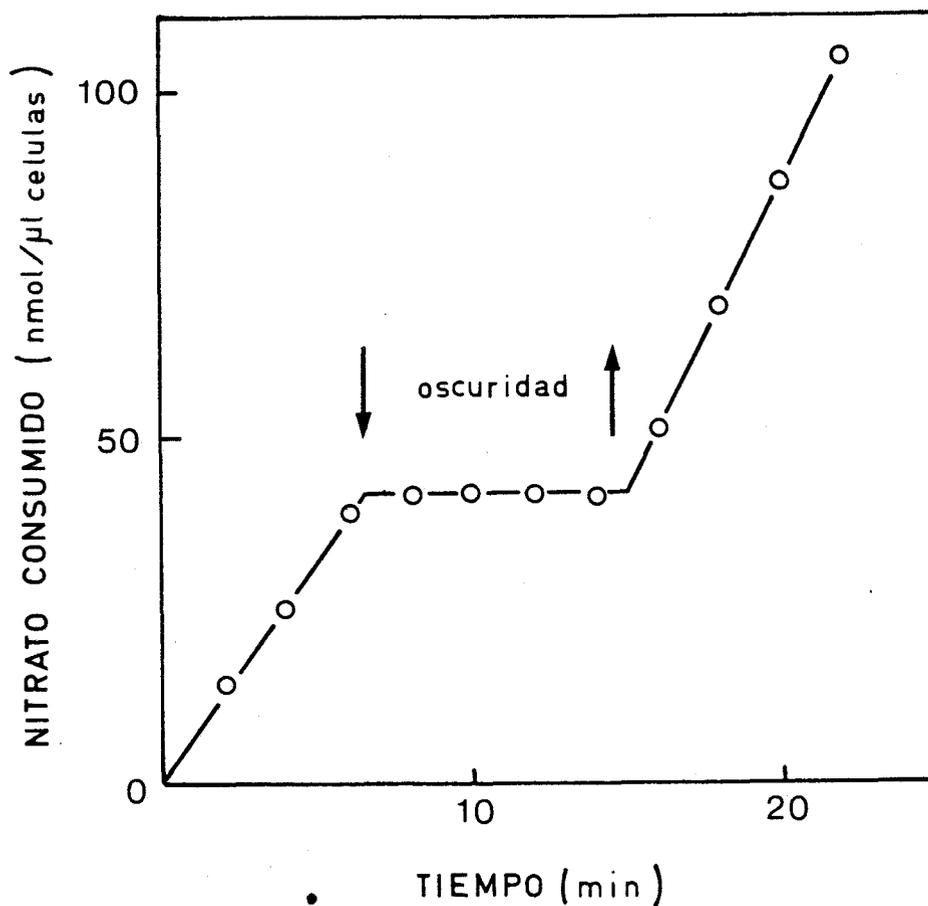


Figura 15. Requerimiento de luz para el consumo de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX

El experimento se inició por adición de NO_3K ($185 \mu\text{M}$, concentración final) a una suspensión celular conteniendo $1,5 \mu\text{l}$ de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM , tras 10 min de incubación en presencia de este inhibidor.

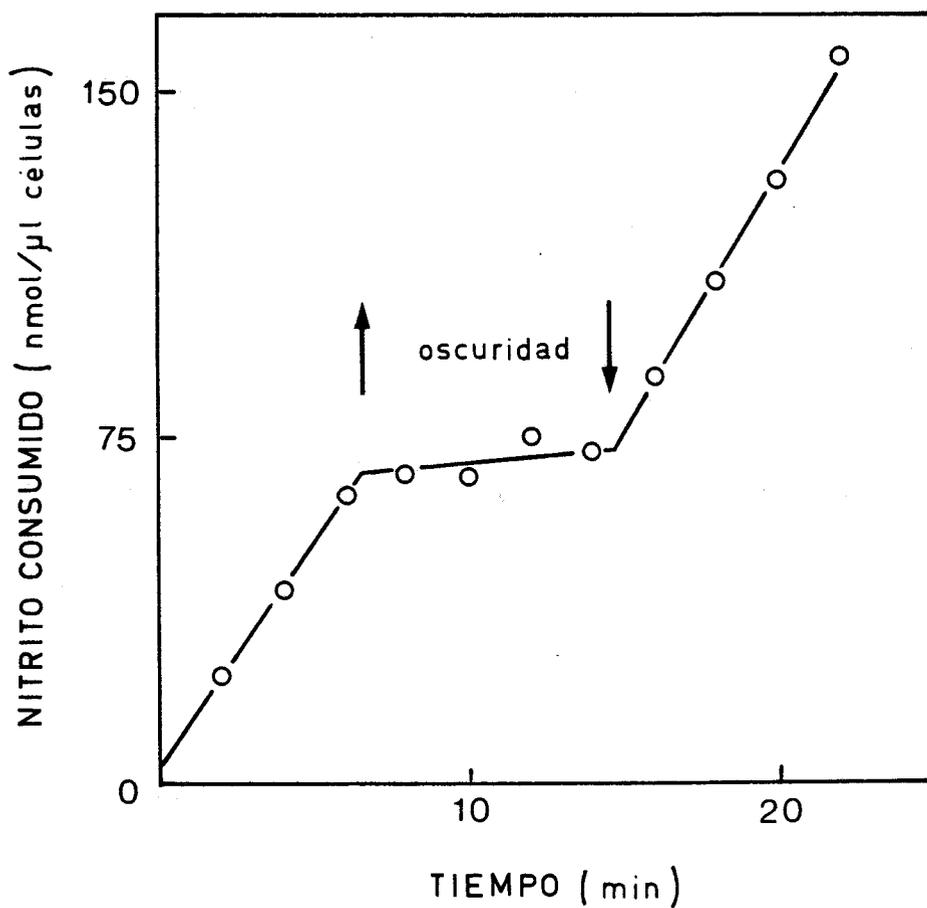


Figura 16. Requerimiento de luz para el consumo de nitrito por células de A.nidulans tratadas con MSX

El experimento se realizó en las mismas condiciones que el que se presenta en la Figura 15, pero con 1 μ l de células por ml. Nitrito añadido: 250 μ M, concentración final.

La adición de 10 μM de DCMU, inhibidor del flujo fotosintético de electrones no cíclico, a suspensiones celulares de A.nidulans resulta en la inhibición inmediata y drástica de la utilización de nitrato y de nitrito, manifiesta tanto en células tratadas con MSX (Fig. 17) como en células normales, no tratadas. Estos resultados sugieren la participación del poder reductor originado fotosintéticamente en la reducción del nitrato y del nitrito.

3.1.3.2.- Desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción de nitrato (y nitrito)

La fotólisis del agua en tejidos fotosintéticos se encuentra regulada de forma que solamente tiene lugar si hay en la célula un consumo del poder reductor que genera. Así, por ejemplo, es un hecho conocido que el desprendimiento de oxígeno por suspensiones de células fotosintéticas es estequiométrico con la fijación de CO_2 , cuando éste es el único aceptor de electrones suministrado a los organismos. Por lo tanto, si la reducción del nitrato y del nitrito in vivo tiene lugar directamente con electrones originados en la fotólisis del agua, la utilización de nitrato y de nitrito debe presentar asociado un desprendimiento estequiométrico de oxígeno.

Cuando se exponen a la luz en presencia de una concentración de CO_2 de 0,2 mM, saturante para el proceso de fijación del CO_2 ($K_m(\text{CO}_2) = 4 \mu\text{M}$), las células de Anacystis nidulans

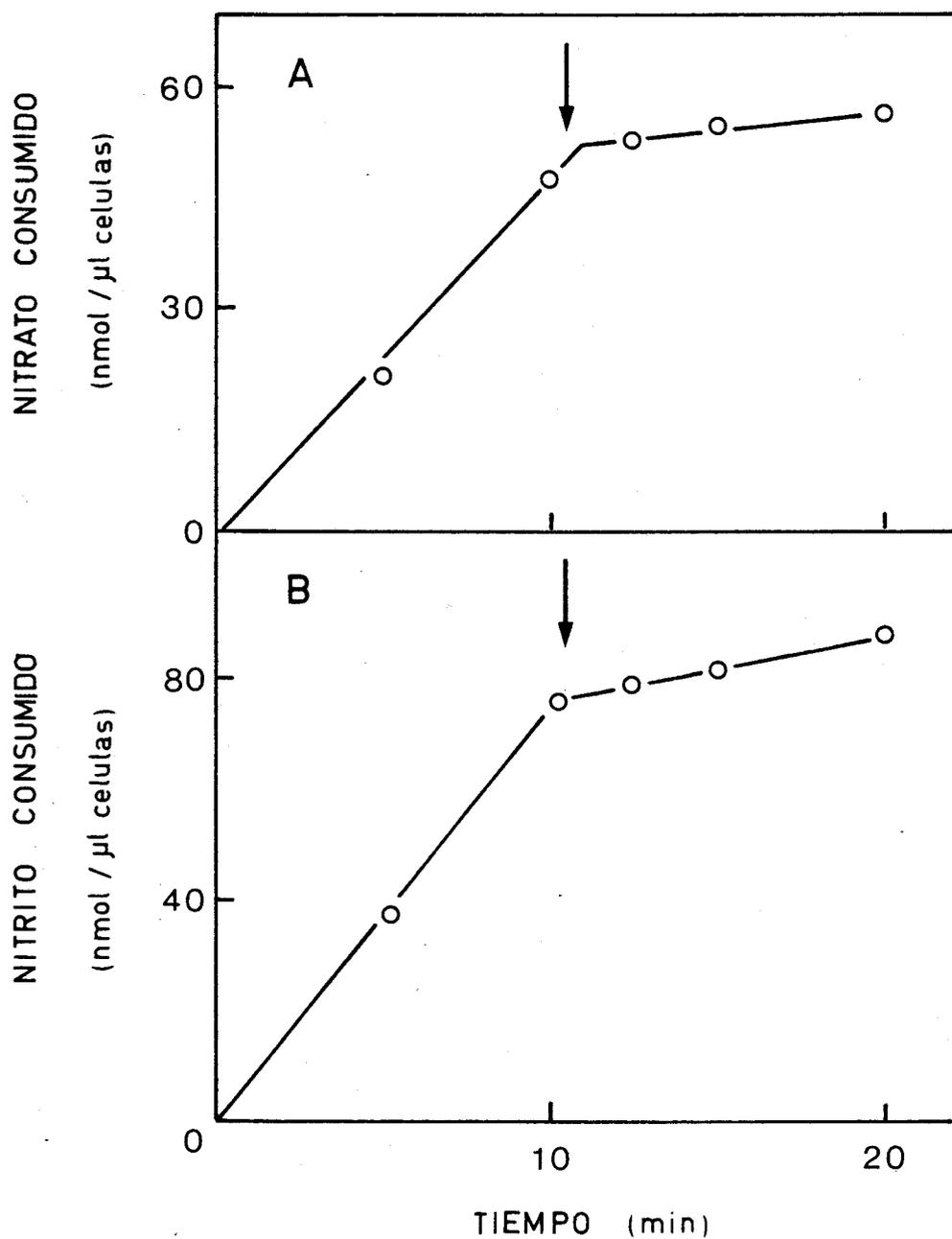


Figura 17. Efecto del DCMU sobre el consumo de nitrato y de nitrito por células de A.nidulans tratadas con MSX

Los experimentos se iniciaron por adición de NO_3K (concentración final, 0,25 mM) o de NO_2K (concentración final, 0,31 mM) a suspensiones conteniendo 0,98 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM, tras 10 min de incubación en presencia del inhibidor. En el momento indicado por las flechas se añadió DCMU (concentración final, 10 μM) a cada una de las suspensiones celulares.

tratadas con MSX desprenden oxígeno a una velocidad de alrededor de 45 nmol/ μ l células·min, similar a la que presentan células normales no tratadas. Si las suspensiones celulares utilizadas en los experimentos se suplementan, además de con CO₂, con nitrato o con nitrito, se registran velocidades mayores de desprendimiento de oxígeno (Fig. 18A y Fig. 19A). El desprendimiento extra de oxígeno observado en presencia de cada uno de los sustratos nitrogenados se ha comparado con el consumo del correspondiente sustrato. Para el caso del nitrato se encontraron estequiometrías de alrededor de 2 moles de oxígeno desprendidos por mol de nitrato reducido a amonio (en estos experimentos se utilizaban células tratadas con MSX) (Fig. 18B), mientras que con el nitrito como sustrato las estequiometrías observadas fueron de 1,5 moles de oxígeno por mol de nitrito reducido a amonio (Fig. 19B).

Dado que las células de Anacystis no requieren CO₂ para asimilar nitrato cuando se han tratado previamente con MSX (véase apartado 3.2.2.), se han podido emplear suspensiones de este tipo de células para estudiar el desprendimiento de oxígeno asociado a la reducción del nitrato (y del nitrito) en la ausencia de otros aceptores de electrones añadidos. La Figura 20 muestra las cinéticas de desprendimiento de oxígeno observadas tras la adición de distintas cantidades de nitrato a suspensiones de células de Anacystis tratadas con MSX, en atmósfera libre de CO₂. En todos los casos se obtuvieron valores próximos a 2 moles de oxígeno desprendidos por mol de nitrato reducido a

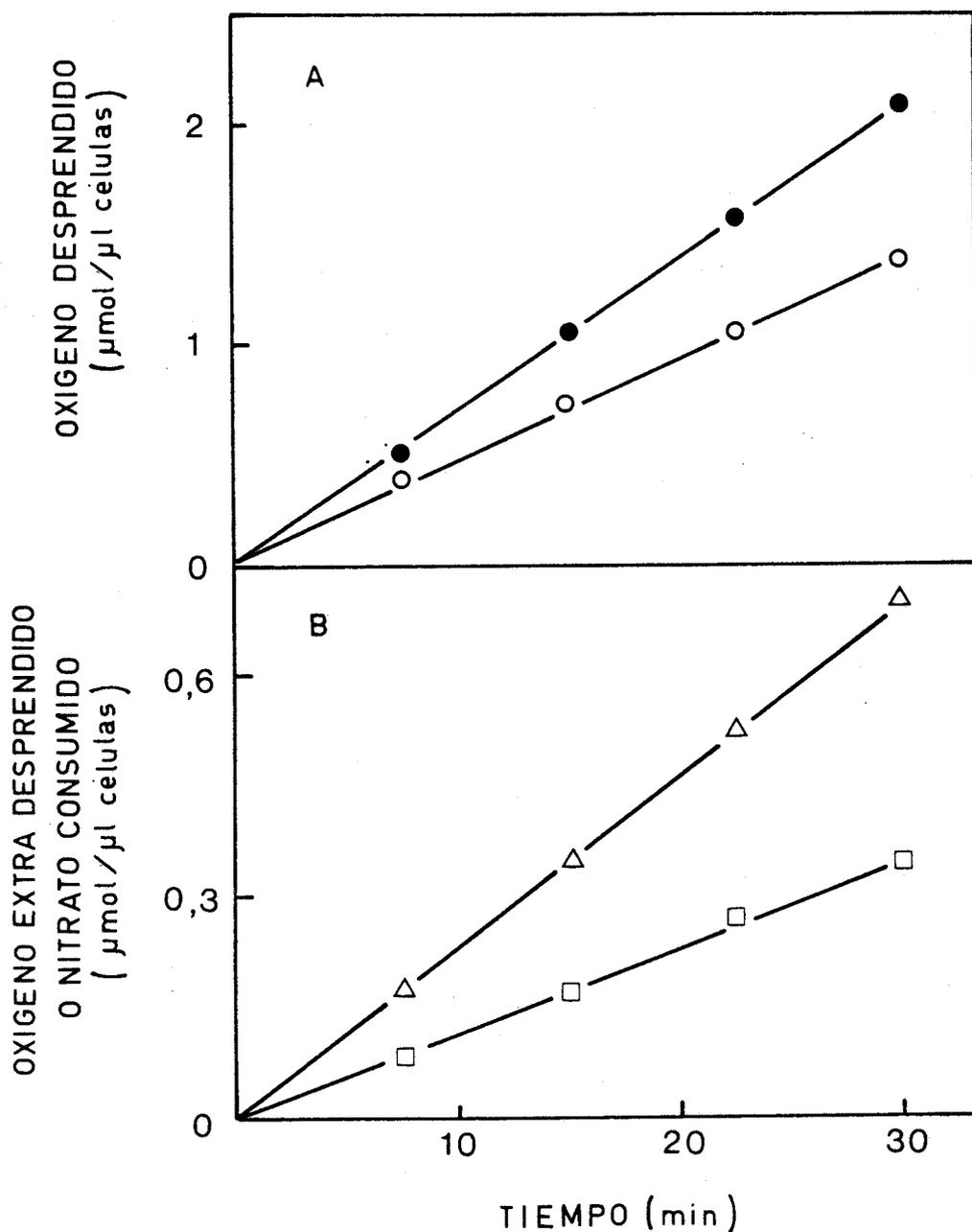


Figura 18. Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX, en fase activa de fijación de CO_2

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal una suspensión con 1 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM y, en su caso, NO_3K 0,5 mM, y en el pocillo central tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6³. La primera determinación (tiempo cero) se hizo 15 min después de encender la luz. A los tiempos indicados se fueron abriendo sucesivas vasijas, siendo filtradas inmediatamente las suspensiones celulares contenidas en ellas, para el posterior análisis del nitrato remanente. A) Desprendimiento de oxígeno en ausencia (○) o presencia (●) de nitrato. B) Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrato (Δ); consumo de nitrato (□).

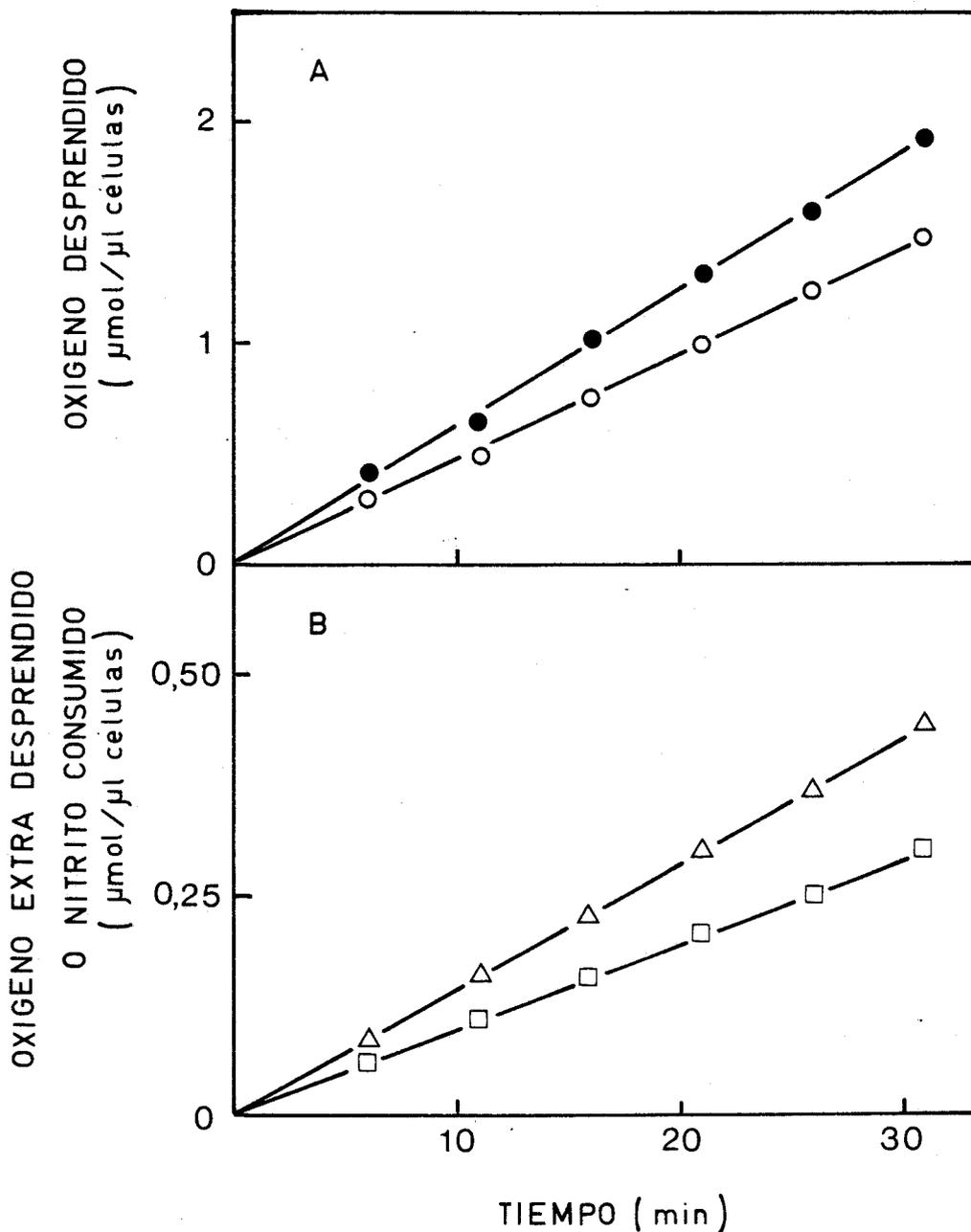
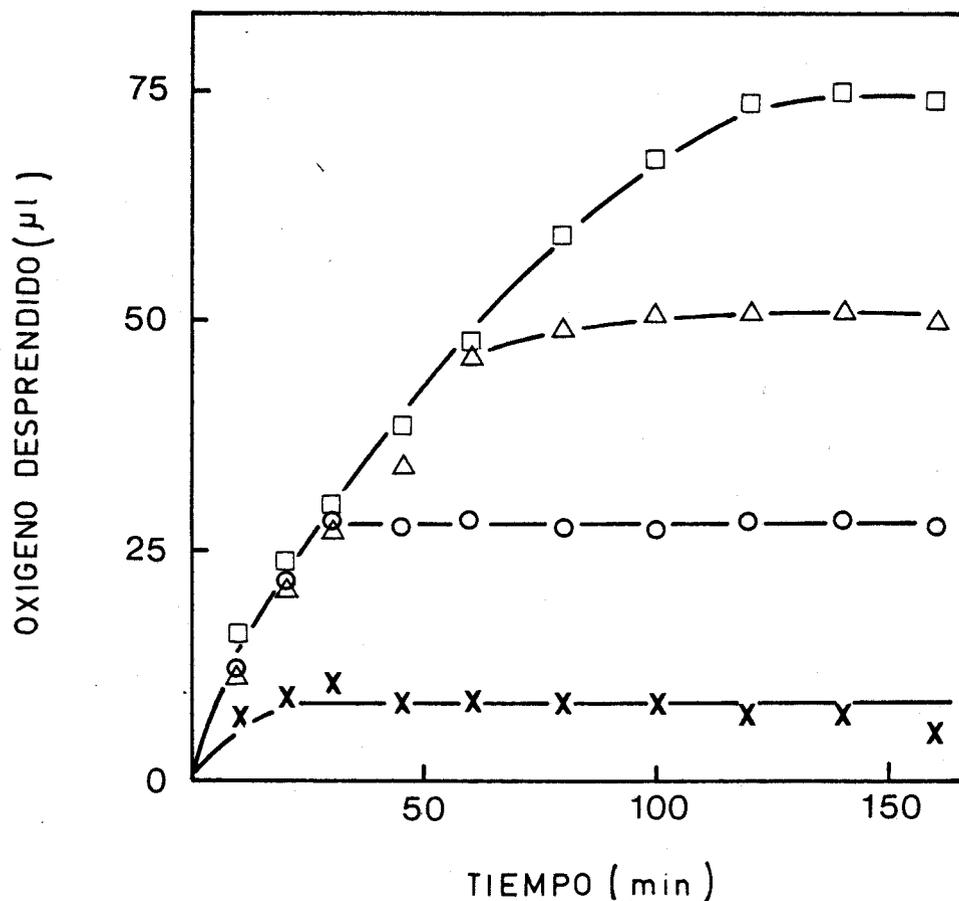


Figura 19. Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrito por células de *A.nidulans* tratadas con MSX, en fase activa de fijación de CO_2

El experimento se llevó a cabo en condiciones similares a las descritas en la leyenda de la Figura 18, con 1,13 μl de células por ml de tampón de ensayo y con una concentración de NO_2K de 0,56 mM. La primera determinación (tiempo cero) se hizo 10 min después de encender la luz. A) Desprendimiento de oxígeno en ausencia (○) o en presencia (●) de nitrito. B) (Δ) Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrito; (□) consumo de nitrito.



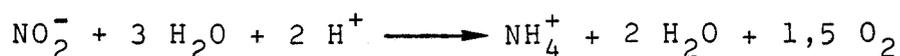
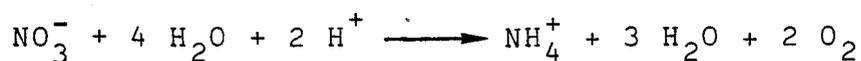
Nitrato añadido (μmol)	Oxígeno desprendido (μmol)	Relación O_2/NO_3^-
0,5	0,91	1,83
1,0	1,95	1,95
1,5	2,98	1,99

Figura 20. Desprendimiento de oxígeno asociado al consumo de distintas cantidades de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX, en ausencia de CO_2

El experimento se desarrolló en vasijas de Warburg conteniendo 2,75 μl de células en 2,5 ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM en el compartimento principal, y KOH al 20% en el pocillo central. Tras 30 min de incubación a la luz, las suspensiones celulares se suplementaron (tiempo cero) con las cantidades de NO_3^- que se indican a continuación, que se añadieron desde el brazo lateral disueltas en agua: (X) cero; (O) 0,5 μmol ; (Δ) 1,0 μmol ; (\square) 1,5 μmol . Los datos de desprendimiento de oxígeno que se presentan en la tabla corresponden a los valores encontrados en presencia de nitrato corregidos con el control en ausencia de nitrato.

amonio (véase la tabla adjunta a la Fig. 20). En experimentos similares llevados a cabo utilizando nitrito como sustrato, los valores determinados fueron próximos a 1,5 moles de oxígeno desprendidos por mol de nitrito reducido a amonio (Fig. 21).

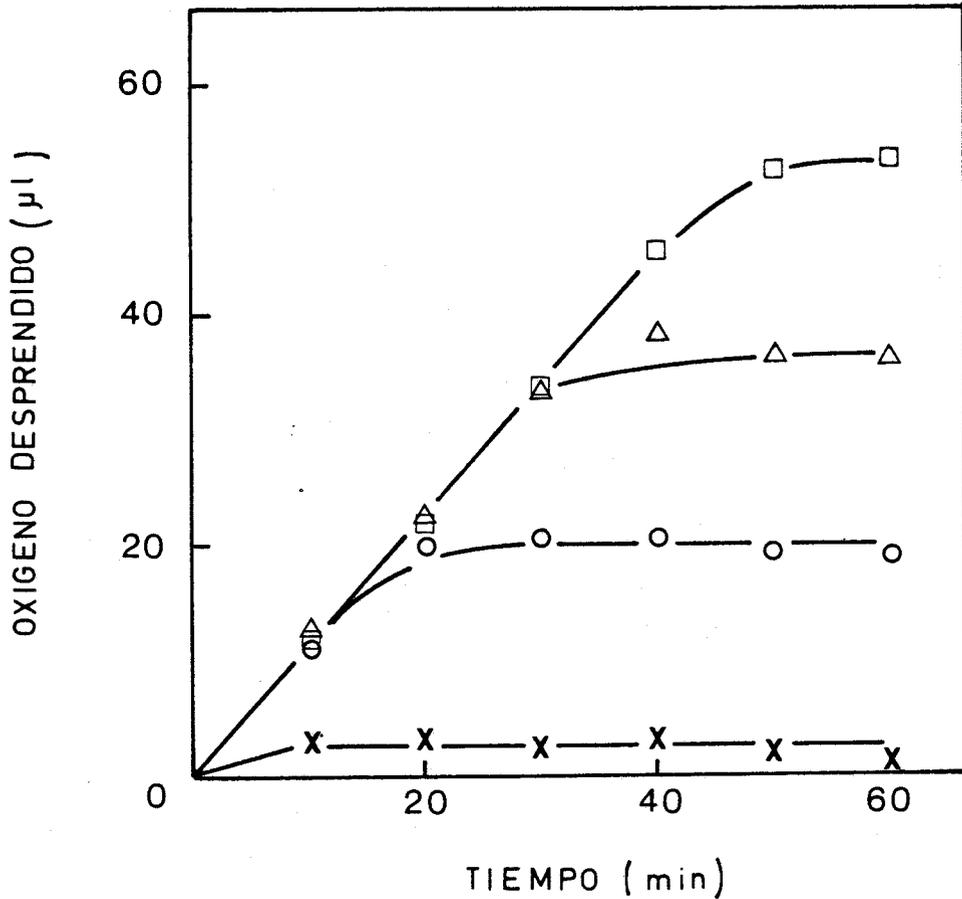
Los valores obtenidos para las estequiometrías correspondientes al desprendimiento de oxígeno asociado a la utilización de nitrato y de nitrito por células de A.nidulans tratadas con MSX se ajustan al desprendimiento de oxígeno esperado según las ecuaciones para la reducción fotosintética de nitrato y de nitrito con agua como donador primario de electrones:



En consecuencia, parece que las reacciones de reducción de nitrato y de nitrito in vivo utilizan electrones procedentes de la fotólisis del agua.

Según los datos presentados parece que, en las condiciones experimentales empleadas, las reacciones lumínicas de la fotosíntesis no constituyen el factor limitante de la velocidad de la misma, ya que la magnitud (en términos de velocidad) del desprendimiento extra de oxígeno asociado a la utilización del nitrato en presencia de CO_2 a concentración saturante es similar a la velocidad de desprendimiento de oxígeno asociada a la utilización del nitrato en ausencia de CO_2 .

El efecto del nitrato sobre el desprendimiento de oxígeno también se ha estudiado en células normales de Anacystis,



Nitrito añadido (μmol)	Oxígeno desprendido (μmol)	Relación O_2/NO_2^-
--	--	-------------------------------------

0,5	0,78	1,56
1,0	1,50	1,50
1,5	2,29	1,53

Figura 21. Desprendimiento de oxígeno asociado al consumo de distintas cantidades de nitrito por células de *A.nidulans* tratadas con MSX, en ausencia de CO_2

El experimento se desarrolló en condiciones similares a las expuestas en la leyenda de la Figura 20, con 5,1 μl de células en 2,5 ml de tampón de ensayo. Las cantidades de NO_2^- añadidas a las distintas vasijas fueron: (X) cero; (O) 0,5 μmol ; (Δ) 1,0 μmol ; (\square) 1,5 μmol . Los datos de desprendimiento de oxígeno que se presentan en la tabla corresponden a los valores encontrados en presencia de nitrito corregidos con el control en ausencia de nitrito.

en presencia de CO_2 . La simple adición de nitrato a una suspensión de células llevando a cabo fijación fotosintética de CO_2 , causa un incremento en la velocidad de desprendimiento de oxígeno (Fig. 22). La estequiometría de oxígeno desprendido asociado a asimilación de nitrato esperada para las células normales sería de 2,5 mol de oxígeno por mol de nitrato, ya que además de los 8 electrones necesarios para reducir el nitrato a amonio, se deben tener en cuenta los 2 electrones por átomo de N necesarios en la aminación reductiva del α -cetoglutarato, que se ha sugerido que en células verdes tienen origen fotosintético (Lea y Mifflin, 1979; véase también apartado 3.1.4.1.). Las estequiometrías observadas de desprendimiento de oxígeno asociado a la utilización del nitrato por células normales son, sin embargo, más altas que las esperadas. En la Figura 23 se presenta un experimento en el que el desprendimiento de oxígeno asociado al consumo de nitrato fué de 3,9 moles de oxígeno por mol de nitrato. El "exceso" de oxígeno extra desprendido (en comparación con los 2,5 moles esperados) causado por la adición de nitrato a suspensiones de células normales podría deberse a una estimulación de la fijación del CO_2 por productos de la asimilación del nitrato, o bien a que se utilice también poder reductor de origen fotosintético en reacciones del metabolismo del nitrógeno posteriores a la incorporación del amonio en esqueletos carbonados.

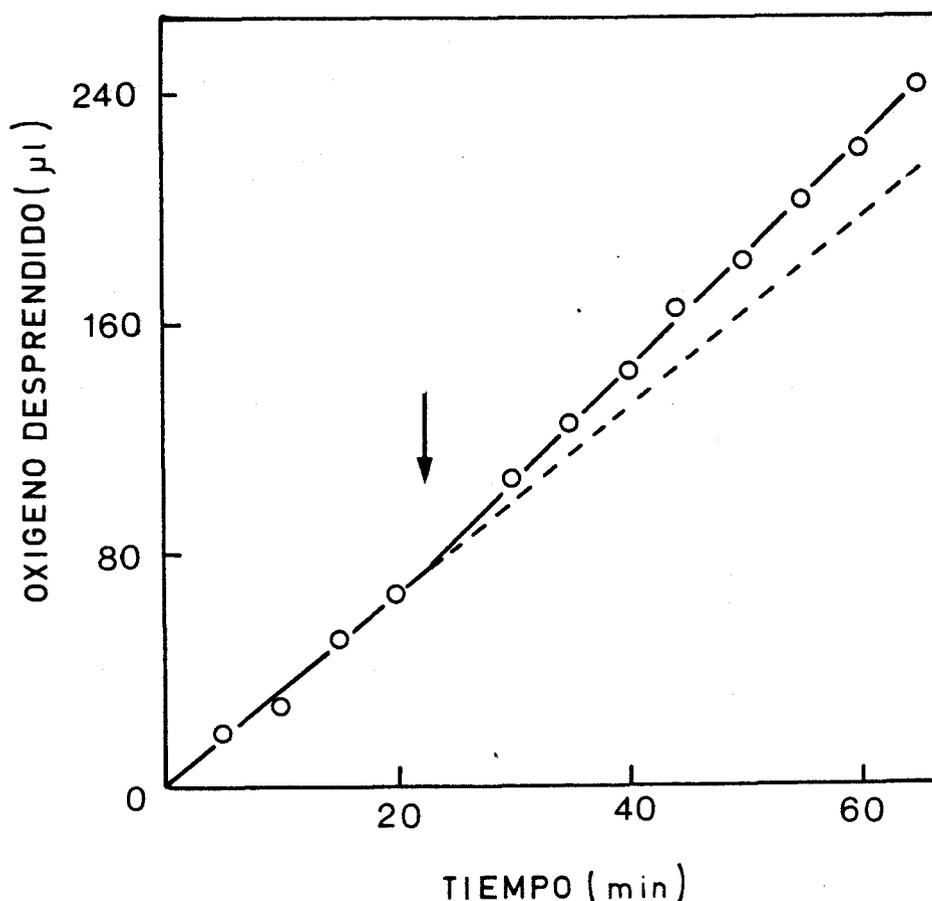


Figura 22. Efecto de la adición de nitrato sobre el desprendimiento de oxígeno por A.nidulans en presencia de CO_2

El experimento se desarrolló en una vasija de Warburg que contenía en el compartimento principal una suspensión con 2,5 μl de células en 2,5 ml de tampón de ensayo y en el pocillo central 0,5 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6. La flecha indica el momento en el que 46 μmol de NO_3K disueltos en agua se volcaron desde el brazo lateral sobre el compartimento principal. La velocidad de desprendimiento de oxígeno fue de 58,9 nmol de $\text{O}_2/\mu\text{l}$ de células·min antes de la adición de nitrato, y de 69,4 nmol de $\text{O}_2/\mu\text{l}$ de células·min después de dicha adición.

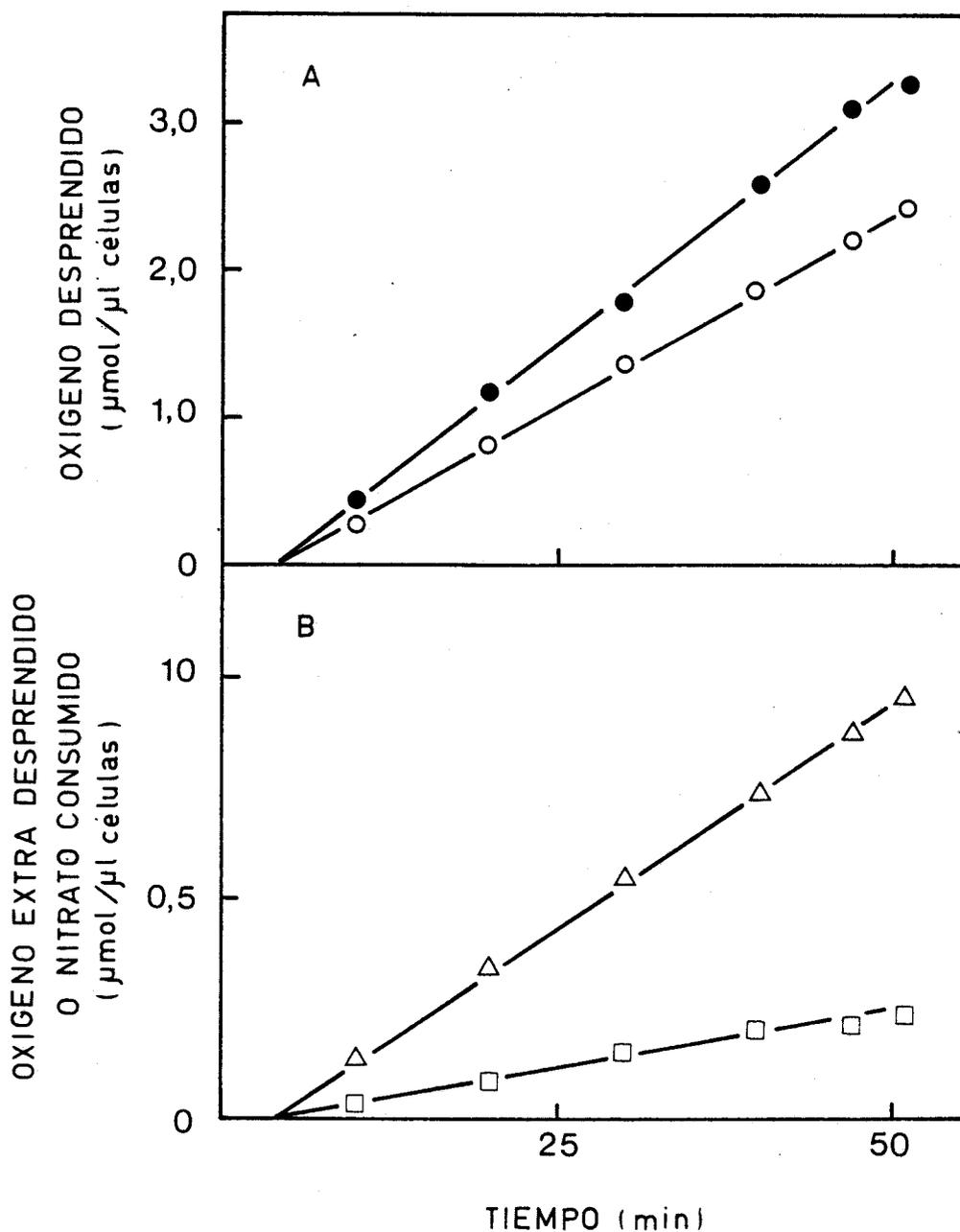


Figura 23. Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrato en A.nidulans, en fase activa de fijación de CO_2

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 3,9 μl de células en 3 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,1 M, pH 10,1, suplementado, en su caso, con NO_3K a una concentración de 0,8 mM. El tiempo cero corresponde al momento de encender la luz. A) Desprendimiento de oxígeno en ausencia (○) o presencia (●) de nitrato. B) Desprendimiento extra de oxígeno asociado al consumo de nitrato (Δ); consumo de nitrato (□).

3.1.4.- Asimilación de amonio mediante su incorporación a esqueletos carbonados

El átomo de nitrógeno presente en la molécula de nitrato, después de ser reducido hasta el término de nitrógeno amoniacal, se incorpora a esqueletos carbonados. En este apartado se discute cuál es la ruta por la que esta incorporación procede, así como algunos aspectos de interés acerca de la fisiología de la asimilación del amonio por células de Anacystis.

3.1.4.1.- Caracterización de la utilización de amonio por las células

Las células de A.nidulans cultivadas en nitrato presentan una notable capacidad de asimilación de amonio cuando se exponen a la luz, especialmente si la suspensión celular se suplementa con bicarbonato (Fig. 24). Curiosamente, estas velocidades de consumo de amonio son similares a las que se observan, en las mismas condiciones experimentales, con células cultivadas en amonio. Si existiese una permeasa específicamente encargada del transporte de amonio en Anacystis, ésta debería ser pues de naturaleza constitutiva, presente incluso en células cultivadas con nitrato además de en células cultivadas con amonio. Sin embargo, la existencia de tal permeasa es incierta, dado que, en una hipótesis alternativa e igualmente posible, podría ocurrir que el consumo de amonio ($pK_a \text{NH}_3/\text{NH}_4^+ = 9,2$) por las células estuviese basado en su entrada por simple difusión

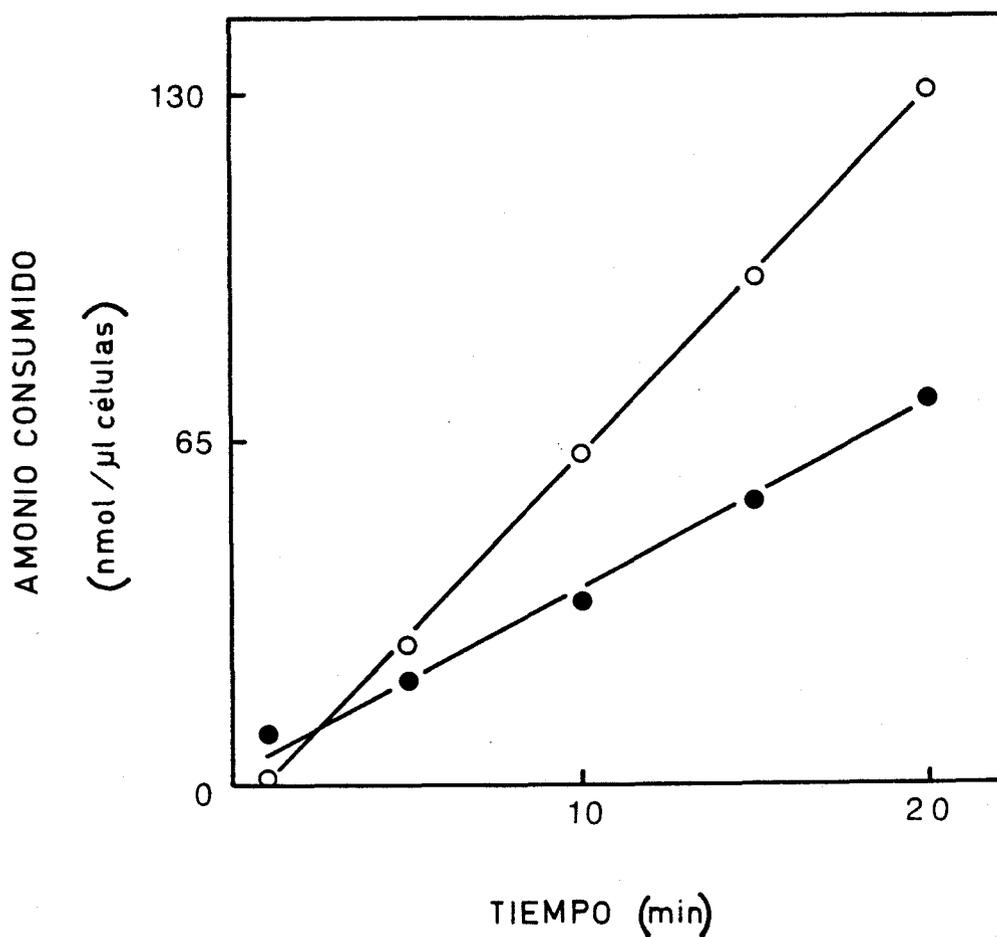


Figura 24. Consumo de amonio por A.nidulans, en presencia y ausencia de bicarbonato.

El experimento se inició por adición de 10 μ l de células (que habían sido cultivadas en medio con nitrato) a 9 ml de una disolución de ClNH_4 0,4 mM en tampón de ensayo suplementado (o) o sin suplementar (●) con CO_3HNa a concentración 10 mM.

como amoniaco, especie molecular a la que las membranas biológicas son altamente permeables (Kleiner, 1981).

La estimulación por bicarbonato del consumo de amonio por A.nidulans (Fig. 24) puede estar relacionada con el requerimiento de CO_2 para la utilización de dicho sustrato (véase la Tabla 2 en la sección 3.1.1.1.). El efecto del CO_2 sobre la asimilación del nitrógeno inorgánico parece implicar la fijación del CO_2 (apartado 3.2.2.). La concentración de CO_2 en disolución en la suspensión celular en las condiciones usadas en los experimentos que se describen en este trabajo es de alrededor de 8 μM , y la presencia de bicarbonato 10 mM determina, al pH de 8,3, una concentración de CO_2 de 100 μM , que satura la fijación del CO_2 . En consecuencia, el efecto de la adición de bicarbonato sobre la asimilación del amonio puede ser un efecto mediado por la fijación del CO_2 . Una cuestión que se plantea es si el CO_2 se requiere para la entrada o para la metabolización intracelular del amonio. La observación de que el amonio resultante de la reducción del nitrito consumido por células en ausencia de CO_2 se excreta al medio (apartado 3.1.1.1.), en lugar de ser incorporado en esqueletos carbonados, indica que el CO_2 se requiere al menos para dicha metabolización intracelular.

La Tabla 12 resume los datos obtenidos en varios experimentos concernientes a la caracterización del consumo de amonio. La velocidad de utilización de amonio se encuentra notablemente disminuída en la oscuridad, así como cuando la suspensión celular se suplementa con DCMU, FCCP o con DCCD (Tabla 12). El

Tabla 12. Efecto de la oscuridad y de algunos inhibidores metabólicos sobre el consumo de amonio por A. nidulans

Condiciones	Consumo de amonio (nmol/ μ l células.min)
Luz	6,0
Oscuridad	1,7
Luz, DCMU (10 μ M)	2,0
Luz, FCCP (10 μ M)	2,6
Luz, DCCD (40 μ M)	1,5

Los experimentos se iniciaron por adición de células procedentes de un cultivo de nitrato a una disolución de ClNH_4 (0,4 mM) y CO_3HNa (10 mM) en tampón de ensayo, suplementado, en su caso, con el inhibidor indicado.

efecto negativo del DCMU sobre el consumo de amonio puede interpretarse en términos de que el paso de reducción implicado en el proceso de incorporación del amonio a esqueletos carbonados tenga carácter fotosintético. La dependencia de energía metabólica que presenta el proceso podría, sin embargo, estar localizada en el propio sistema de incorporación del amonio a esqueletos carbonados o/y en el paso de entrada del amonio al interior de la célula.

Aunque no pueda excluirse un requerimiento de energía para la entrada del amonio en la célula, existe una clara dependencia por ATP en el paso de incorporación de amonio a esqueletos carbonados. Como se expuso en el apartado 3.1.2.3., en células tratadas con DCCD tiene lugar una entrada pasiva de nitrito, el cual se reduce inmediatamente a amonio en el interior de la célula. Como se muestra en la Figura 25, este amonio es liberado al medio por las células tratadas con DCCD, al contrario de las células normales no tratadas, que no liberan al medio como amonio el nitrito que consumen. (Las células tratadas con DCCD tampoco presentan tal liberación de amonio al medio si se incuban en ausencia de un sustrato nitrogenado adecuado, como el nitrito). La observación que se acaba de presentar indica que la asimilación intracelular de amonio requiere ATP, ya que se inhibe drásticamente por el DCCD, inhibidor de ATPasas. Se desconoce por el momento la razón por la que la inhibición por DCCD de la incorporación de amonio a esqueletos carbonados es más drástica que la inhibición directa sobre el consumo de amonio.

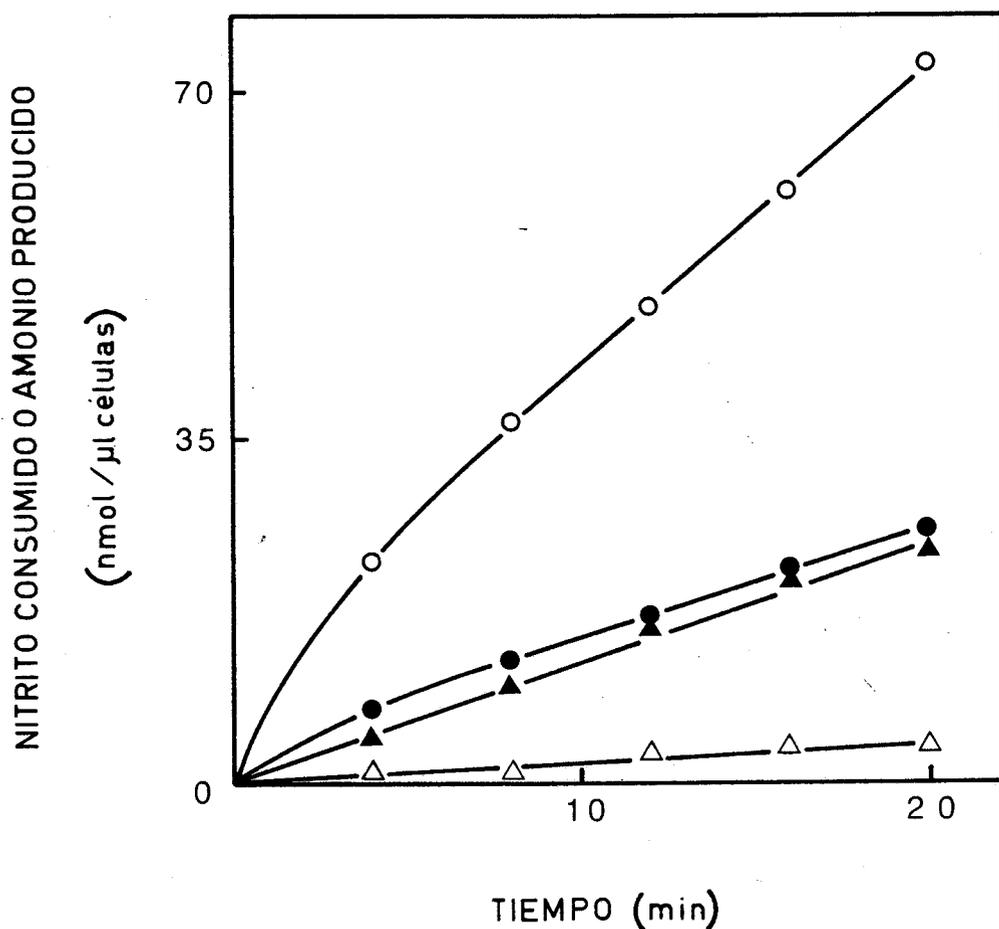


Figura 25. Producción de amonio asociada al consumo de nitrito por células de A.nidulans tratadas con DCCD

El experimento se inició por adición de NO_2K (concentración final, 0,2 mM) a una suspensión celular que contenía 2,3 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado (símbolos negros) o sin suplementar (símbolos blancos) con DCCD a concentración 50 μM , tras 5 min de incubación en las condiciones experimentales. Consumo de nitrito (círculos); producción de amonio (triángulos).

3.1.4.2.- Glutamina sintetasa-glutamato sintasa: la ruta de asimilación del amonio en A. nidulans

De las rutas conocidas en microorganismos para la asimilación del amonio sólo la de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) presenta un requerimiento de energía. Los resultados que se acaban de presentar indicando la dependencia por ATP de la incorporación del amonio en A.nidulans sugieren, en consecuencia, que esta ruta es la más importante cuantitativamente para la asimilación de amonio por esta especie.

Otra línea de observaciones que apoya la noción del papel prioritario de la ruta GS/GOGAT en la asimilación del amonio en Anacystis incluye los efectos de inhibidores específicos de las enzimas de esta ruta sobre el consumo de amonio y sobre los niveles celulares de los aminoácidos productos de las reacciones de la ruta.

La L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX) es un análogo del glutamato que se une a la glutamina sintetasa, a la que inactiva tras ser fosforilada en el sitio activo de la propia enzima (Ronzio et al., 1969). El tratamiento de suspensiones de Anacys-tis durante cortos períodos de tiempo con MSX a concentración 1 mM provoca una drástica disminución de la capacidad de las células para asimilar amonio (Fig. 26), lo que es indicativo del papel clave de la glutamina sintetasa en la incorporación del amonio en Anacystis. Para suspensiones conteniendo alrededor de 2 μ l de células por ml, es suficiente una incubación durante 5-10 min con MSX (1 mM) para provocar la inhibición del consumo

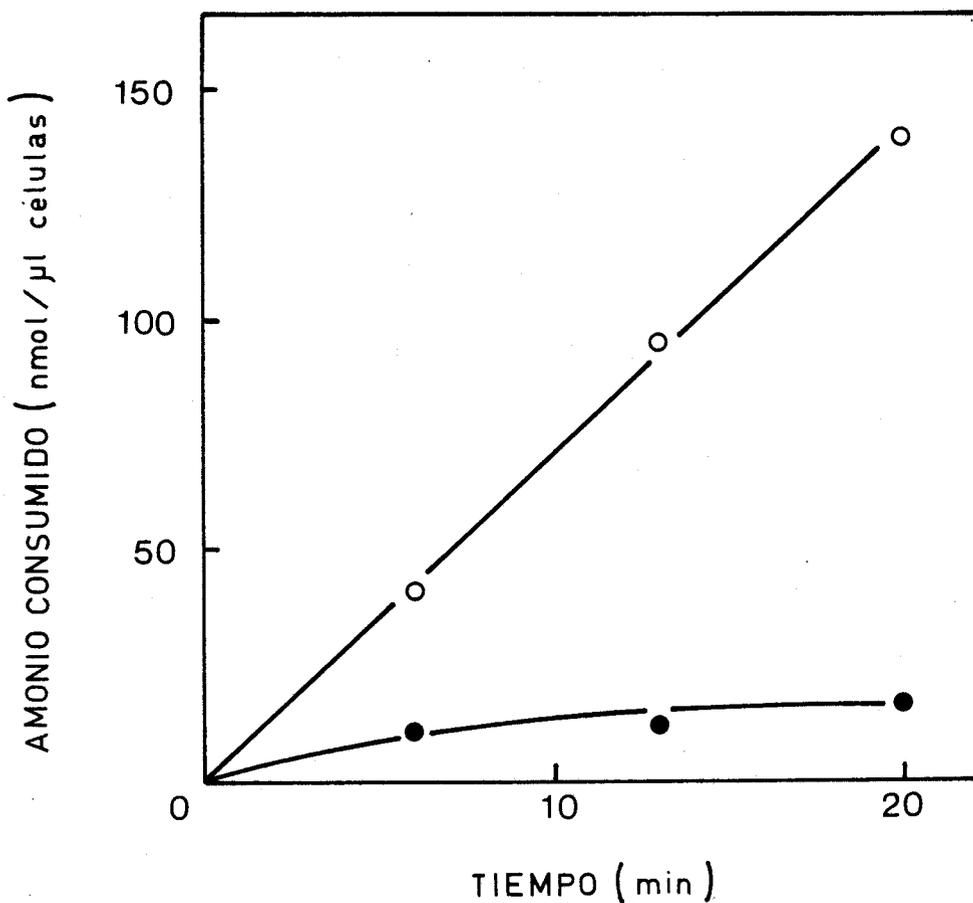


Figura 26. Efecto del pretratamiento con MSX sobre el consumo de amonio en A.nidulans

El experimento se inició por adición de células (1 μ l de células por ml) a una disolución de ClNH_4 0,4 mM y CO_3HNa 10 mM en tampón de ensayo. Se utilizaron células normales (o) o que habían sido tratadas con MSX (●). Este tratamiento consistió en la incubación durante 20 min de una suspensión conteniendo 3,9 μ l de células por ml de tampón de ensayo suplementado con MSX 1 mM.

de amonio.

La hidroxilisina, que es un inhibidor competitivo de la glutamina sintetasa con respecto al glutamato (Ladha et al., 1978), también inhibe, aunque sólo parcialmente, el consumo de amonio en Anacystis: una concentración 10 mM de hidroxilisina inhibe en un 45% la utilización de este sustrato.

En la segunda reacción de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa, la catalizada por la enzima glutamato sintasa, el grupo amido de la glutamina es transferido al α -cetoglutarato para formar glutamato. Esta reacción se inhibe por la azaserina, un inhibidor general de las glutamina-amido transferasas (Prusimer y Stadtman, 1973). Durante el estudio del efecto de la azaserina sobre el consumo de amonio por Anacystis se hizo evidente que para que este agente inhibiera la utilización del amonio, las células tenían que haber sido preincubadas con el inhibidor en un medio sin amonio. Además, la inhibición del proceso se mantenía en las células tratadas con azaserina aún después de que el inhibidor se retirara del medio. La azaserina se comporta pues como un agente inactivante de las enzimas transferidoras del grupo amido de la glutamina. La Figura 27A muestra la falta de efecto negativo a corto plazo de la presencia de azaserina (1 mM) en el ensayo sobre el consumo de amonio por células normales. Por el contrario, células pretratadas con azaserina (1 mM, 20 min) en tampón tricina, sin otras adiciones, manifiestan una capacidad muy disminuída de consumo de amonio (Fig. 27B; notese que el ensayo de utilización de amonio se hace en un medio libre de

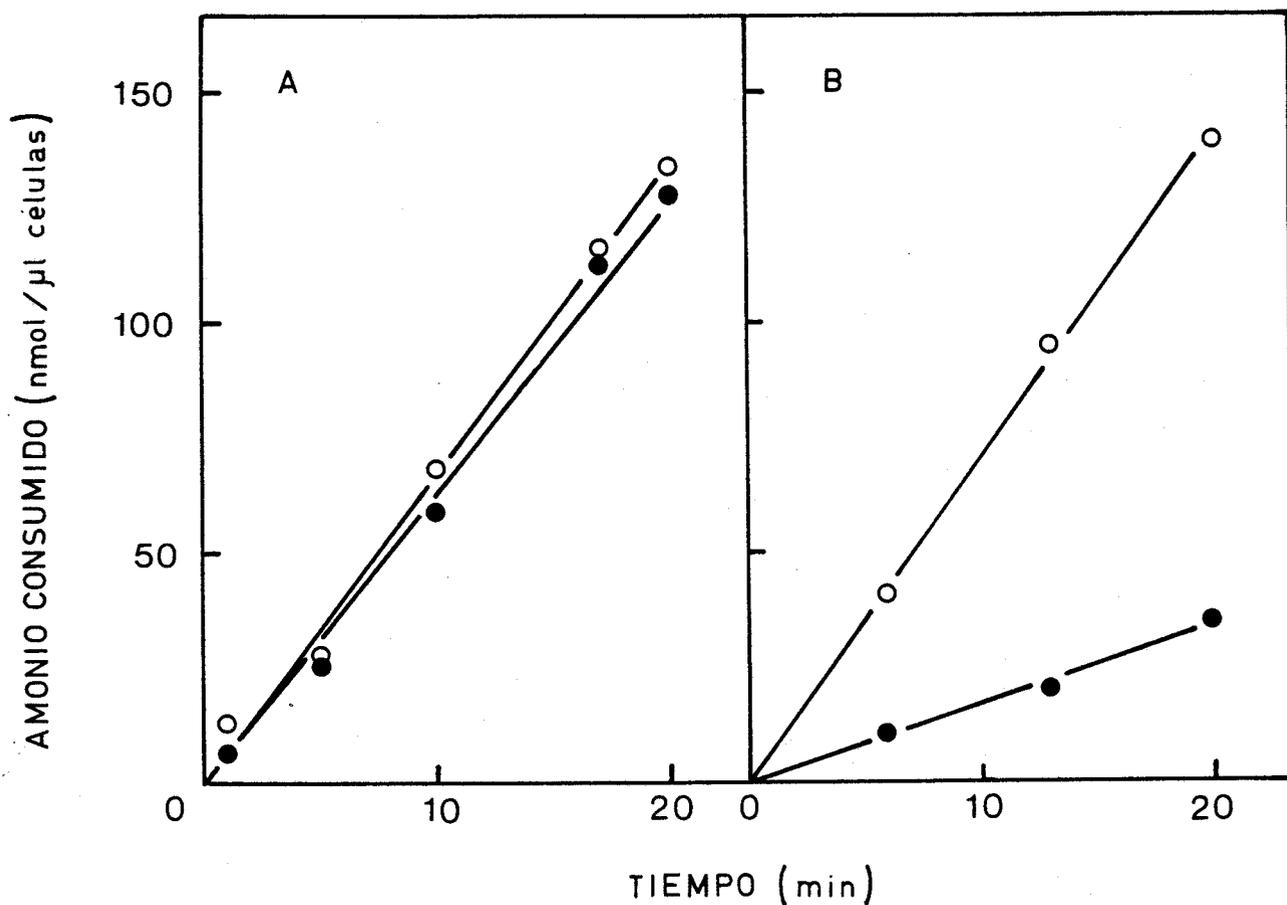


Figura 27. Efecto de la azaserina sobre el consumo de amonio en *A. nidulans*

(A) El experimento se inició por adición de 1 μ l por ml (concentración final) de células normales (cultivadas en nitrato y sin ningún tratamiento previo) a una disolución de ClNH_4 0,4 mM y CO_3HNa 10 mM en tampón de ensayo, sin suplementar (○) o suplementada (●) con azaserina a concentración 1 mM. (B) El experimento se inició por adición de células (1 μ l de células por ml, concentración final) normales (○) o que habían sido pretratadas con azaserina (●) a una disolución de ClNH_4 0,4 mM y CO_3HNa 10 mM en tampón de ensayo. El tratamiento con azaserina consistió en la incubación con una concentración 1 mM de este inhibidor de 3,9 μ l de células por ml de tampón de ensayo, durante 20 min.

azaserina). Una explicación posible para el hecho de que la azaserina ejerza su efecto inactivante en suspensiones celulares sin amonio pero no en presencia de este sustrato, es que los elevados niveles celulares de glutamina que determina la presencia de amonio (véase por ejemplo Tabla 13), protejan a las glutamina-amido transferasas contra la acción de la azaserina. Esta interpretación se ve apoyada por algunas observaciones sobre la acción de la azaserina sobre enzimas purificadas (Prusiner y Stadtman, 1973). Por otra parte, el hecho de que la inactivación por azaserina resulte en una inhibición del consumo de amonio puede deberse a la carencia de glutamato originada por la inhibición de la glutamato sintasa. Según venimos considerando, el glutamato es sustrato de la glutamina sintetasa, primera enzima que metaboliza el amonio en A. nidulans.

El glutamato formado en la reacción catalizada por la glutamato sintasa es el principal distribuidor del N procedente del amonio para la síntesis de los componentes celulares nitrogenados. Unas enzimas importantes en esta distribución del N son las transaminasas, que contienen piridoxal fosfato como grupo prostético, lo que las hace sensibles al aminooxiacetato, agente inhibidor de enzimas que contienen piridoxal fosfato (Rognstad y Clark, 1974). El aminooxiacetato (1 mM) inhibe fuertemente (90% de inhibición, media de cinco experimentos) el consumo de amonio por A. nidulans. La interpretación de este resultado se encuentra dificultada por el desconocimiento actual sobre la especificidad de acción del inhibidor.

Los resultados expuestos hasta el momento son notablemente consistentes con la propuesta de que la glutamina sintetasa /glutamato sintasa sea la ruta principal de asimilación de amonio en Anacystis nidulans. En este mismo sentido abundan los efectos del MSX y de la azaserina sobre los niveles celulares de glutamato y de glutamina en células en presencia de amonio.

Las células de Anacystis cultivadas en nitrato presentan altos niveles celulares de glutamato y bajos niveles de glutamina cuando se incuban en presencia de nitrato (Tabla 13). Por el contrario, cuando estas células se incuban en presencia de amonio, los niveles celulares de glutamato son bajos mientras que los de glutamina son altos (Tabla 13; véase también apartado 3.2.4.). El tratamiento de las células con MSX previene de la acumulación celular de glutamina en respuesta a la presencia de amonio (Tabla 13), como es de esperar por la falta de actividad glutamina sintetasa en estas células. Las células tratadas con azaserina presentan, sin embargo, niveles más altos de glutamina que de glutamato (Tabla 13), siendo especialmente interesante que el nivel de glutamato sea menor que el que presentan las células normales en presencia de amonio (Tabla 13). Estos datos se pueden interpretar en términos de la intervención de una glutamina-amido transferasa como principal enzima responsable de la síntesis de glutamato en Anacystis, esto es, la glutamato sintasa. Tras la adición del amonio a las células tratadas con azaserina, la glutamina se sintetizará a expensas del glutamato presente en las células cultivadas en nitrato. La falta

Tabla 13. Efecto de la fuente de nitrógeno y del MSX y de la azaserina sobre los contenidos celulares de glutamato y de glutamina en células de A. nidulans procedentes de un cultivo sobre nitrato

Adición	Pretratamiento	Contenido celular (nmol/ μ l células)		
		Gln	Glu	Gln + Glu
Nitrato		4,4	9,8	14,2
Amonio		17,6	2,6	20,2
Amonio	MSX	2,8	5,9	8,7
Amonio	Azaserina	13,6	0,5	14,1

1,7 μ l de células por ml se incubaron con o sin inhibidor (1 mM, MSX o azaserina) durante 15 min, a la luz, en ausencia de fuente de nitrógeno. Tras ser lavadas, las células se incubaron con NO_3K (0,57 mM) o con ClNH_4 (0,57 mM), en tampón de ensayo a la luz, durante 10 min, tras los cuales se prepararon los extractos celulares por adición de ácido perclórico.

de una ruta alternativa a la glutamato sintasa, de importancia para la síntesis de glutamato, debe ser la causa determinante de los bajos niveles de este aminoácido en las células tratadas con azaserina.

Los resultados presentados en este apartado demuestran el papel prioritario de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa en la asimilación del amonio en las células de A.nidulans cultivadas en nitrato. En los experimentos expuestos se ha estudiado la utilización de amonio por este tipo de células. Una cuestión que se podría plantear es si el amonio procedente de la reducción del nitrato se incorpora por esta misma ruta. Este parece, en efecto, ser el caso, ya que, como se ha mencionado ya repetidas veces en los apartados anteriores (véase por ejemplo la Fig. 3), en presencia de nitrato las células tratadas con MSX liberan al medio una cantidad de amonio próxima (90%) a la de nitrato utilizado.

3.2.- REGULACION DE LA UTILIZACION DEL NITRATO

En la descripción que se acaba de hacer de propiedades del proceso de utilización del nitrato en Anacystis nidulans ha quedado patente que la asimilación de dicho nutriente depende de la disponibilidad de poder reductor y de ATP. Así, los niveles celulares de ambos componentes del poder asimilatorio deben influir sobre la velocidad de asimilación del nitrato. En consecuencia, la utilización del nitrato puede ser regulada por una combinación de factores y procesos que afecten a los niveles celulares de poder reductor y ATP, bien a través de su generación (como la luz) o de su consumo (como la operación de toda una serie de rutas metabólicas). Por ejemplo, en condiciones de limitación de luz es presumible que tenga lugar una competencia por el poder asimilatorio fotosintético entre la asimilación del nitrato y otros procesos que hagan uso del poder reductor y el ATP generados a la luz.

Entre los resultados presentados en la Tabla 3 (apartado 3.1.1.), resalta la drástica inhibición que ejerce el amonio sobre el consumo de nitrato. Por otra parte, también se han expuesto datos indicando el estricto requerimiento por CO_2 que presenta la utilización del nitrato (Tabla 2). A continuación se presenta un estudio más detallado de los efectos de ambos compuestos sobre la utilización de nitrato por A.nidulans, que conduce a la interpretación de su acción en términos de su participación en un sistema integrado de regulación de la asimilación del nitrato en función del balance C/N de la célula.

3.2.1.- Papel del amonio en la regulación de la utilización del nitrato

En este apartado se presenta una serie de resultados que indican la participación del amonio en la regulación de la utilización del nitrato en A.nidulans. Este efecto regulador del amonio parece requerir la metabolización del mismo a través de su incorporación a esqueletos carbonados, generándose unos metabolitos con efecto inhibitor sobre el consumo de nitrato, que afectan, al parecer, al transporte de este anión al interior de la célula. La evidencia disponible señala la operación de este sistema de regulación, en ausencia de amonio añadido, a través del amonio resultante de la reducción de nitrato.

Toda una serie de peculiaridades, incluyendo las bajas concentraciones requeridas, separan este efecto específico del amonio de otro efecto inhibitor más general de este compuesto sobre la fotosíntesis, que también se ha caracterizado y que se presenta en el Apartado 3.3.

3.2.1.1.- Inhibición de la utilización del nitrato conectada con el consumo de amonio

La adición de concentraciones de amonio tan bajas como 50 μM a suspensiones de células de Anacystis en fase de activo consumo de nitrato resulta en una drástica inhibición del consumo de este último nutriente (Fig. 28). (El amonio se añade en forma de sal de ClNH_4 , habiéndose comprobado que el ión Cl^- no

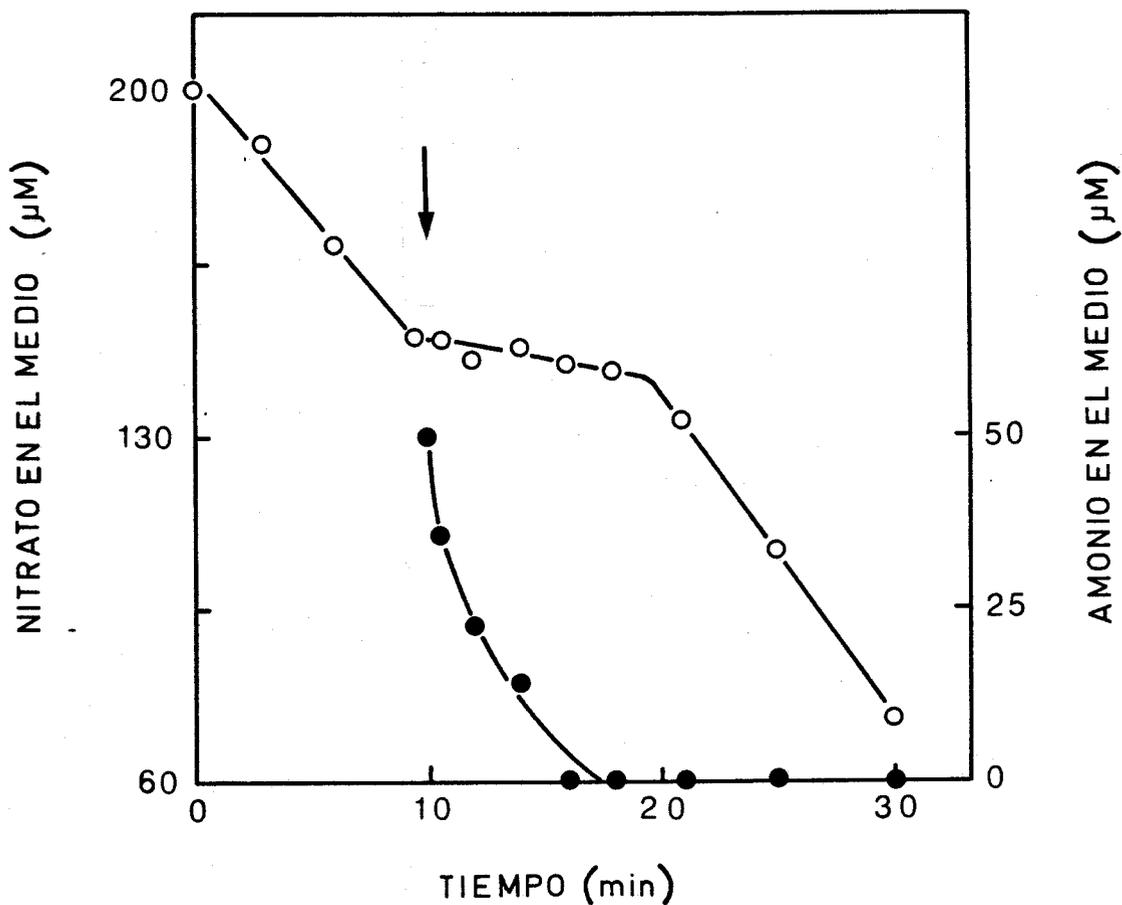


Figura 28. Cinética de la asimilación de nitrato y de su inhibición por amonio en A.nidulans

El experimento se llevó a cabo con una suspensión que contenía 2 μ l de células por ml de tampón de ensayo, y se inició por adición de NO_3K a la concentración indicada. En el momento señalado por la flecha se añadió ClNH_4 (concentración final, 50 μM).

inhibe el consumo de nitrato en Anacystis cuando se encuentra presente en el medio a las concentraciones usadas en estos experimentos). Una característica importante de esta inhibición es su reversibilidad, ya que aunque ésta se mantiene mientras queda amonio en el medio a niveles detectables, el consumo de nitrato se reanuda tan pronto como el amonio desaparece del medio, al ser consumido por las células (Fig. 28).

La inhibición por amonio a baja concentración de la utilización del nitrato parece estar relacionada con la asimilación del amonio por las células más que con la simple presencia del amonio en el medio, como sugiere el experimento que se expone a continuación. En la Figura 29 se presentan los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la adición de amonio sobre el consumo de nitrato en suspensiones celulares suplementadas con bicarbonato, incluyéndose con fines comparativos datos de un experimento sin bicarbonato añadido. Como se observa en dicha figura, la presencia de bicarbonato resulta en un incremento en la velocidad de consumo de nitrato. Además, la inhibición por amonio de la utilización del nitrato en estas suspensiones celulares suplementadas con bicarbonato no es tan abrupta como la observada para el caso de ausencia de bicarbonato añadido, sino que ocurre de forma progresiva. Aunque la magnitud de la inhibición por amonio llega a ser la misma en ambos casos, la inhibición máxima tarda en desarrollarse unos 5 min en presencia de bicarbonato, mientras que es inmediata (menos de 30 s) en los experimentos sin bicarbonato añadido. Por otra

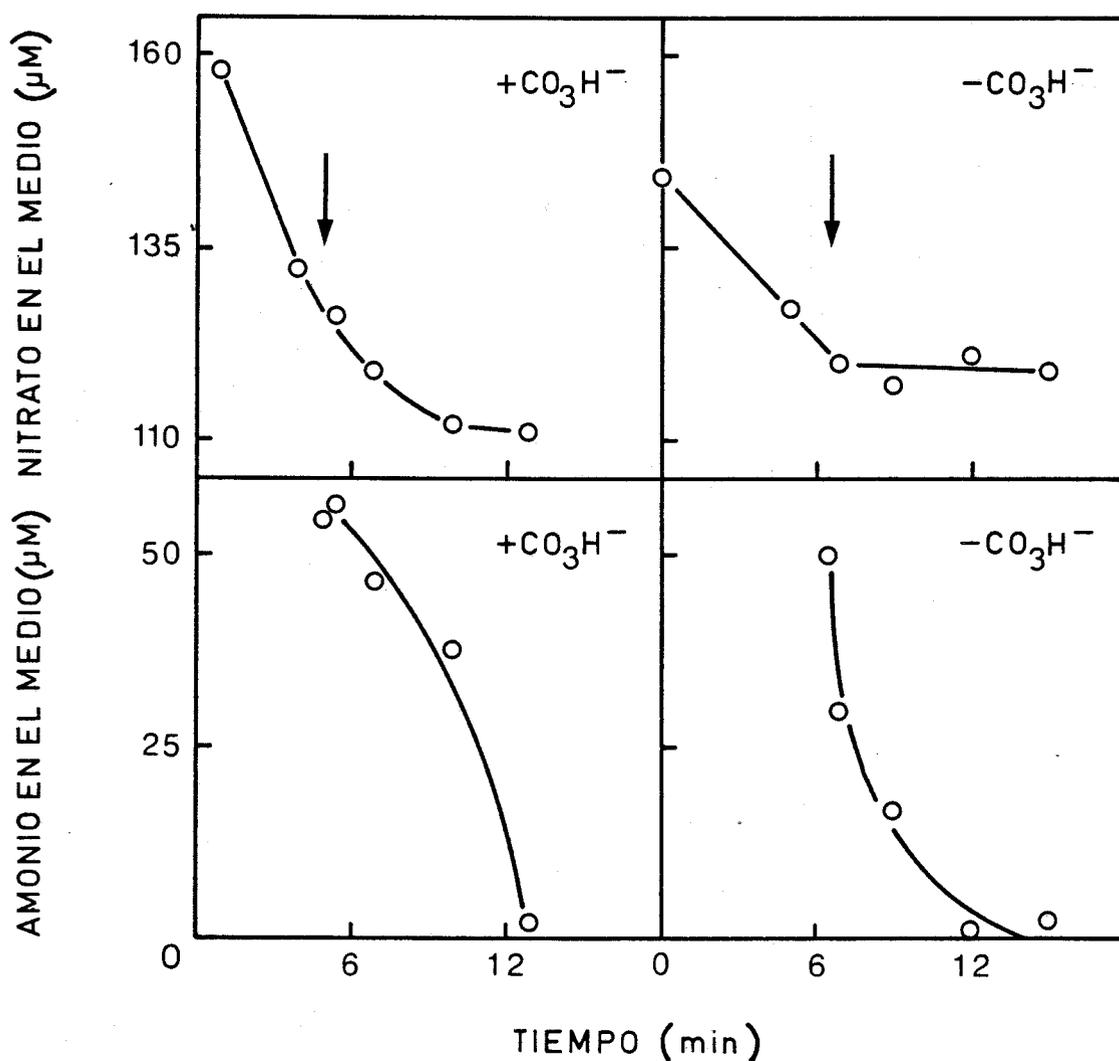


Figura 29. Dependencia por el consumo de amonio de la inhibición por amonio de la utilización del nitrato en A.nidulans

En los momentos indicados por las flechas se añadió ClNH_4 a suspensiones celulares utilizando nitrato y conteniendo $1,2 \mu\text{l}$ de células y $10 \mu\text{mol}$ de CO_3HNa por ml de tampón de ensayo (izquierda) o $2 \mu\text{l}$ de células por ml de tampón de ensayo, sin bicarbonato añadido (derecha).

parte, también se observan diferencias significativas con respecto a la cinética de consumo de amonio por estas suspensiones celulares (Fig. 29). La suspensión suplementada con bicarbonato exhibe una velocidad inicial de utilización del amonio más baja que la suspensión sin bicarbonato añadido. Así, la cinética de la inhibición por amonio del consumo de nitrato parece depender del patrón de utilización del amonio.

Aunque no se han identificado las bases de la cinética anormal de la utilización de amonio por las células suplementadas con bicarbonato y consumiendo nitrato activamente, estos resultados indican que la inhibición por amonio de la utilización del nitrato se encuentra relacionada con el consumo de amonio por las células, más que con la simple presencia de este compuesto en el medio externo.

3.2.1.2.- Intervención de productos de la asimilación del amonio

Como se discutió en el Apartado 3.1.1.2., el consumo de amonio, tal como se estima en este trabajo, implica no sólo su entrada en la célula, sino también su metabolización. Con objeto de obtener alguna información sobre los pasos de asimilación que debe cubrir el nitrógeno del amonio para ejercer la inhibición, se ha estudiado el efecto de varios inhibidores de las enzimas de la ruta preferente de incorporación del amonio en Anacystis (la de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa) sobre

el consumo de nitrato y sobre su inhibición por amonio. Los inhibidores utilizados han sido la metionina-sulfoximina (MSX) y la hidroxilisina (ambos inhibidores de la glutamina sintetasa), la azaserina (inhibidor de la transferencia del grupo amido de la glutamina a diversos aceptores) y el aminooxiacetato (inhibidor de transaminasas).

Las células de A.nidulans tratadas con MSX manifiestan una actividad de utilización de nitrato 3 a 4 veces superior a la de las células normales no tratadas (Fig.30). Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en estas últimas, la adición de amonio a la suspensión de células tratadas con MSX no resulta en inhibición del consumo de nitrato (Fig. 30). Se ha estudiado también el efecto sobre el consumo de nitrato de la adición de MSX (1 mM, concentración final) a una suspensión de células suplementada con nitrato y amonio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31, incluyéndose también el efecto de la adición del inhibidor sobre el nivel celular de glutamina sintetasa. Como se puede observar, las células no presentan inicialmente consumo de nitrato, como cabe esperar dada la presencia de amonio en el medio. La adición de MSX provoca una rápida y progresiva inactivación de la glutamina sintetasa. Una vez que dicha inactivación se ha completado, unos 15 min después de la adición del inhibidor, las células empiezan a consumir nitrato con una notable velocidad (Fig. 31).

Mientras que el mantenimiento de la inhibición por amonio en presencia de la MSX hubiera indicado una implicación

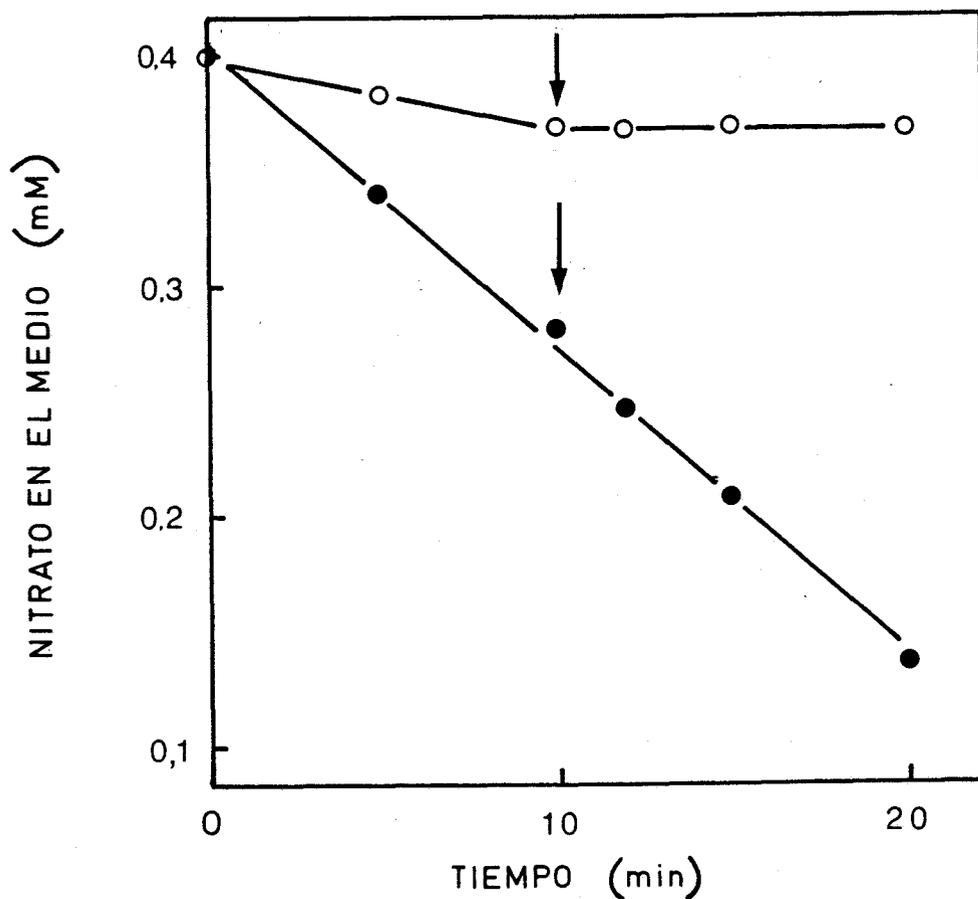


Figura 30. Estimulación de la utilización del nitrato en A.nidulans, y prevención de su inhibición por amonio, por tratamiento de las células con MSX

En el momento indicado por las flechas se añadió ClNH_4 (concentración final, 0,2 mM) a suspensiones conteniendo 1,8 μl de células por ml de tampón de ensayo sin MSX (o), o suplementado con MSX a concentración 1 mM (●).

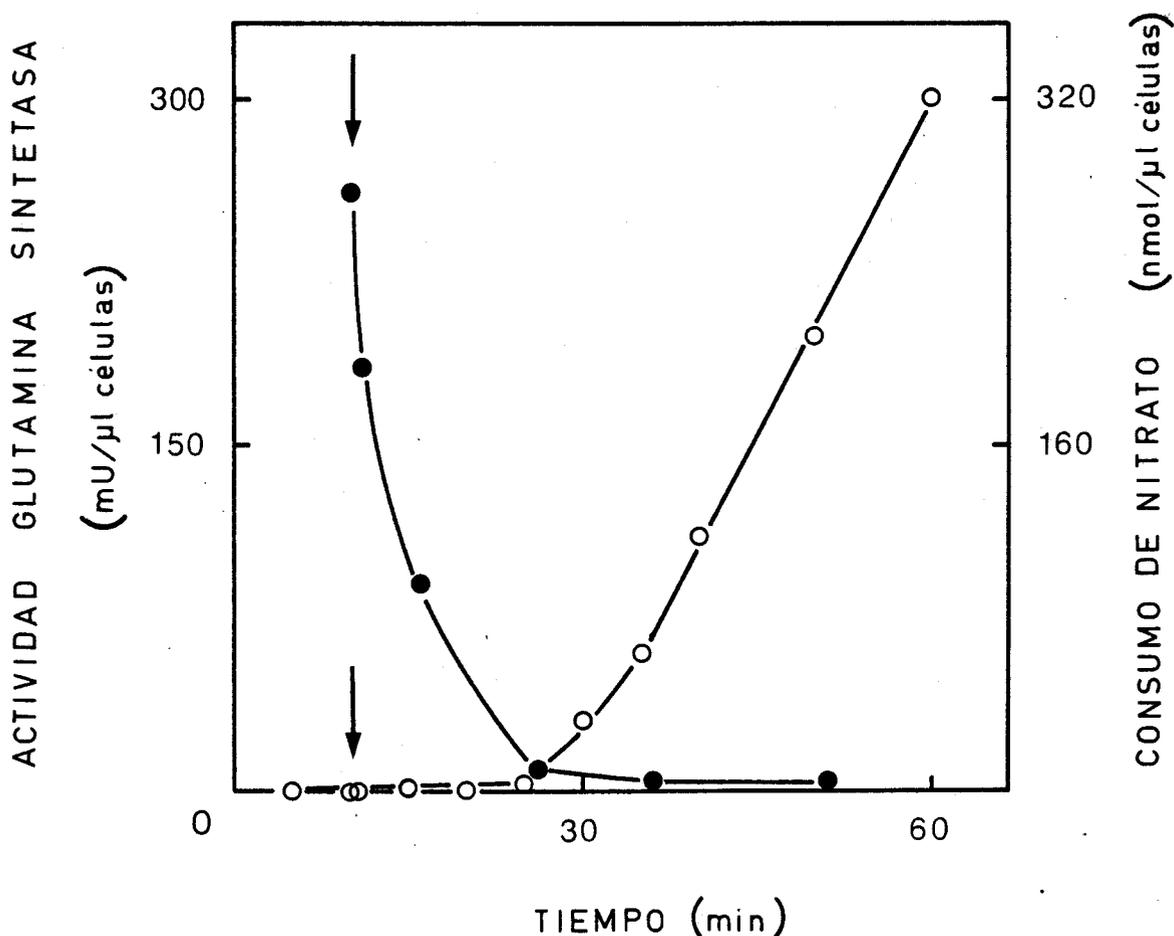


Figura 31. Efecto de la adición de MSX sobre la actividad glutamina sintetasa y sobre el consumo de nitrato de una suspensión de células de A. nidulans suplementada con nitrato y amonio

El experimento se llevó a cabo con una suspensión conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 50 mM, pH 8,1, suplementado con NO_3K 0,5 mM y ClNH_4 0,5 mM, y se comenzó encendiendo la luz. Tras 10 min de iluminación se añadió el MSX a concentración final de 1 mM (la flecha indica el momento de la adición). El nitrato se determinó en alícuotas de la suspensión celular tras retirar las células por filtración. La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinó en células permeabilizadas por tratamiento con etanol al 75%. (o) Consumo de nitrato; (●) actividad glutamina sintetasa.

del transporte de amonio, la prevención por MSX del efecto negativo del amonio confirma que la presencia del amonio en el medio no es suficiente para inhibir el consumo de nitrato. Estos resultados sugieren, además, un papel activo de la incorporación del amonio a esqueletos carbonados en la regulación, por inhibición, del consumo de nitrato. Incluso en condiciones de ausencia de amonio añadido, esto es, en células utilizando únicamente nitrato como fuente de nitrógeno, la incorporación del amonio resultante de la reducción del nitrato parece estar ejerciendo un control sobre la velocidad de consumo de nitrato, ya que ésta se estimula notablemente en respuesta al tratamiento de las células con MSX (Fig. 30). La MSX no tiene, sin embargo, en estas condiciones, ningún efecto significativo sobre la actividad celular de nitrato reductasa ni sobre la velocidad de fijación de CO_2 por A.nidulans (Tabla 14).

La hidroxilisina, un inhibidor de la glutamina sintasa menos efectivo que la MSX (apartado 3.1.4.2.), libera parcialmente al consumo de nitrato de la inhibición por amonio cuando se usa a concentraciones que llegan a inhibir parcialmente la utilización de este último sustrato. Esto se observa claramente en los resultados que se exponen en la Tabla 15, a pesar de que la propia hidroxilisina, a diferencia de lo que ocurría con la MSX, presenta un cierto efecto inhibitor sobre el consumo de nitrato.

Las células tratadas con azaserina, inhibidor de glutamato sintasa, presentan un comportamiento muy similar al de las

Tabla 14. Nivel de nitrato reductasa y actividad de fijación de CO₂ en células de A. nidulans tratadas y sin tratar con MSX

Adición	Nitrato reductasa ^a (mU/μl células)	Fijación de CO ₂ ^b (nmol/μl células.min)
Ninguna	35,5	43,1
MSX	37,8	42,7

^aLa actividad nitrato reductasa se determinó en células permeabilizadas por toluenización, 10 min después de la adición de NO₃K (0,4 mM) a una suspensión celular conteniendo 2,6 μl de células por ml de tampón de ensayo, que había sido preincubada durante 10 min a la luz, con o sin MSX 1 mM.

^bLos valores son la media de cuatro determinaciones. La actividad de fijación de CO₂ se estimó como desprendimiento de oxígeno dependiente de CO₂ y luz. Los experimentos se desarrollaron en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal de 2,75 a 3,0 μl de células en 2,75 ml de tampón de ensayo, suplementado o sin suplementar con MSX 1 mM, y en el pocillo central 0,25 ml de tampón CO₃HNa/CO₃Na₂ 0,5 M, pH 9,6.

Tabla 15. Prevención por hidroxilisina del consumo de amonio y de su efecto inhibitor sobre la utilización de nitrato por A. nidulans

Adiciones	Sustrato consumido (nmol/ μ l células)	
	Amonio	Nitrato
Amonio	74	-
Amonio, hidroxilisina	41	-
Nitrato	-	68
Nitrato, amonio	N.D.	0
Nitrato, hidroxilisina	-	51
Nitrato, hidroxilisina, amonio	N.D.	28

El ensayo se inició por adición de ClNH_4 (0,4 mM, concentración final) y/o NO_3K (0,2 mM, concentración final) a suspensiones conteniendo 2,2 μ l de células por ml de tampón tricina-NaOH 40 mM, pH 8,3, sin suplementar o suplementado con hidroxilisina a concentración 10 mM, tras una incubación de 10 min en las mismas condiciones del ensayo. Los valores presentados en la tabla corresponden a la cantidad de sustrato consumido en 20 min.

N.D.: No determinado

células tratadas con MSX en lo que se refiere a la velocidad de consumo de nitrato que exhiben y a su insensibilidad a la inhibición por amonio (Tabla 16). La liberación por azaserina del efecto negativo del amonio sobre el consumo de nitrato confirma la necesidad de que el amonio se incorpore por la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa para que pueda ejercer su efecto inhibitor, y sugiere la necesidad del funcionamiento de las glutamina-amido transferasas para que dicho efecto se manifieste.

A diferencia de lo que ocurre con los inhibidores de la asimilación de amonio cuyos efectos se acaban de describir, el inhibidor de transaminasas aminooxiacetato afecta drásticamente al consumo de nitrato por células de Anacystis, no ejerciendo, además, protección significativa de la utilización del nitrato frente a su inhibición por amonio (Tabla 17). Cabe resaltar que el efecto negativo del aminooxiacetato sobre el consumo de nitrato no se observa en células preincubadas con MSX antes de la adición del aminooxiacetato (Tabla 18), lo que elimina la posibilidad de que dicho efecto sea debido a una acción negativa directa del aminooxiacetato sobre algún componente del sistema de asimilación del nitrato. Los efectos del aminooxiacetato que se acaban de describir indican que la inhibición de las transaminasas no sólo no impide el efecto inhibitor del amonio, sino que provoca que el consumo de nitrato resulte en su propia inhibición. Esta visión se confirma por el hecho, observado reiteradamente, de que el consumo de nitrato por células incubadas en presencia de aminooxiacetato deja de tener lugar

Tabla 16. Comparación de los efectos de MSX y azaserina sobre el consumo de nitrato y su inhibición por amonio en A. nidulans

Adiciones	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)
Ninguna	33
Amonio	1
MSX	104
MSX, amonio	98
Azaserina	111
Azaserina, amonio	101

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 2,1 μ l de células por ml de tampón. Las concentraciones fueron: NO_3K , 0,4 mM; ClNH_4 , 0,4 mM; MSX, 1 mM; azaserina, 1 mM. Los inhibidores se añadieron 10 min antes que el nitrato y, en su caso, el amonio. Los datos corresponden al nitrato desaparecido del medio en 20 min.

Tabla 17. Efecto del aminooxiacetato sobre el consumo de amonio y de nitrato y sobre la inhibición de éste por amonio en A. nidulans

Adiciones	Sustrato consumido (nmol/ μ l células)	
	NH_4^+	NO_3^-
Amonio	92	-
Amonio, aminooxiacetato	16	-
Nitrato	-	76
Nitrato, amonio	98	6
Nitrato, aminooxiacetato	-	17
Nitrato, aminooxiacetato, amonio	15	5

El experimento se inició por adición de ClNH_4 (0,36 mM, concentración final) y/o NO_3K (0,2 mM, concentración final) a suspensiones celulares conteniendo 2,1 μ l de células por ml de tampón de ensayo sin suplementar o suplementado con aminooxiacetato a concentración 1 mM, tras 10 min de preincubación en las mismas condiciones del ensayo. Los valores presentados corresponden a la cantidad de sustrato desaparecido del medio en 20 min.

Tabla 18. Prevención por MSX del efecto del aminooxiacetato sobre la utilización del nitrato por A. nidulans

1 ^a adición	2 ^a adición	Consumo de nitrato (nmol/ μ l células)
Ninguna	Ninguna	38
Ninguna	Aminooxiacetato	3
MSX	Ninguna	153 •
MSX	Aminooxiacetato	125
Ninguna	MSX, aminooxiacetato	12

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 2,5 μ l de células por ml de tampón de ensayo. Las células se preincubaron durante 15 min en ausencia de nitrato, con las adiciones de MSX y/o aminooxiacetato a concentraciones finales de 1 mM, según se indica. La 1^a adición se efectuó con 15 min de antelación y la 2^a con 10 min, previamente a la adición de NO₃K (0,4 mM, concentración final) para iniciar el experimento de consumo. Los datos corresponden al sustrato consumido en 20 min.

sólo después de que se ha consumido una cierta cantidad de nitrato (Fig. 32).

Los resultados expuestos hasta el momento en el presente apartado podrían interpretarse en base a la participación en la modulación de la velocidad de asimilación del nitrato de un sistema de regulación en el cual participarían como efectores negativos metabolitos resultantes de la asimilación del amonio.

3.2.1.3.- Punto de acción de la regulación por amonio

Como se ha mencionado repetidamente, en las condiciones de este trabajo, el consumo de nitrato por A.nidulans implica no sólo transporte, sino también metabolización intracelular de este sustrato, siendo la manifestación de actividad de utilización del nitrato por parte de las células dependiente de la presencia de actividad nitrato reductasa en las mismas. En consecuencia, la inhibición del consumo de nitrato provocada por amonio que se acaba de describir, podría operar a través de la inhibición (o, alternativamente, la inactivación) tanto de la nitrato reductasa como de la permeasa del nitrato.

Dadas las abundantes descripciones existentes para distintos tipos de algas de inactivación in vivo de la nitrato reductasa causada por adición de amonio (ver, como revisión, Guerrero et al., 1981), se ha investigado la posibilidad de que una inactivación de la nitrato reductasa de Anacystis sea la responsable del efecto inhibitor del amonio sobre el consumo de

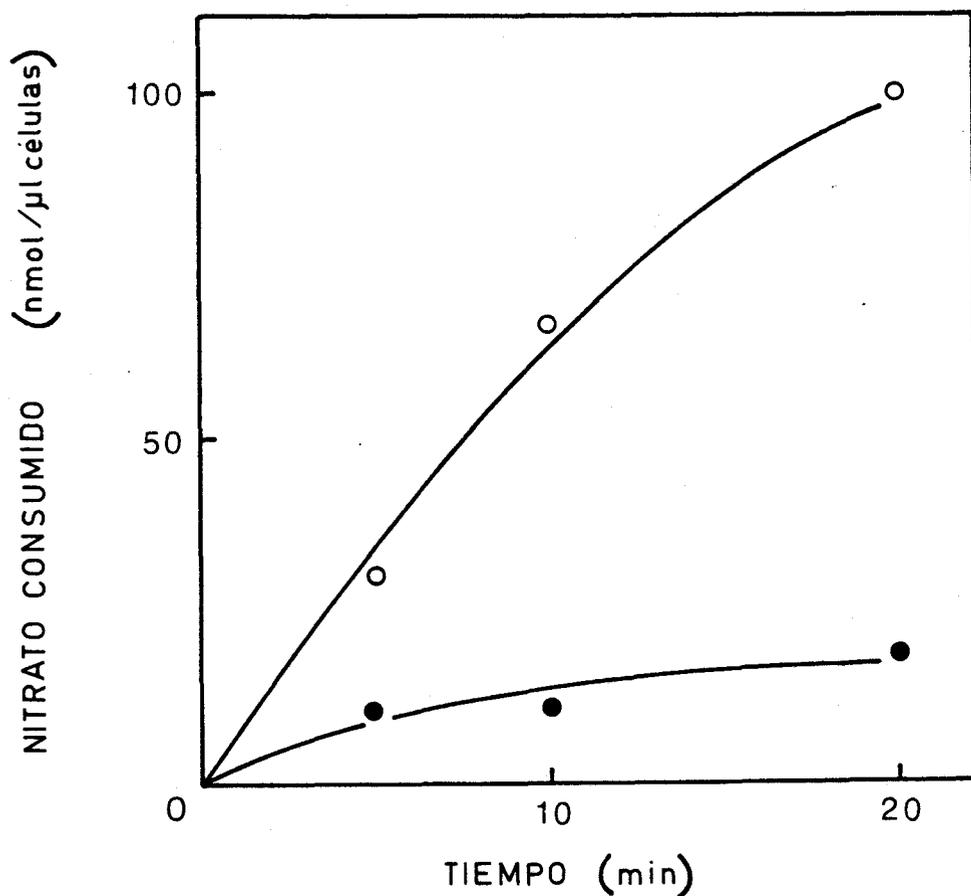


Figura 32. Efecto del aminoxiacetato sobre el consumo de nitrato por A.nidulans

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón de ensayo conteniendo 10 mM de CO_3HNa y suplementado (●) o no (○) con 1 mM de aminoxiacetato, y se comenzó por adición de NO_3K (concentración final, 0,2 mM), tras 15 min de preincubación.

nitrato

Con objeto de poder obtener información acerca de cualquier inactivación que pudiera desarrollarse y revertirse de forma demasiado rápida para ser detectada midiendo la actividad nitrato reductasa tras la preparación de extractos acelulares, se puso a punto un sistema de determinación de actividad in situ, consistente en la utilización en el ensayo de actividad nitrato reductasa de células cuyas membranas se hacían permeables a metabolitos de bajo peso molecular por tratamiento con tolueno (ver Materiales y Métodos). Se han estudiado los niveles celulares de actividad nitrato reductasa en suspensiones de células consumiendo nitrato y en suspensiones en las que la utilización de este nutriente se encontraba inhibida por la presencia de amonio en el medio. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 33, donde puede observarse que los niveles de nitrato reductasa en las células incubadas en presencia de amonio y nitrato son similares a los que presentan las células incubadas sólo en presencia de nitrato, y que permiten un activo consumo de este sustrato por las mismas. En consecuencia, no parece que la inhibición por amonio del consumo de nitrato opere mediante una inactivación de la nitrato reductasa.

Sin embargo, con los resultados expuestos hasta aquí, la nitrato reductasa no puede descartarse como posible blanco de los efectores del sistema de regulación de la asimilación del nitrato, ya que éstos podrían actuar inhibiendo a la enzima, con lo que la actividad in vivo estaría bloqueada, aunque esto

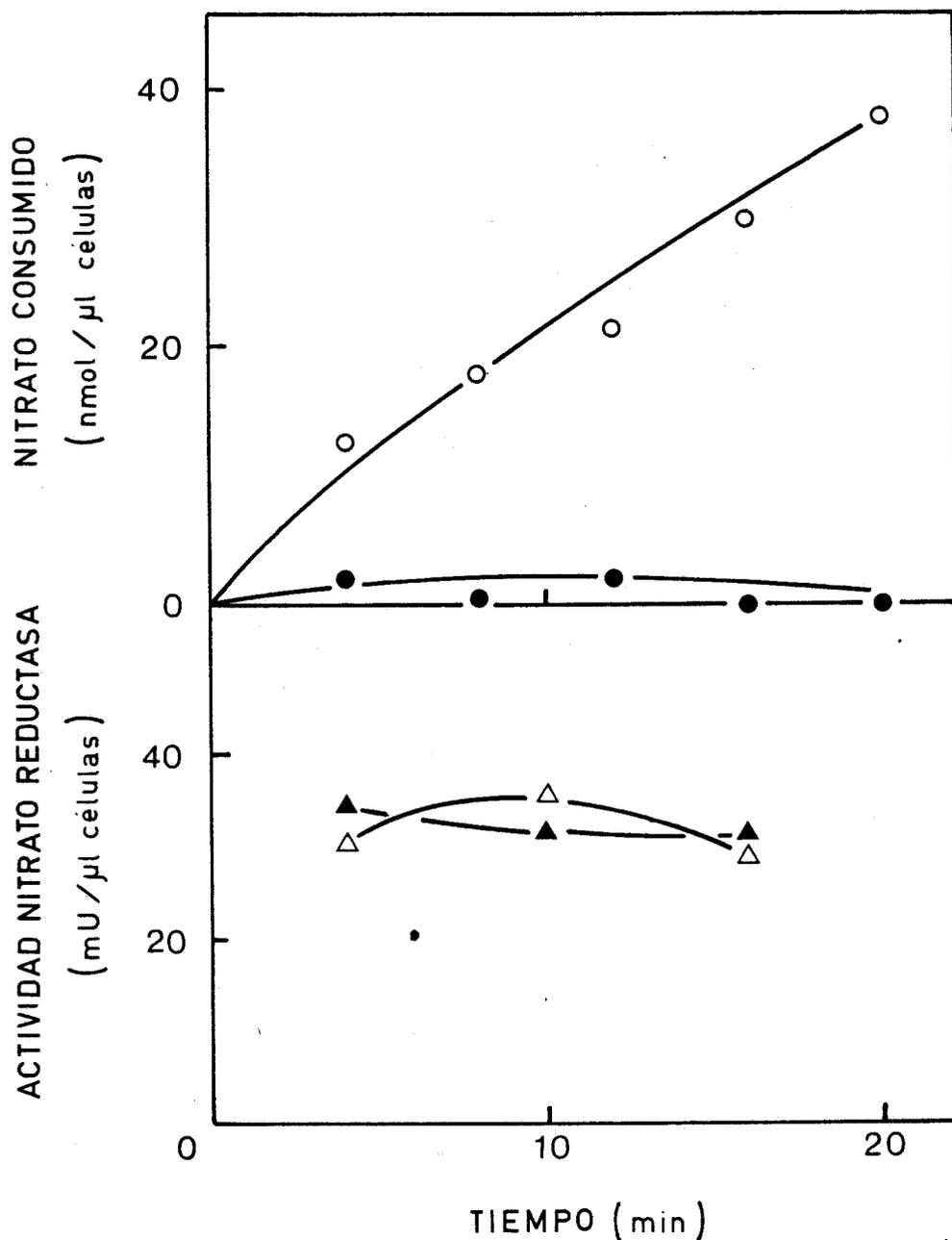


Figura 33. Efecto del amonio sobre el consumo de nitrato y sobre la actividad nitrato reductasa en A.nidulans

Suspensiones celulares conteniendo 2 μ l de células por ml de tampón de ensayo se suplementaron a tiempo cero con NO_3K (símbolos blancos) o con NO_3K y ClNH_4 (símbolos negros) a concentraciones finales de 0,2 mM de nitrato y 2 mM de amonio. A los tiempos indicados se determinó el nitrato consumido (círculos) y la actividad nitrato reductasa en células toluidizadas (triángulos).

no podría detectarse mediante ensayos de actividad enzimática in vitro o in situ.

Aunque no se han obtenido pruebas directas de cuál es el componente del sistema de utilización del nitrato sobre el que actúan los metabolitos reguladores, las observaciones que se exponen a continuación apoyan la hipótesis de que el paso regulado sea el transporte del nitrato al interior de la célula.

A diferencia de lo que ocurre en las células normales, en las cuales el consumo de nitrato es estrictamente dependiente del pH del medio en el intervalo de pH que vamos a considerar, de pH 7 a pH 9, las células tratadas con MSX manifiestan un nivel de actividad de utilización del nitrato prácticamente constante a lo largo de dicho intervalo de pH (Fig. 34). Estos resultados indican que el tratamiento de las células con MSX resulta en la liberación del consumo de nitrato de su dependencia del pH del medio, en el intervalo discreto de pH que se ha considerado, sugiriéndose que este efecto resulta de la disminución del nivel celular de efectores negativos de la utilización del nitrato consecuente al tratamiento con MSX.

Para interpretar esta observación se ha tenido en cuenta el hecho, que se está haciendo evidente para los más diversos microorganismos, incluyendo la cianobacteria A.nidulans, de que las células son capaces de regular su pH intracelular de forma que lo mantienen prácticamente constante frente a cambios del pH extracelular dentro de un intervalo amplio que cubre la zona de pH extracelular considerada en los experimentos presen-

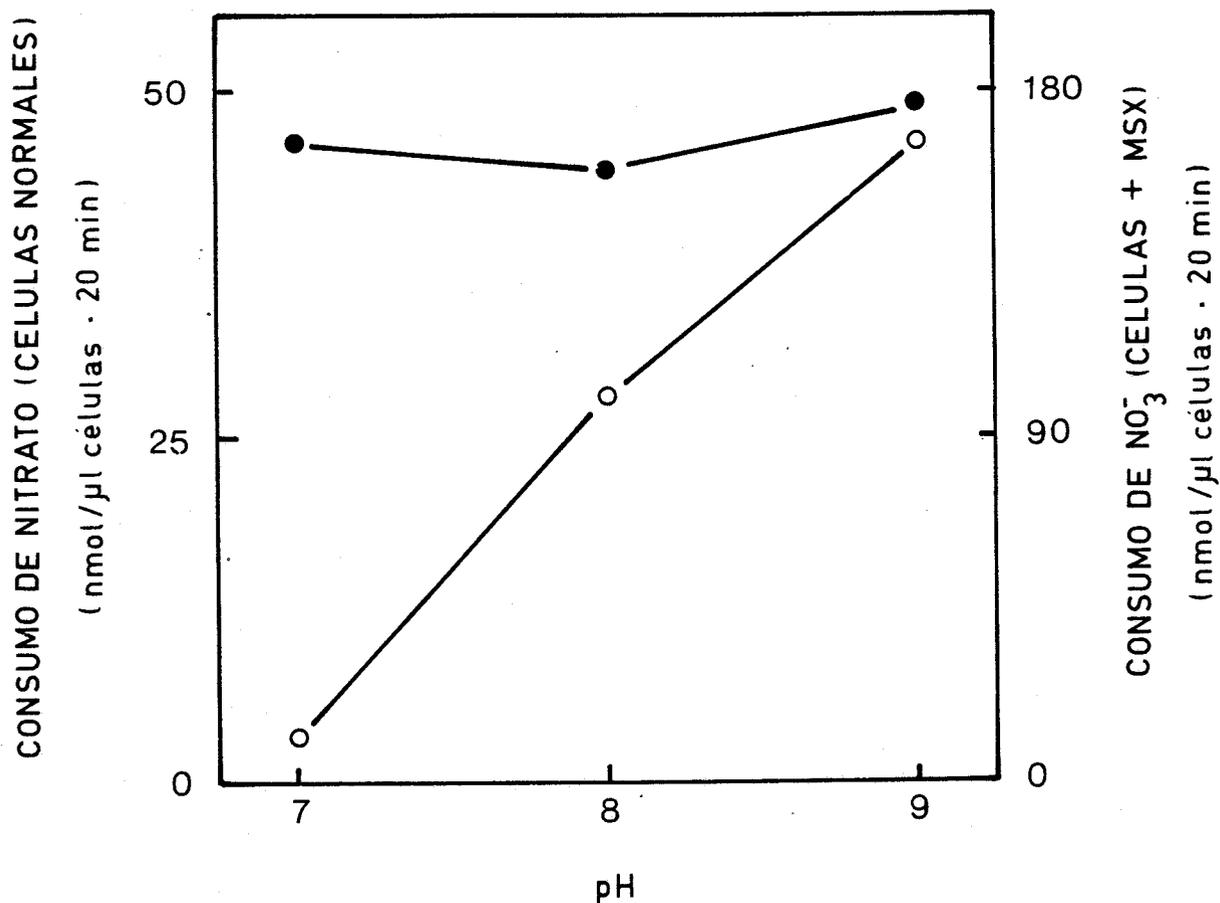


Figura 34. Efecto del pH sobre el consumo de nitrato en células normales de A.nidulans y en células tratadas con MSX

El experimento se llevó a cabo con células que habían sido preincubadas durante 15 min, a la luz y a 40°C, en suspensiones conteniendo 2 μl de células por ml de tampón de ensayo suplementado (●) o sin suplementar (○) con MSX 1 mM. Los ensayos se desarrollaron con suspensiones conteniendo 1 μl de células por ml de tampón MOPS 20 mM-Tricina 20 mM-Glicina 20 mM-NaOH del pH indicado en cada caso y suplementado con NO₃K 0,25 mM. El experimento se inició encendiendo la luz.

tados en este trabajo (Falkner et al., 1976; Guarino y Cohen, 1979; Gibson, 1981; Kallas y Castenholz, 1982). Como consecuencia de ésto, la velocidad de procesos de naturaleza netamente intracelular no se ve afectada cuando la célula se expone a distintos pH extracelulares, dentro del intervalo en el que la célula es capaz de mantener constante su pH intracelular (Coleman y Colman, 1981). Por el contrario, el cambio de velocidad de una actividad celular en función del pH externo, dentro de dicho intervalo discreto de pH, sería característico de un proceso cuyo paso limitante de velocidad tuviese alguna relación con el medio externo, como es el caso de los sistemas de transporte. Como explicación para los resultados presentados en la Figura 34, se sugiere que los metabolitos reguladores de la asimilación del nitrato actúan sobre el transporte de nitrato (y no sobre el primer paso de la metabolización intracelular del mismo, su reducción). La permeasa del nitrato podría tener una dependencia de pH distinta en presencia y en ausencia de los efectores negativos. Alternativamente, en ausencia de los reguladores (situación provocada por la acción del MSX), el transporte del sustrato podría dejar de ser el paso limitante de la velocidad del proceso de utilización del nitrato y, en consecuencia, esta velocidad, al pasar a depender de un factor intracelular, no tendría necesariamente que ser una función del pH extracelular en el intervalo de pH estudiado.

La otra observación que apoyaría la hipótesis de que el sistema de regulación de la asimilación del nitrato actúa

sobre el transporte de este sustrato concierne a la inhibición por amonio del consumo de nitrito, y presupone la operación de un sistema común de regulación del transporte del nitrato y del nitrito. En el apartado 3.1.2.3. se presentaron resultados indicando que la entrada de nitrito en la célula tiene dos componentes: uno de transporte activo y otro de entrada pasiva. A medida que aumenta el pH del medio, la fracción de utilización de nitrito por la célula que tiene lugar mediante transporte activo se hace mayor (véase Tabla 9). Por otra parte, se recordará que los consumos de nitrito y de amonio por células de Anacys-tis manifiestan una inhibición parcial mutua (véase la Tabla 3). Cuando se estudió la inhibición por amonio del consumo de nitrito a diferentes valores de pH extracelular, se encontró que dicha inhibición se hacía mayor al aumentar el pH del medio (Tabla 19), incrementándose el porcentaje de inhibición paralelamente al incremento de la fracción de consumo de nitrito que opera mediante transporte activo, inhibible por DCCD (comparar las Tablas 9 y 19). Estos datos sugieren que el componente del sistema de asimilación del nitrito que se inhibe tras la adición del amonio es el transporte activo del sustrato. La extensión a la utilización del nitrato de este concepto del transporte como blanco del sistema de regulación se basa en el hecho de que ambos procesos de asimilación, de nitrato y de nitrito, manifiestan características comunes de regulación. El consumo de nitrito, al igual que ocurre con el de nitrato, se encuentra desregulado en células tratadas con MSX.

Tabla 19. Efecto del pH extracelular sobre la inhibición por amonio del consumo de nitrito en A. nidulans

pH	Consumo de nitrito (nmol/ μ l células)		Inhibición (%)
	Control	+Amonio	
7,5	208	194	7
8,5	85	69	19
9,5	134	35	74

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón Tricina 15 mM-Glicina 15 mM-NaOH del pH indicado, suplementado con NO_2K (0,5 mM) o con NO_2K (0,5 mM) y ClNH_4 (0,5 mM). Los datos de consumo se refieren a la cantidad de nitrito desaparecido en 30 min.

3.2.2. Papel del anhídrido carbónico en la regulación de la utilización del nitrato

En el apartado 3.1.1.1. se han presentado pruebas acerca de la manifiesta dependencia que por el anhídrido carbónico presenta el consumo de nitrato (véase p.ej. Tabla 2). En este apartado se presenta un estudio más completo de esta dependencia, aportándose resultados que permiten concluir una intervención decisiva del CO_2 , mediada por productos de su asimilación fotosintética, en la regulación de la asimilación del nitrato por A.nidulans.

3.2.2.1.-Identificación del CO_2 como sustrato de la asimilación fotosintética del carbono

Hasta ahora, cuando hemos hecho referencia al CO_2 no se ha pretendido precisar cual de las diferentes formas de carbono inorgánico, anhídrido carbónico, bicarbonato o carbonato -todas las cuales se encuentran formando parte del equilibrio que se establece en una disolución en la que una de ellas se encuentre presente- es la que las células de A.nidulans utilizan como sustrato para la asimilación fotosintética del carbono. Como se podrá apreciar más adelante en esta sección, para una mejor interpretación de los efectos del CO_2 sobre la utilización de nitrato es de interés identificar la naturaleza de la forma carbonada activa como sustrato de la fijación fotosintética de carbono inorgánico oxidado. A este fin se dirigen los experimentos que

se incluyen en este apartado.

Se ha determinado la velocidad de desprendimiento de oxígeno por células de Anacystis expuestas a la luz, suspendidas en tampones con distintos valores de pH (7,3, 8,3 y 9,3), y con dos concentraciones (0,5 mM y 2,5 mM) de carbono inorgánico total (añadido como CO_3HNa), en ausencia de otros aceptores de electrones añadidos. En la Tabla 20 se presentan los datos de velocidad de desprendimiento de oxígeno obtenidos para cada situación de pH y concentración de bicarbonato sódico añadido, incluyéndose también las concentraciones aproximadas estimadas de CO_2 , bicarbonato y carbonato disueltos en cada caso.

Como se observa en dicha Tabla, para ambas concentraciones de carbono inorgánico total, la velocidad de desprendimiento de oxígeno disminuye al aumentar el pH. La variación en la velocidad de desprendimiento de oxígeno, en cada una de las situaciones consideradas de concentración total de carbono inorgánico, sigue por tanto el patrón del cambio de la concentración de CO_2 disuelto, que disminuye al aumentar el pH, y no el de la concentración de bicarbonato, que se mantiene prácticamente sin variaciones, o el de la concentración de carbonato, que aumenta al hacerlo el pH. En consecuencia, el CO_2 parece ser la especie de carbono inorgánico que es activa en la asimilación fotosintética de carbono en estas células. En este mismo contexto, es importante señalar que para una concentración fija de CO_2 la velocidad de desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 por A.nidulans, en la luz, se mantiene prácticamente constante para valo-

Tabla 20. Desprendimiento fotosintético de oxígeno en A. nidulans en función del pH del medio, para dos concentraciones de carbono inorgánico total disuelto

Carbono inorgánico total (mM)	pH	Desprendimiento de O ₂ (nmol/μl células·min)	Concentración estimada (μM)		
			CO ₂	CO ₃ H ⁻	CO ₃ ⁼
0,5	7,3	14,3	45	450	0,5
	8,3	9,0	5	490	5
	9,3	3,3	0,5	450	45
2,5	7,3	16,7	225	2250	2,5
	8,3	16,0	25	2450	25
	9,3	5,1	2,5	2250	225

El experimento se llevó a cabo en la cámara termostaticada de un electrodo de oxígeno con 4 μl de células en 4 ml de tampón Hepes 25 mM-Tricina 25 mM-Glicina 25 mM-NaOH, del pH indicado en cada caso, suplementado con 0,5 ó 2,5 mM de CO₃HNa. La reacción se inició encendiendo la luz. Con objeto de que la concentración real de carbono inorgánico se correspondiera con las estimaciones teóricas, se partió de una disolución base de Hepes-Tricina-Glicina (pH 5,3) preparada inmediatamente antes de comenzar los experimentos, la cual se gaseó durante una hora con aire del que se eliminaba el CO₂ haciéndolo pasar consecutivamente por dos disoluciones de KOH al 5%, procediéndose a continuación a ajustar el pH de la disolución con NaOH.

res de pH entre 8 y 10 (véase línea control, sin amonio, en la Fig. 50).

3.2.2.2.- Afinidad por el CO_2 de los procesos de utilización de nitrato y de fijación fotosintética de CO_2

Se ha determinado la actividad de utilización de nitrato de células suspendidas en disoluciones conteniendo distintas concentraciones de CO_2 , habiéndose observado una cinética de saturación por el CO_2 de la capacidad de las células para consumir nitrato (Fig. 35). La concentración de CO_2 para la que la velocidad de consumo de nitrato se hacía del orden del 50% de la velocidad máxima era de $3,7 \mu\text{M}$. Para exponerlas a las distintas concentraciones de CO_2 , las células se suspendieron en tampones $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$, 0,1 M, de distintos valores de pH, entre 9,6 y 10,7. La validez de este acercamiento se basa en el hecho de que en el intervalo considerado de pH existe suficiente regularidad en lo que se refiere a los valores de actividad de consumo de nitrato, como se observa cuando el efecto del pH sobre la utilización del nitrato se evalúa a concentración fija de CO_2 en tampones Glicina -NaOH de pH entre 9,4 y 10,8 (Tabla 21).

Se ha estudiado también la dependencia de concentración de CO_2 de la fijación fotosintética de CO_2 , estimada como desprendimiento de oxígeno por células expuestas a la luz y suspendidas asimismo en tampones $\text{CO}_3\text{HNa}/\text{CO}_3\text{Na}_2$, 0,1 M, de pH entre 10,7 y 9,6, para conseguir concentraciones de CO_2 disuelto entre 0,9

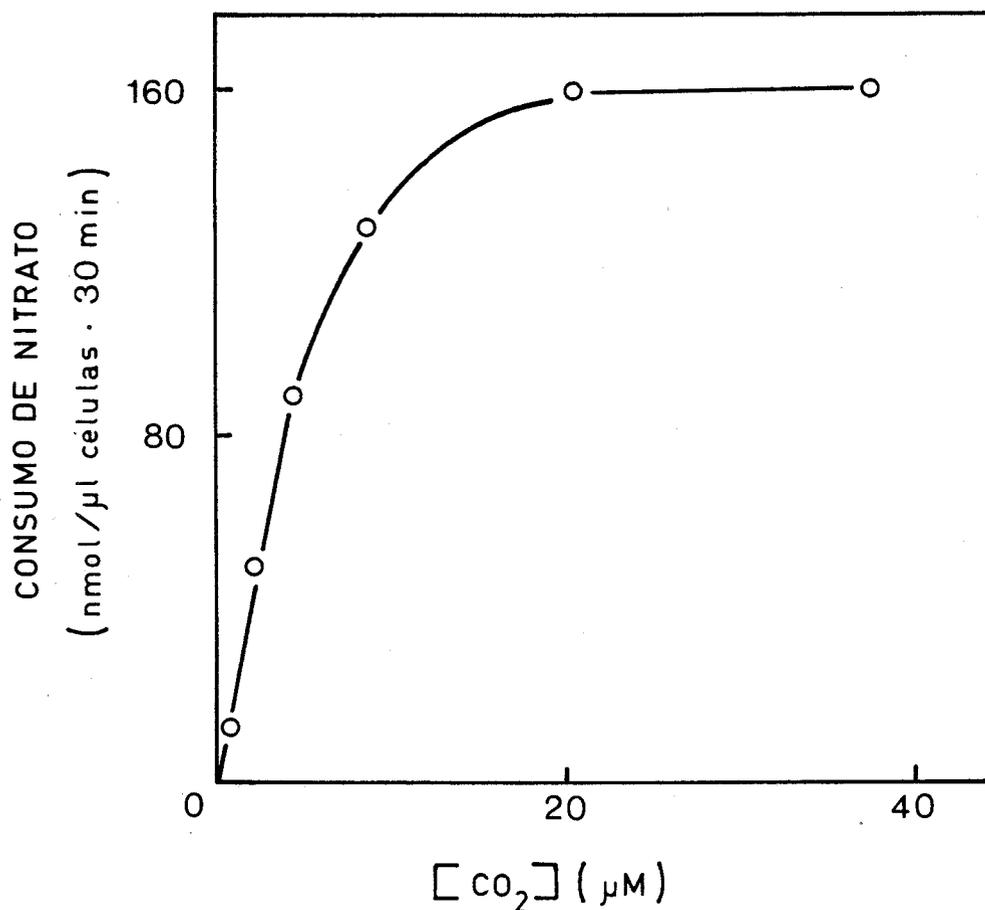


Figura 35. Efecto de la concentración de CO₂ sobre la velocidad de utilización del nitrato por A.nidulans

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 3 μl de células en 3 ml de tampón CO₃HNa/CO₃Na₂ 0,1 M, suplementado con NO₃K 0,5 mM, del pH adecuado para alcanzar la concentración requerida de CO₂, según se indica: {CO₂} = 0,9 μM, pH 10,7; {CO₂} = 2,29 μM, pH 10,4; {CO₂} = 4,48 μM, pH 10,3; {CO₂} = 8,67 μM, pH 10,1; {CO₂} = 20,5 μM, pH 9,8; {CO₂} = 37,5 μM, pH 9,6.

Tabla 21. Consumo de nitrato por A. nidulans en función del pH del medio, entre pH 9,4 y pH 10,8

pH	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)
9,40	104
9,65	103
9,82	105
10,10	77
10,48	93
10,80	94

El experimento se llevó a cabo con 1,3 μ l de células por ml de tampón Glicina-NaOH 25 mM, del pH indicado en cada caso, con aire como fase gaseosa. Tiempo de reacción: 30 min.

μM y $37,5 \mu\text{M}$ (Fig. 36). La K_m (CO_2) de la fijación de CO_2 estimada a partir de estos datos fué de aproximadamente $4 \mu\text{M}$.

Los resultados expuestos sugieren la posibilidad de que el efecto del CO_2 sobre la utilización del nitrato presentado en la Fig. 35 esté mediado por productos de la fijación del CO_2 , dada la similitud entre el valor de concentración de CO_2 que permite una velocidad de consumo de nitrato correspondiente al 50% de la velocidad máxima y la K_m para el CO_2 del proceso de fijación del CO_2 , ambas de aproximadamente $4 \mu\text{M}$.

3.2.2.3.- Liberación por MSX del requerimiento de CO_2 para la utilización de nitrato

En estudios sobre la utilización del nitrato por células de A.nidulans tratadas con el inhibidor de la glutamina sintetasa MSX, se ha encontrado que el consumo de nitrato por estas células era de magnitud similar tanto en ausencia como en presencia de CO_2 , a diferencia de lo que ocurría en las células normales no tratadas con el inhibidor (Tabla 22). Esto sugiere la posibilidad de que el CO_2 ejerza su efecto mediante una interacción entre productos de su fijación y metabolitos producto de la asimilación del amonio vía glutamina sintetasa, que tengan carácter de inhibidores o efectores negativos de la utilización del nitrato. En las células incubadas en ausencia de CO_2 se favorecería la acumulación de tales metabolitos inhibidores del consumo de nitrato, productos de la asimilación del amonio resultante

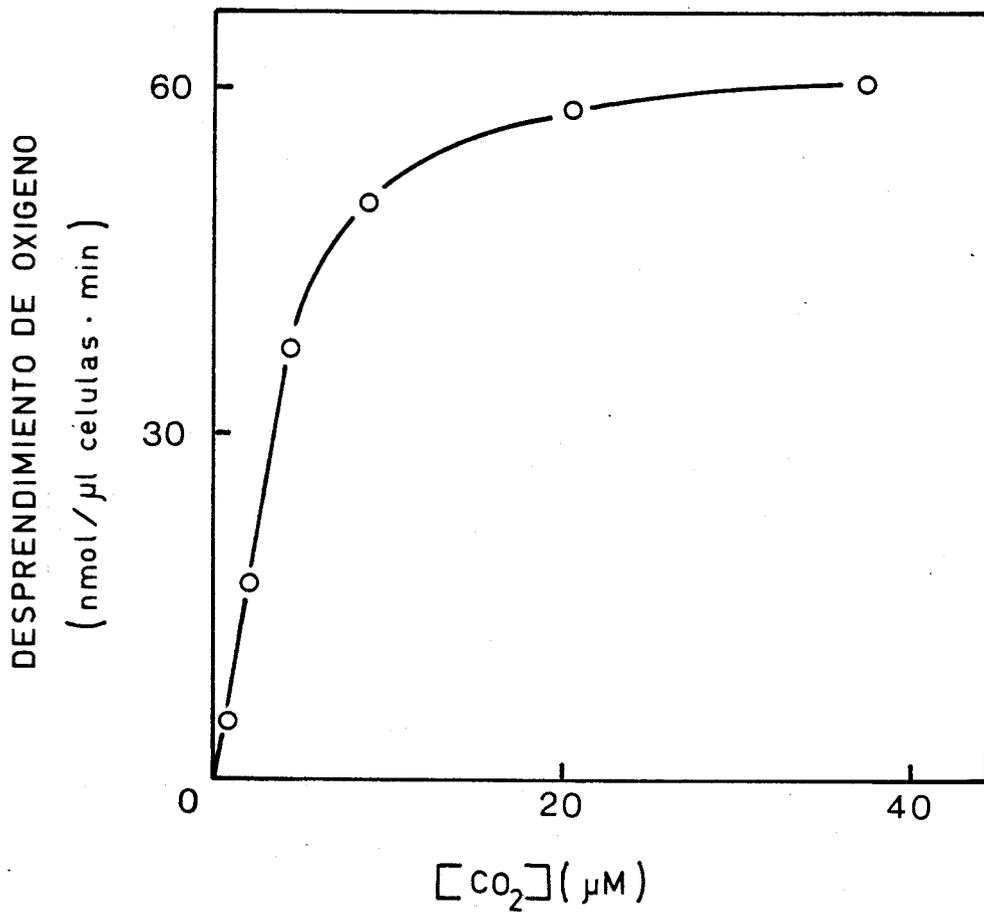


Figura 36. Efecto de la concentración de CO₂ sobre el desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de CO₂ en A.nidulans

El experimento se llevó a cabo durante 60 min en las mismas condiciones que las descritas en la leyenda de la Figura 35, salvo que las suspensiones celulares no se suplementaron con nitrato.

Tabla 22. Comparación del efecto del CO_2 sobre la utilización del nitrato por células de A. nidulans tratadas y sin tratar con MSX

Condiciones	Nitrato consumido (nmol/ μl células)
<u>Células sin tratar</u>	
- CO_2	10
+ CO_2	116
<u>Células tratadas con MSX</u>	
- CO_2	150
+ CO_2	139

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 2,75 μl de células en 2,7 ml de tampón de ensayo suplementado, cuando se indica, con MSX 1 mM. El pocillo central contenía 0,25 ml de KOH al 20% o de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6. Tras 20 min de incubación a la luz se añadió desde el brazo lateral al compartimento principal 1 μmol de NO_3K , disuelto en 50 μl de agua, o 50 μl de agua al control correspondiente a cada ensayo. Tiempo de ensayo: 30 min.

de la reducción del propio nitrato. El tratamiento de las células con MSX prevendría, sin embargo, la formación a partir del nitrato de estos efectores negativos y, en consecuencia, se alcanzaría una situación celular que permitiese la utilización del nitrato, sin que se requiriese el aporte de productos de la fijación de CO_2 que en las células normales posibilitaría la expresión de dicha actividad.

El consumo de nitrato por las células tratadas con MSX se encuentra asociado a un desprendimiento concomitante de oxígeno. En la Figura 37 se muestra cómo la adición de nitrato a células de Anacystis tratadas con MSX, expuestas a la luz en ausencia de otros aceptores de electrones añadidos, provoca un desprendimiento de oxígeno por la suspensión celular. Por tanto, en estas condiciones el sistema fotosintético opera utilizando nitrato como único sustrato añadido. Este hecho supone un avance en el conocimiento de la relación existente entre el proceso de reducción del nitrato y la generación fotosintética de poder reductor (véase apartado 3.1.3.). En dicho apartado se presentan resultados indicando que en estas mismas condiciones el proceso tiene lugar con una estequiometría de 2 mol de oxígeno desprendidos por mol de nitrato reducido a amonio. Esto permite la estimación de la actividad de consumo de nitrato por células de A. nindulans tratadas con MSX mediante la medida del desprendimiento de oxígeno por suspensiones celulares incubadas en presencia de nitrato.

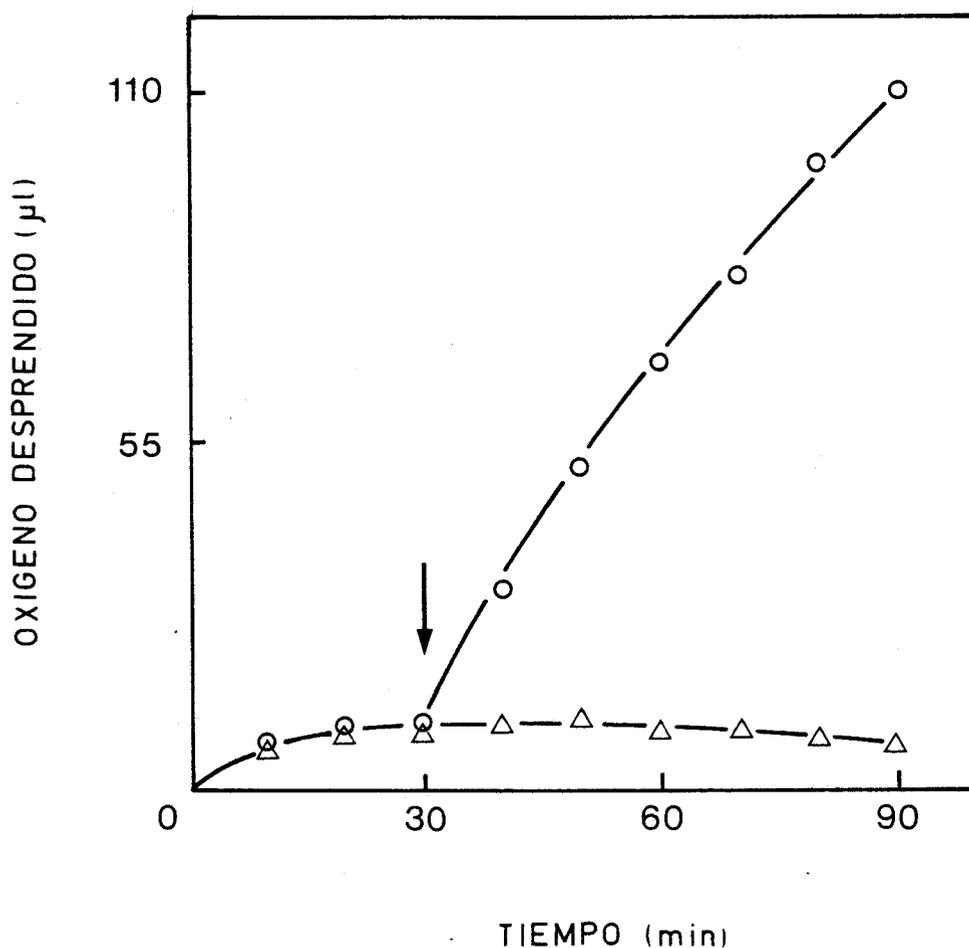


Figura 37. Desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX

El experimento se desarrolló en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 7,5 µl de células en 2,5 ml de tampón Tricina-NaOH 50 mM, pH 8,1, suplementado con MSX 1 mM, y en el pocillo central 0,25 ml de KOH al 20%. En el momento indicado por la flecha se añadió al compartimento principal desde el brazo lateral 5 µmol de NO_3K en 0,25 ml de agua (o) ó 0,25 ml de agua (Δ).

En la Figura 37 se podía observar cómo la adición de nitrato a una suspensión de células de Anacystis tratadas con MSX provocaba, de forma inmediata, un desprendimiento de oxígeno por la suspensión celular. Se ha estudiado, por otra parte, el efecto de la adición de MSX a suspensiones celulares incubadas en presencia de nitrato y ausencia de CO_2 . Como se observa en la Figura 38, dicha adición de MSX (tiempo cero) también provocaba el desprendimiento de oxígeno por la suspensión celular. Sin embargo, el desprendimiento de oxígeno en este caso no se hacía evidente hasta 30-45 min después de añadir el MSX, aunque el nitrato se encontraba presente desde el principio.

Este retraso no parece que pueda explicarse simplemente en base al período de tiempo requerido por el MSX (1 mM) para inactivar totalmente la glutamina sintetasa, que es de sólo 10-15 min (véase Fig. 31, en la sección 3.2.1.2.). La reversión por MSX de la inhibición del consumo de nitrato en estas condiciones parece requerir algún otro cambio de la situación metabólica celular. Si, como se ha sugerido en este mismo apartado, la falta de actividad de utilización del nitrato en ausencia de CO_2 representa el resultado de la acumulación de efectores negativos del sistema de asimilación del nitrato, la recuperación por las células de la capacidad de consumo de este sustrato dependería de que tuviese lugar una disminución del nivel celular de los inhibidores. Así, el tiempo necesario para que comenzara la utilización del nitrato tras la adición del MSX habría de incluir, además del requerido para la inactivación de la glutamina sinte-

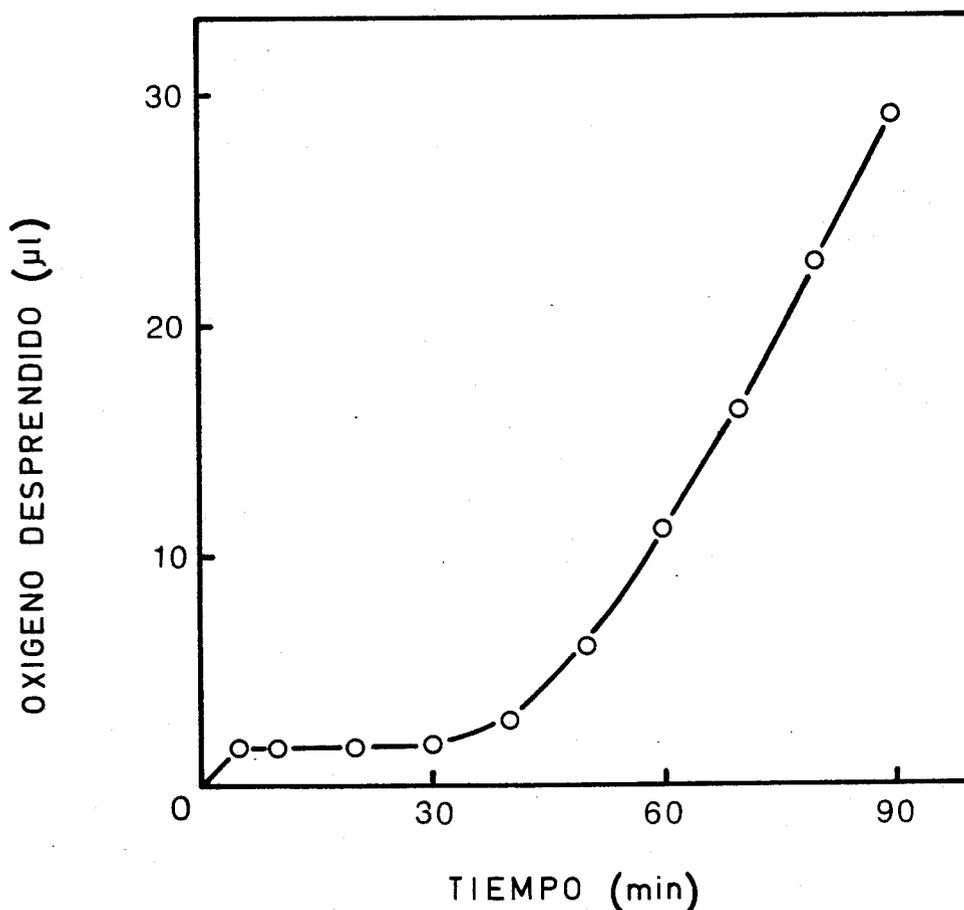


Figura 38. Efecto de la adición de MSX sobre la utilización del nitrato por A.nidulans, estimada como desprendimiento de oxígeno, en atmósfera libre de CO_2

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 2,7 µl de células en 2,6 ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, suplementado o sin suplementar con NO_3K 0,77 mM, y en el pocillo central 0,3 ml de KOH al 20%. Tras 30 min de incubación a la luz, se añadió MSX disuelto en 0,1 ml de agua desde el brazo lateral al compartimento principal (tiempo = cero), para dar una concentración final de MSX en la suspensión celular de 1 mM. Los datos que se presentan corresponden al desprendimiento de oxígeno en la vasija que contenía nitrato, corregido para los cambios de oxígeno en la vasija sin nitrato.

tasa, un período de tiempo extra durante el cual se registrase un cambio de niveles celulares de metabolitos, que representase la sustitución de una situación inhibidora por otra que permitiera el consumo de nitrato.

Esta interpretación de que el largo período de incubación, necesario para que comience el consumo de nitrato tras la adición de MSX a suspensiones de A.nidulans incubadas en presencia de nitrato y ausencia de CO_2 , sea debido al tiempo necesario en las condiciones de falta de CO_2 para remover los metabolitos inhibidores, se ve apoyada por el hecho de que la inhibición del consumo de nitrato (causada por amonio), en presencia de CO_2 (aire como fase gaseosa), desaparece tras la adición de MSX en cuanto la inactivación de la glutamina sintetasa alcanza su máxima expresión (véase Fig. 31, en la Sección 3.2.1.2.). La ausencia de CO_2 parece representar, por tanto, una disminución en la velocidad del cambio de la situación metabólica determinante de inhibición a otra que permite el consumo de nitrato, frente al caso en el que el CO_2 se encuentra presente.

3.2.2.4.- Efecto del CO_2 sobre el consumo de nitrito

A diferencia de lo que ocurre con la utilización de nitrato o de amonio, las células de Anacystis presentan una notable capacidad de consumo de nitrito en ausencia de CO_2 (ver Tabla 2 en el apartado 3.1.1.1.). El consumo de nitrito en estas condiciones era, sin embargo, de menor magnitud que en presencia

de CO_2 (Tabla 2).

Dada la coexistencia de dos formas de entrada de nitrato en la célula, una activa y sometida a regulación metabólica por productos de la asimilación del amonio y otra de difusión pasiva, y teniendo en cuenta que el CO_2 podría participar en la regulación del transporte de sustratos nitrogenados inorgánicos, se ha planteado la posibilidad de que el efecto del CO_2 sobre el consumo de nitrato se deba a una dependencia por CO_2 del transporte activo de nitrato, no estando sometida a regulación de difusión de ácido nitroso. Para comprobar la validez de esta hipótesis se ha estudiado el efecto del CO_2 sobre la utilización de nitrato a distintos pH, ya que la fracción de la entrada de nitrato que opera mediante el sistema de transporte activo aumenta en respuesta al incremento en el pH del medio (Tabla 9, apartado 3.1.2.3.). Los resultados obtenidos (Tabla 23) indican que la estimulación por el CO_2 del consumo de nitrato se hace mayor a medida que aumenta el pH.

Esta observación apoya la hipótesis de que el sistema de transporte mediado de nitrato esté sometido a regulación por productos de la asimilación de amonio cuyo nivel celular se encuentra afectado por productos de la fijación del CO_2 , de forma similar a lo propuesto para el transporte de nitrato. Por otra parte, el hecho mismo de que el citado sistema de regulación actúe sobre la utilización del nitrato, sobre todo en condiciones en las que la entrada del sustrato ocurre fundamentalmente por medio del sistema de transporte y no por difusión, indica, como

Tabla 23. Estimulación por CO₂ del consumo de nitrito por A. nidulans a diferentes valores de pH

pH	Nitrito consumido (nmol/ μ l células)		+CO ₂
	+CO ₂	-CO ₂	-CO ₂
7,5	243	144	1,69
8,5	193	79	2,44
9,5	184	58	3,17

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 2,75 μ l de células en 2,68 ml de tampón Tricina 15 mM-Glicina 15 mM-NaOH del pH indicado en cada caso. En el pocillo central las vasijas contenían 0,25 ml de KOH al 20% (-CO₂) o de tampón CO3HNa/CO2Na2 0,5 M, pH 9,6 (+CO₂). El experimento se desarrolló durante 30 min, y se inició por adición al compartimento principal, desde el brazo lateral, de 0,07 ml de NO2K 20 mM.

ya se ha discutido, que el blanco del sistema de regulación sea el propio sistema de transporte.

3.2.3.- Efecto de la deficiencia en nitrógeno sobre la utilización del nitrato y su regulación

En este apartado se presenta un estudio sobre la utilización del nitrato por células de Anacystis nidulans sometidas previamente a un período de ayuno en nitrógeno. Dicho estudio comprende la caracterización de algunas actividades fisiológicas relevantes de las células de Anacystis en estas condiciones y una investigación sobre la regulación del consumo de nitrato en las mismas. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis formulada en los apartados anteriores, según la cual la velocidad de utilización del nitrato por A.nidulans se encuentra sometida a regulación por metabolitos cuyo nivel celular depende de la interacción entre los metabolismos asimilatorios del C y del N.

3.2.3.1.- Respuesta del consumo de nitrato al ayuno en nitrógeno

En la Figura 39 se presenta la evolución con respecto al tiempo de la capacidad de consumo de nitrato y del nivel celular de actividad nitrato reductasa de células de A.nidulans que se habían cultivado en medio con nitrato y que se transfirieron al iniciar el experimento a un medio sin fuente de nitrógeno, donde se mantuvieron en condiciones de cultivo. La actividad de

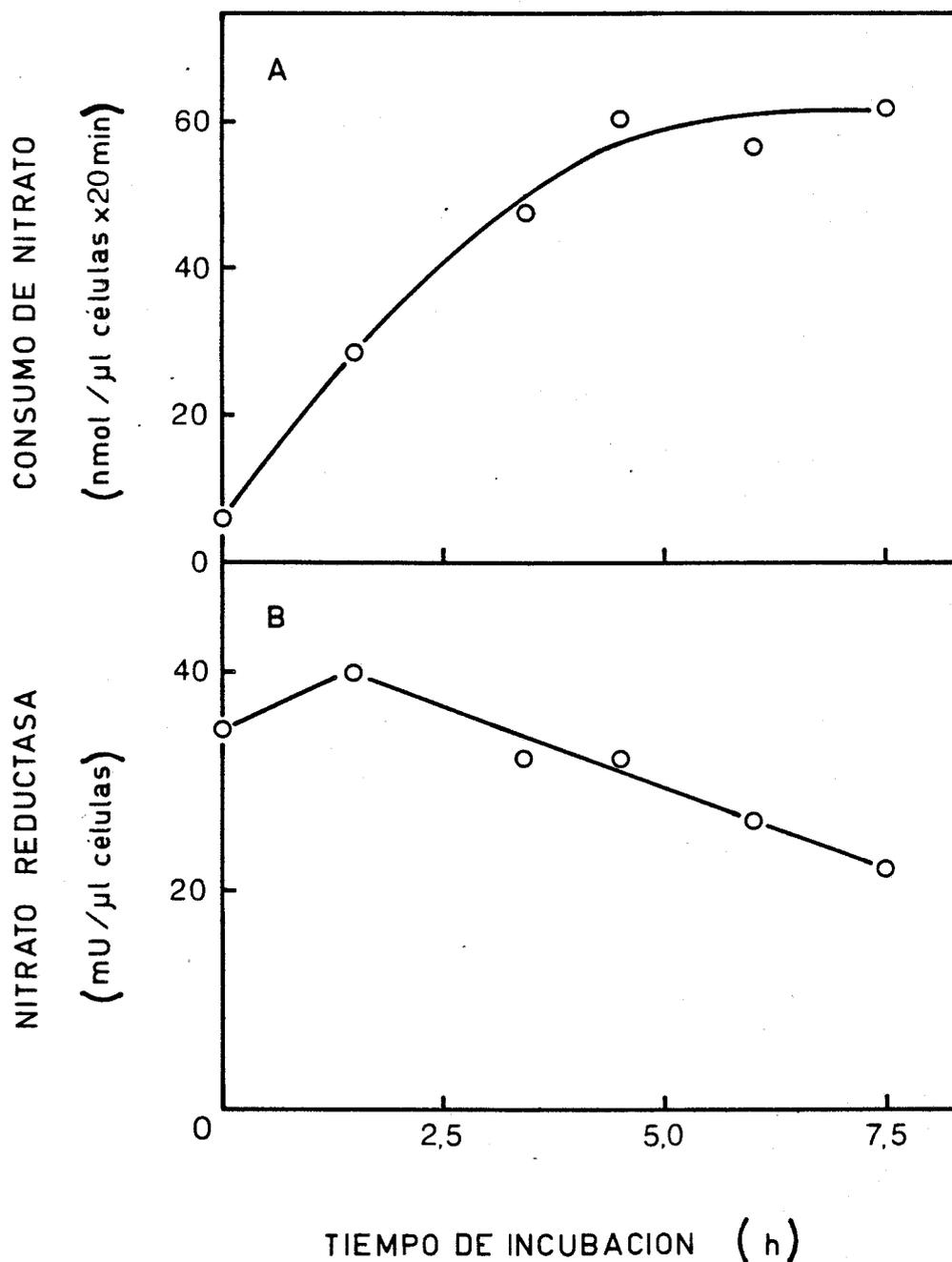


Figura 39. Efecto de la incubación en medio sin fuente de nitrógeno sobre la actividad de utilización del nitrato y el nivel celular de nitrato reductasa en A.nidulans

Con células procedentes de un cultivo con nitrato como fuente de N se preparó una suspensión conteniendo 0,94 μ l de células por ml de medio de cultivo sin fuente de N añadida, que se incubó en condiciones "standard" de cultivo. A los tiempos de incubación indicados se tomaron muestras del cultivo, recogiendo las células por filtración. Estas se resuspendieron a razón de 1 μ l de células por ml de tampón de ensayo suplementado con NO_3K 0,2 mM, procediéndose a continuación a la determinación de su capacidad de consumo de nitrato en las condiciones usuales y de su actividad nitrato reductasa, tras la tolúenización de una alícuota de 1 ml de la suspensión celular.

utilización de nitrato por las células aumentaba progresivamente hasta alcanzar un nivel máximo, al que se llegaba tras 4,5 h de incubación en el medio sin fuente de nitrógeno, y que se mantenía durante al menos 3 h más de incubación en dicho medio (Fig. 39 A). El nivel celular de actividad nitrato reductasa, sin embargo, disminuía lenta y progresivamente durante la incubación en el medio sin fuente de nitrógeno, tras registrar un pequeño aumento al comienzo de dicha incubación (Fig. 39 B). En un experimento, cuyos resultados no se presentan, se estableció que células incubadas en medio sin fuente de N durante 10 h presentaban una actividad de consumo de nitrato similar a la actividad máxima alcanzada en el experimento de la Figura 39, mientras que su nivel de nitrato reductasa era tan sólo de 14 mU por μ l de células. Los cambios en el nivel de actividad nitrato reductasa no parecen pues ser los responsables del cambio, en respuesta al ayuno de N, en la capacidad de utilización del nitrato por las células.

Teniendo en cuenta los datos que se acaban de presentar, se procedió al estudio de la utilización del nitrato por células sometidas a ayuno de N utilizando células incubadas en medio sin fuente de nitrógeno durante 5-6 h.

3.2.3.2.- Deficiencia en nitrógeno causada por el ayuno de este elemento

Durante la incubación en medio sin fuente de N se hace evidente un cambio en la composición de pigmentos de las célu-

las. En la Figura 40 se presenta el espectro de absorción de unas células de Anacystis incubadas en medio sin fuente de N durante 6 h, (Fig. 40 A), incluyéndose con fines comparativos el espectro de absorción de células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno (Fig. 40 B). Dado que el contenido total en clorofila a de la suspensión celular incubada en ausencia de fuente de N no cambia durante períodos de tiempo de los aquí con siderados, de 5-6 h, referiremos el contenido celular de otros pigmentos al contenido en clorofila a. Por ello, en la Figura 40 se presentan espectros de suspensiones celulares conteniendo la misma concentración de clorofila, lo que se refleja en los similares valores de absorbancia a 678 nm, donde se localiza un máximo de absorción característico de la clorofila a. Los dos hechos más notables que se pueden observar cuando se compara el espectro de absorción de las células sometidas a ayuno de N con el de células normales, cultivadas con nitrato, son, por una parte, la disminución en la absorción en la zona de 625 nm y, por otro lado, el aumento de absorción en el máximo a 485 nm y, en particular, en el hombro que se localiza a 490 nm (Fig. 40).

La disminución en la absorbancia a 625 nm, que tiene lugar de manera progresiva durante la incubación en medio sin fuente de nitrógeno, es característica de la pérdida de ficocianinas, las cuales representan un tipo de pigmentos que manifiestan una absorción máxima en esta zona del espectro. Se ha propuesto que las ficocianinas, aparte de su papel como pigmentos antena en el aparato fotosintético, constituyen en las cianobacterias un reservorio de nitrógeno que se moviliza cuando las cé-

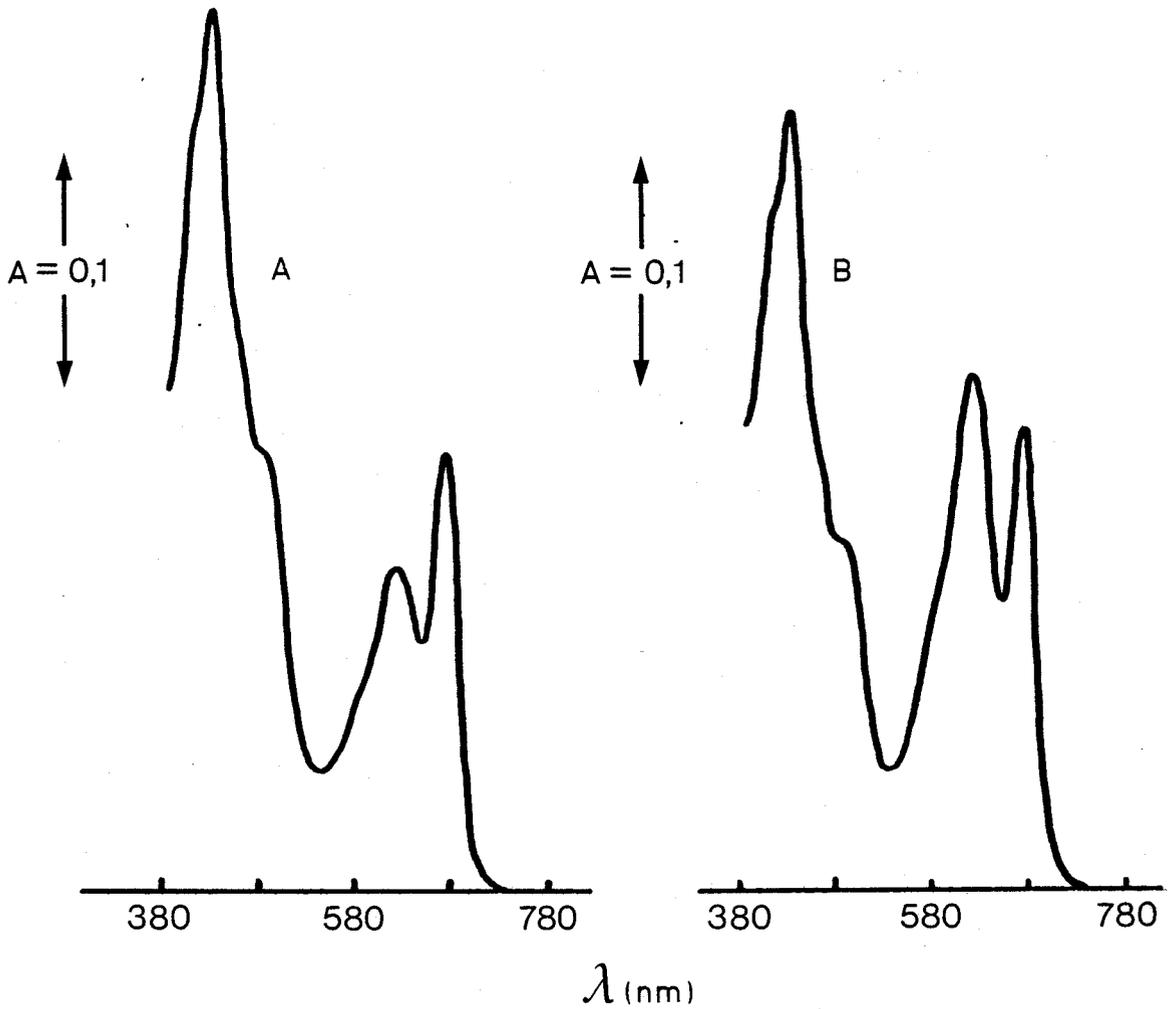


Figura 40. Espectros de absorción de células de A.nidulans sometidas a ayuno en N durante 6 h (A) o cultivadas en medio conteniendo nitrato como fuente de N (B)

Las suspensiones celulares contenían 5 μg de clorofila por ml de tampón de ensayo.

lulas entran en una situación de deficiencia en este elemento (Allen y Smith, 1969). La degradación de ficocianinas que tiene lugar en respuesta a la incubación en medio sin fuente de N indica por tanto el carácter de deficiencia en N inducido en las células por el cultivo en estas condiciones.

La expresión "deficiencia en nitrógeno" hace referencia a una situación de bajo contenido celular de N en comparación con los otros bioelementos, en especial con carbono. Así, en estado de deficiencia en nitrógeno la relación del contenido celular de carbono a nitrógeno (C/N) ha de ser mayor que en las células normales, cultivadas en presencia de una fuente de nitrógeno. Esto debe ser el resultado del funcionamiento del sistema de asimilación del carbono durante el período de incubación en medio sin fuente de N.

En este contexto de acumulación de carbono (con respecto al nitrógeno) en las células sometidas a ayuno de N ha de interpretarse el aumento de absorbancia en la zona de 430 a 500 nm que se observa en estas células, en comparación con las células normales no deficientes en N (Fig. 40). A la absorción en la zona citada del espectro contribuyen la clorofila a y los pigmentos carotenoides, siendo específicamente debido a estos últimos el hombro que se observa a 490 nm. Dado que la comparación de los espectros de ambos tipos de células se está haciendo para una concentración normalizada de clorofila (similar absorbancia a 678 nm), y que la absorbancia a 490 nm aumenta considerablemente en las células sometidas a ayuno de N, se deduce que durante

la incubación en medio sin fuente de nitrógeno tiene lugar una acumulación de carotenos en las células. A diferencia de lo que ocurre con otros pigmentos, como la clorofila o las ficocianinas, que contienen átomos de N en sus moléculas, los carotenos carecen de dicho elemento. Por tanto, la acumulación de carotenos, unida a la disminución de niveles de las ficociaminas, puede representar un índice del aumento en la relación celular C/N, confirmando que éste tiene lugar, de hecho, en las células sometidas a ayuno de nitrógeno.

3.2.3.3.- Características fisiológicas de las células deficientes en nitrógeno

Las células de A.nidulans sometidas a ayuno de N durante 6 h manifiestan una actividad de desprendimiento fotosintético de oxígeno, dependiente de CO₂, de menor magnitud que la de células normales cultivadas en presencia de una fuente de nitrógeno (Fig. 41). Este hecho puede estar relacionado con el bajo contenido en ficocianinas de las células deficientes en N, dado el carácter de pigmentos accesorios del Fotosistema II de dichas ficocianinas (Wolk, 1981).

Para comprobar esta hipótesis se ha estudiado la capacidad de fotorreducción de ferricianuro de células incubadas en presencia de ferricianuro y cantidades catalíticas de p-benzoquinona, lo que constituye una medida de la actividad del Fotosistema II. En la Figura 42 se presenta la cinética de reducción

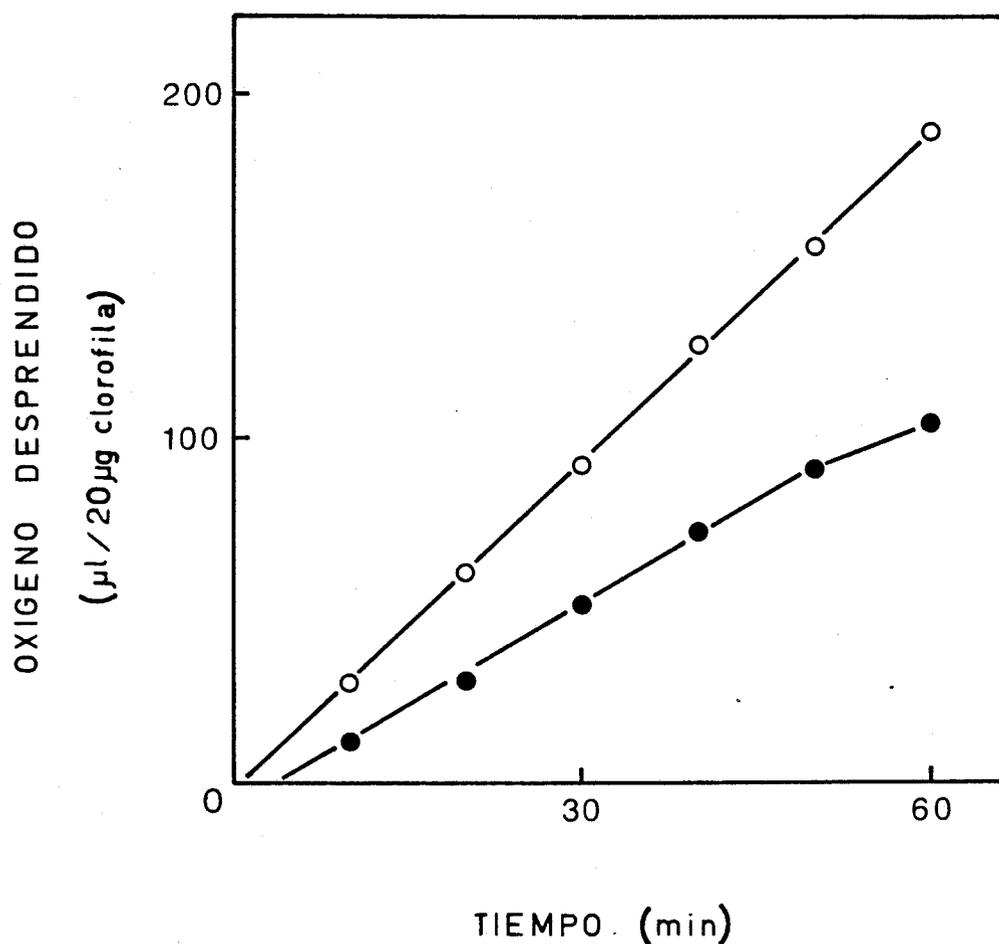


Figura 41. Efecto de la deficiencia en N sobre el desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de CO_2 en *A. nidulans*

El experimento se desarrolló en vasijas de Warburg conteniendo en el pocillo central 0,25 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6, y en el compartimento principal 2,75 ml de suspensión celular en tampón de ensayo. (o) Células normales, cultivadas con nitrato como fuente de N; (●) células incubadas durante 6 h en condiciones de cultivo, pero sin fuente de N.

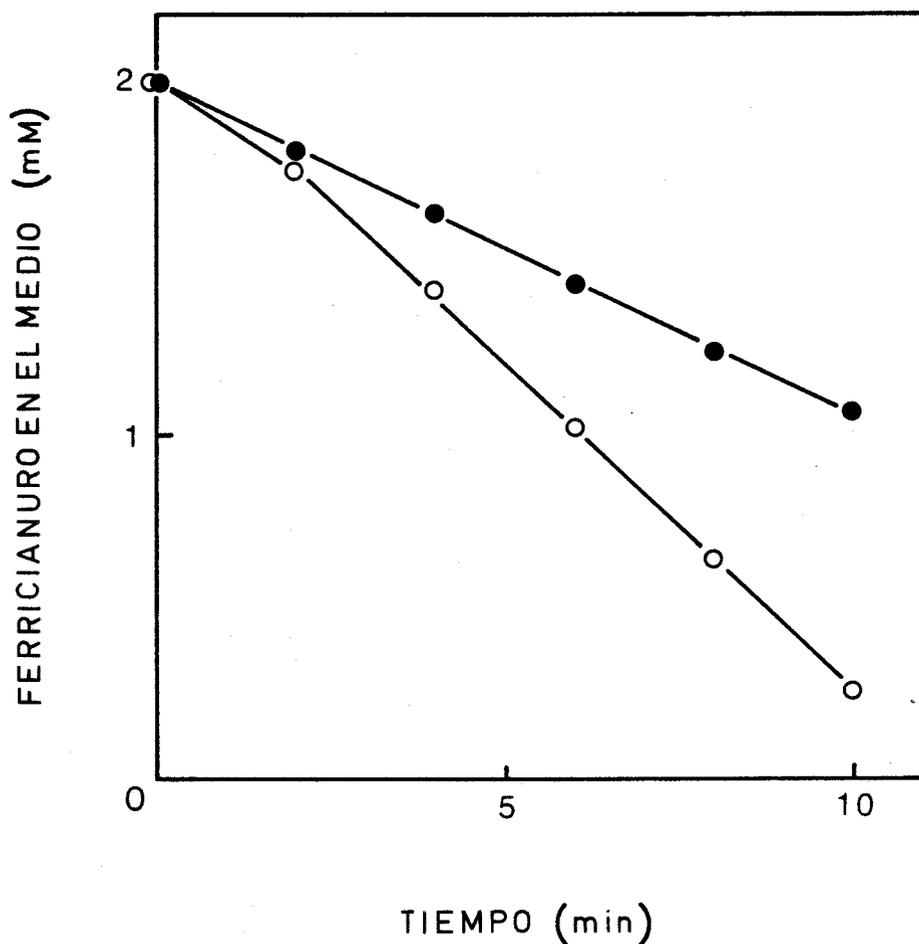


Figura 42. Efecto de la deficiencia en N sobre la actividad del Fotosistema II (reducción de ferricianuro dependiente de p-benzoquinona y luz) en A.nidulans

Suspensiones celulares conteniendo 5 μg de clorofila por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, suplementado con ferricianuro potásico 2 mM, se incubaron a la luz. El ensayo se inició por adición de p-benzoquinona disuelta en etanol (concentración final de p-benzoquinona, 0,2 mM, y de etanol, 0,33%). (o) Células normales, cultivadas con nitrato como fuente de N; (●) células incubadas en condiciones de cultivo, pero sin fuente de N, durante 6 h.

de ferricianuro por células deficientes en N y por células normales, ambas expuestas a la luz, pudiéndose observar que la velocidad de reducción de ferricianuro, expresada en base a clorofila, es superior en las suspensiones de células normales. Estos datos apoyan la sugerencia de que la menor capacidad de fijación de CO_2 de las células deficientes en N sea debida al bajo contenido en ficocianinas de las mismas.

Por otra parte, se ha estudiado la magnitud de la respiración dependiente de sustratos endógenos en células sometidas a ayuno de N, y se ha comparado con la actividad que presentan células normales cultivadas en presencia de una fuente de nitrógeno (Fig. 43). Las células deficientes en N presentan valores de respiración endógena de 3 a 4 veces superiores a los normales. Aunque existen otras posibles interpretaciones, este aumento en la velocidad de respiración endógena podría deberse a un incremento en el nivel celular de sustratos respirables, acumulados durante el período de incubación en medio sin fuente de nitrógeno. Esta interpretación se encuadra en el contexto del aumento del valor de la razón C/N que tiene lugar en respuesta al ayuno de nitrógeno, ya que los sustratos respirables a los que se ha hecho referencia serían compuestos orgánicos reducidos.

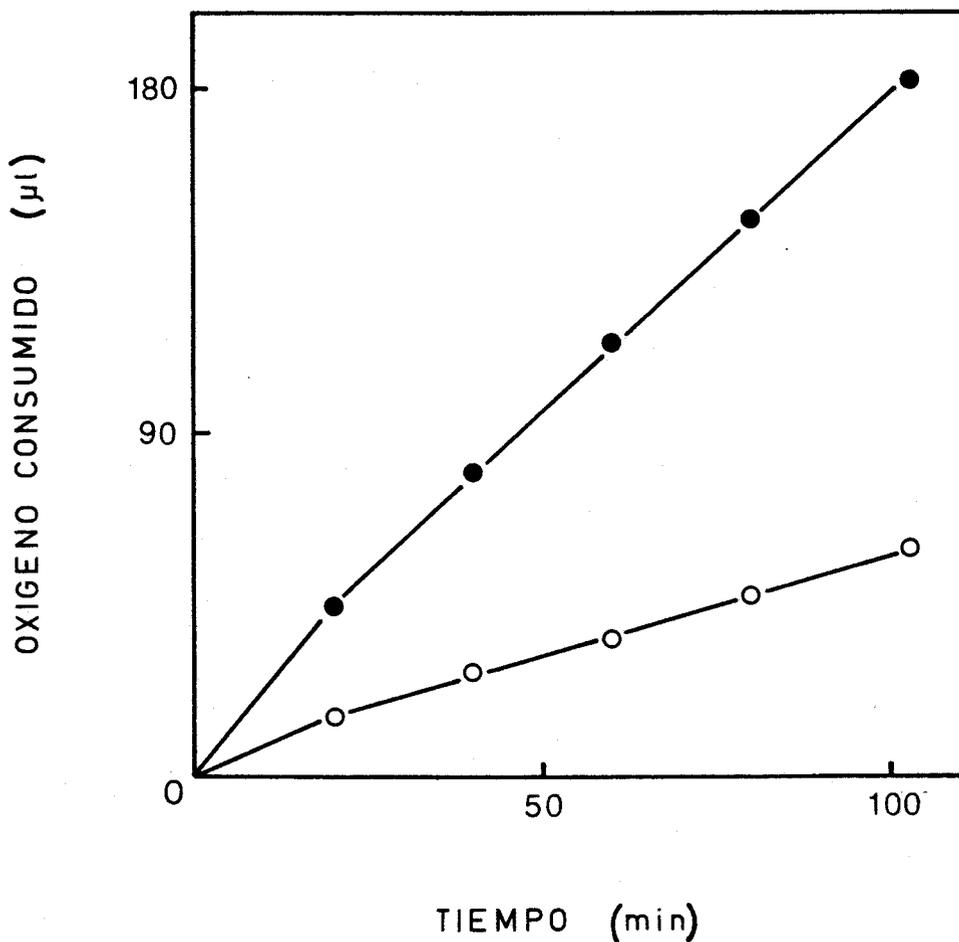


Figura 43. Efecto de la deficiencia en N sobre la respiración de sustratos endógenos en A.nidulans

El experimento se llevó a cabo en oscuridad, en vasijas de Warburg conteniendo en el pocillo central 0,25 ml de KOH al 20% y en el compartimento principal 29,7 μl de células suspendidas en 2,75 ml de tampón de ensayo. (○) Células normales, cultivadas con nitrato como fuente de N; (●) células cultivadas durante 5 h en condiciones de cultivo, pero sin fuente de N.

3.2.3.4.- Regulación de la utilización del nitrato en las células deficientes en N

Se ha estudiado la regulación del consumo de nitrato en células de A.nidulans sometidas a ayuno de nitrógeno mediante la investigación del comportamiento de la utilización del nitrato por estas células en diversas situaciones experimentales, que incluyen: incubación en presencia de amonio, incubación en ausencia de CO₂, e incubación de las células en disoluciones suplementadas con bicarbonato y/o MSX.

Cuando se incuban células deficientes en N en presencia de nitrato y de amonio, se observa consumo de ambos nutrientes durante un período de tiempo de unos 30-40 min, tras el cual la utilización del nitrato cesa (Fig. 44). Este comportamiento es claramente distinto al de las células normales, en las que, en presencia de amonio y de nitrato, se presenta un consumo exclusivo de amonio (apartado 3.2.1.). La magnitud de la utilización del nitrato en presencia de amonio durante los 30 primeros minutos por las células deficientes en N, es de aproximadamente un 50% de la que se observa en las suspensiones celulares incubadas sólo con nitrato, en ausencia de amonio (Fig. 44). Como se ha indicado, esta situación es totalmente distinta a la de las células normales, en las que el amonio causa típicamente entre un 95% y un 100% de inhibición del consumo de nitrato.

Por otra parte, se ha estudiado la utilización del nitrato por células de Anacystis deficientes en N, incubadas en vasijas de Warburg conteniendo una atmósfera libre de CO₂ o con

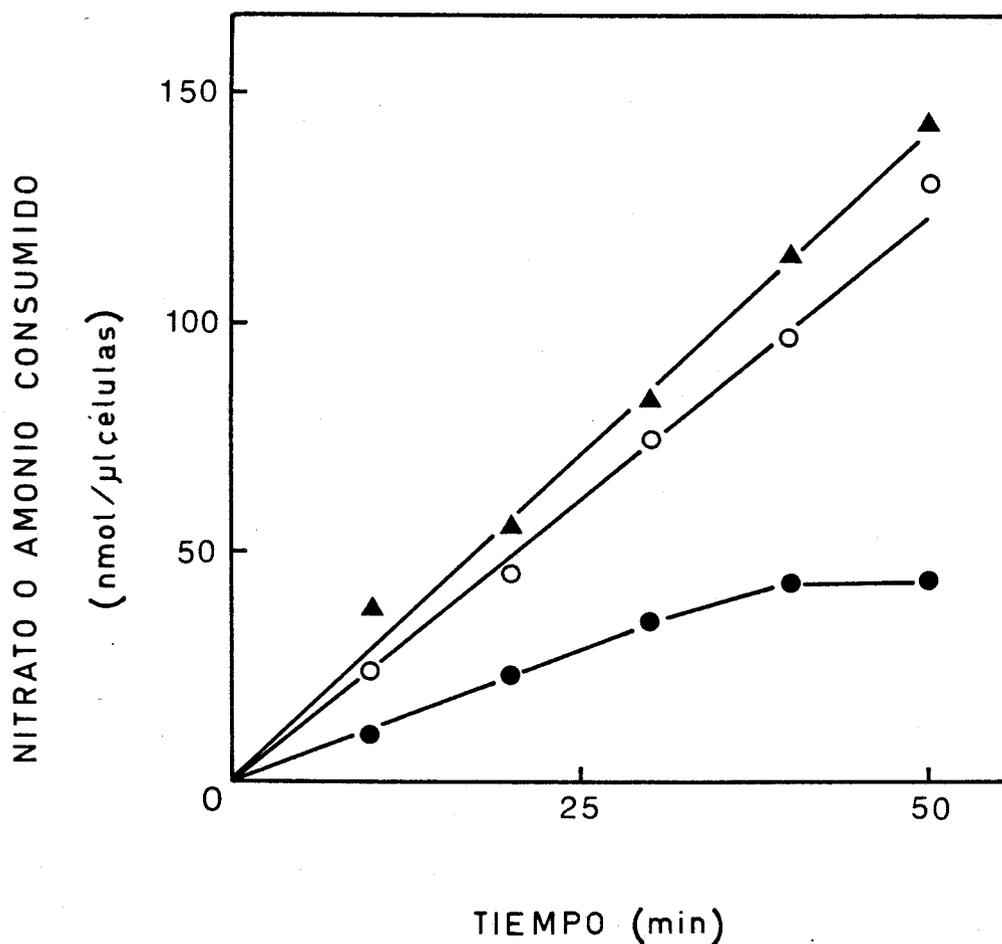


Figura 44. Consumo de amonio y efecto del amonio sobre la utilización del nitrato por células de A.nidulans deficientes en nitrógeno

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1 μ l de células, que habían sido sometidas a ayuno de N durante 5 h, por ml de tampón de ensayo suplementado con CO_3HNa 10 mM, y se inició por adición de NO_3K a concentración final de 0,25 mM (símbolos blancos), o por adición de NO_3K 0,25 mM y ClNH_4 a concentración final de 0,5 mM (símbolos negros).
Círculos: nitrato; triángulos: amonio.

CO₂ a concentración saturante para la fotosíntesis (Fig. 45). A diferencia de lo que ocurría con células normales, las células deficientes en N manifiestan una notable capacidad de consumo de nitrato en ausencia de CO₂, similar a la que se observa en su presencia (Fig. 45). La velocidad de utilización del nitrato en medio libre de CO₂ va disminuyendo a medida que progresa la asimilación del propio nitrato, llegando a tener un valor muy bajo tras 45 min de incubación (Fig. 45).

Por otra parte, la adición de bicarbonato a las suspensiones de células deficientes en N no tiene un efecto estimulador notable sobre la velocidad de consumo de nitrato (Tabla 24), a diferencia de lo que ocurría en células normales cultivadas en presencia de nitrato (véase Fig. 29). En la Tabla 24 puede observarse asimismo que la incubación con MSX de las células deficientes en N no aumenta significativamente la capacidad de utilización del nitrato de las mismas, a diferencia de lo que ocurría en las células normales (véase Fig. 30).

Cuando los ensayos se llevan a cabo en tampón sin más adiciones que el propio nitrato, las células de Anacystis deficientes en N manifiestan una actividad de utilización de nitrato unas 3 ó 4 veces superior a la de las células normales. Sin embargo, cuando estos ensayos se hacen en presencia de MSX o/y bicarbonato, la velocidad que presentan las células deficientes (unos 5 nmol por μ l de células y por min, Tabla 24) es ligeramente inferior a la de las normales (alrededor de 7 nmol por μ l células y por min). Varios factores pueden contribuir a la menor velocidad máxima de consumo de nitrato por células deficientes

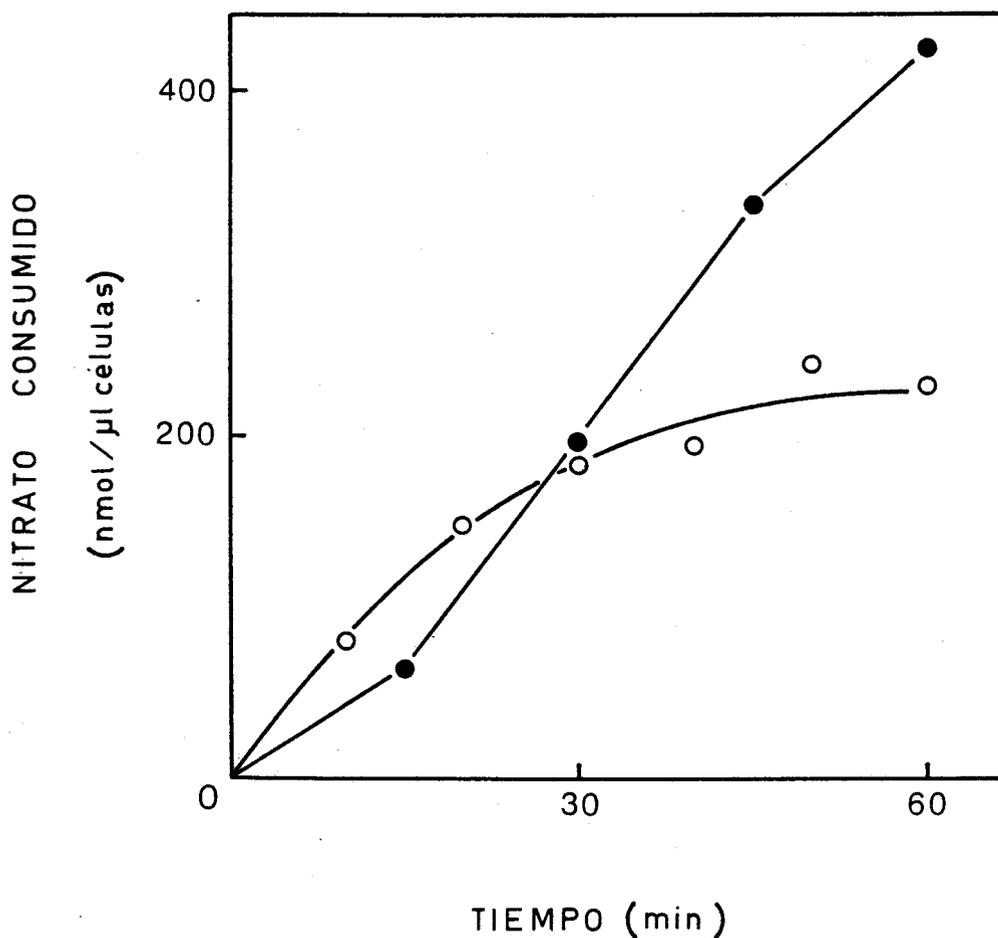


Figura 45. Efecto del CO_2 sobre la utilización del nitrato por células de A.nidulans deficientes en N

Se utilizaron células sometidas a ayuno de N durante 6 h. El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo en el compartimento principal 2,76 μl de células en 2,66 ml de Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, suplementado con NO_3K 0,75 mM. El pocillo central contenía 0,25 ml de KOH al 20% (○) ó 0,25 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6 (●).

Tabla 24. Efecto del bicarbonato y del MSX sobre el consumo de nitrato por células de A. nidulans deficientes en N

Adiciones	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)
Ninguna	88
CO ₃ HNa	91
MSX	109
MSX, CO ₃ HNa	99

Se utilizaron células sometidas a ayuno de N durante 5 h. El ensayo se hizo en condiciones "standard". Las concentraciones fueron: NO₃K, 0,18 mM; CO₃HNa, 9 mM; MSX, 0,9 mM. Tiempo de reacción, 20 min.

en N, tales como un menor nivel de nitrato reductasa (Fig. 39) y la menor actividad de Fotosistema II (Fig. 42), ya que el proceso de utilización del nitrato tiene carácter fotosintético (apartado 3.1.3.).

El comportamiento de las células deficientes en N en lo que se refiere a la respuesta del consumo de nitrato al amonio y al CO_2 puede interpretarse en términos de regulación del proceso por productos de la asimilación del amonio, cuyo nivel celular dependería también de la disponibilidad de esqueletos carbonados. Se sugiere que en las células deficientes en N hay una acumulación de metabolitos orgánicos no nitrogenados, dentro del contexto de la incrementada relación C/N en este tipo de células, que podría contribuir al mantenimiento de bajos niveles celulares de los productos de la asimilación del amonio con carácter inhibitor sobre la utilización del nitrato.

El hecho de que la adición de bicarbonato, que determina una concentración de CO_2 disuelto saturante para la fijación fotosintética de CO_2 , no provoque un incremento de la utilización del nitrato por las células deficientes en N, es indicativo de que la acumulación de esqueletos carbonados en estas células es suficiente para posibilitar la velocidad máxima de consumo de nitrato. Similarmente, el que el tratamiento con MSX de las células deficientes en N no resulte en una estimulación significativa del consumo de nitrato indica que en estas la asimilación del amonio resultante de la reducción del nitrato no determina acumulación de inhibidores de la utilización del nitrato, probablemente debido a la presencia de suficientes esqueletos carbonados

que pueden actuar como aceptores de nitrógeno dando metabolitos no inhibidores.

Por otra parte, tras 30-45 min de asimilación de nitrógeno por las células deficientes, el nivel de metabolitos carbonados acumulados en las mismas puede haberse reducido hasta los valores típicos de las células normales, recuperándose en consecuencia las características de regulación del consumo de nitrato (Fig. 44 y 45).

3.2.4.- Efecto de los aminoácidos sobre el consumo de nitrato

Como interpretación de los resultados expuestos en los apartados anteriores se ha propuesto que el transporte de nitrato en Anacystis nidulans se encuentra modulado por un sistema de regulación que incluye como efectores negativos a algún o algunos de los productos de la asimilación del amonio. En este apartado, tras analizar el efecto de la adición de amonio sobre el contenido celular de glutamina y glutamato, se presentan experimentos realizados para ensayar la capacidad de distintos aminoácidos de inhibir el consumo de nitrato en Anacystis.

3.2.4.1.- Cambios en los niveles de glutamato y glutamina provocados por el amonio

La adición de amonio a suspensiones celulares consumiendo nitrato provoca un cambio inmediato en el contenido celular

de los aminoácidos glutamato y glutamina (Fig. 46). Paralelamente a una disminución en el nivel celular de glutamato tiene lugar un aumento cuantitativamente equivalente en el de glutamina (Fig. 46). Estos cambios se deben a la acción de la enzima glutamina sintetasa, ya que no tienen lugar en células tratadas con MSX, aunque sí en células tratadas con azaserina (Tabla 25).

3.2.4.2.- Respuesta del consumo de nitrato a la presencia de aminoácidos en el medio

Los experimentos que se acaban de presentar indican que la adición de amonio a suspensiones de células que habían sido cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno puede provocar cambios drásticos en los niveles celulares de algunos aminoácidos específicos, tal y como se ha comprobado aquí para los casos de glutamato y glutamina. Para investigar el posible papel inhibitor sobre el transporte de nitrato de algún o algunos aminoácidos, se ha estudiado el efecto sobre la utilización del nitrato de la adición de aminoácidos a suspensiones celulares.

Dada la rapidez con la que se desarrolla la inhibición del consumo de nitrato por amonio, en un primer acercamiento se investigó el efecto de aquellos aminoácidos establecidos en cianobacterias como los primeros productos metabólicos que contienen el N del amonio recién añadido a una suspensión celular (Meeks et al., 1977): glutamina, glutamato, aspartato, citrulina y arginina. En la Tabla 26 se presenta el efecto de la presenen

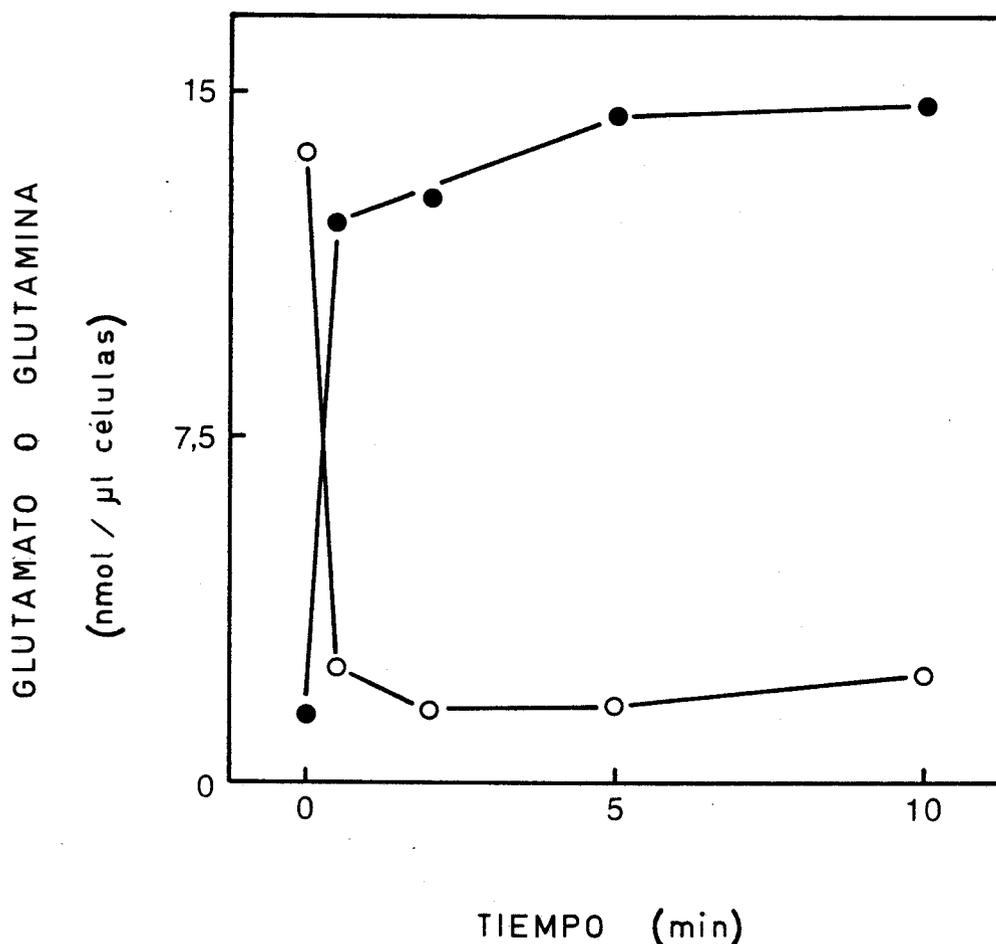


Figura 46. Cambio en los niveles celulares de glutamato y glutamina en respuesta a la adición de amonio a células de A.nidulans consumiendo nitrato

A tiempo cero se añadió ClNH_4 (concentración final, 0,3 mM) a suspensiones conteniendo 2,2 μl de células por ml de tampón de ensayo, que se encontraban consumiendo nitrato desde 5 min antes (concentración final de NO_3K añadido, 0,3 mM). A los tiempos indicados después de la adición del amonio se añadía ácido perclórico y los extractos correspondientes se trataban como se describe en Materiales y Métodos para la determinación de metabolitos celulares. (o) Glutamato; (●) glutamina.

Tabla 25. Efectos de MSX y azaserina sobre los niveles celulares de glutamato y glutamina en suspensiones celulares de A. nidulans suplementadas con nitrato y amonio

Adiciones	Contenido celular (nmol/ μ l células)		
	Gln	Glu	Gln + Glu
Nitrato	3,6	13,7	17,3
Nitrato, amonio	19,2	2,1	21,3
Nitrato, amonio, MSX	3,2	15,9	19,1
Nitrato, amonio, azaserina	14,3	1,9	16,2

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 2,25 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 5 mM, pH 8,3. Tras 10 min de incubación en condiciones de ensayo con, donde se indica, MSX 0,33 mM o azaserina 0,33 mM, se añadió a la suspensión celular NO_3K (0,32 mM, concentración final) sólo o en combinación con ClNH_4 (0,4 mM, concentración final). Diez min después se añadió ácido perclórico y los extractos correspondientes se trataron como se describe en Materiales y Métodos para la determinación de metabolitos celulares. En el mismo experimento se comprobó la efectividad de MSX y azaserina a las concentraciones utilizadas. Los metabolitos se cuantificaron mediante determinaciones enzimáticas, y, además, se visualizaron con ninhidrina tras su separación por cromatografía en papel.

Tabla 26. Efecto de varios aminoácidos sobre el consumo de nitrato por A. nidulans

Aminoácido	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)	
	-Aminoácido	+Aminoácido
Aspartato	127	145
Arginina	153	27
Citrulina	130	121
Glutamato	131	136
Glutamina	115	29

Los experimentos se llevaron a cabo con suspensiones conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón de ensayo suplementado con CO_3HNa 10 mM. A tiempo cero se añadió NO_3K (0,2 mM, concentración final) y, cuando así se indica, el correspondiente L-aminoácido a concentración 10 mM. Tiempo de reacción, 15 min.

cia de cada uno de estos cinco aminoácidos (a concentración final de 10 mM) sobre el consumo de nitrato por suspensiones de células de Anacystis. Mientras que aspartato, glutamato y citrulina no tienen ningún efecto notable sobre la utilización del nitrato, la presencia de glutamina o de arginina en el medio provoca una fuerte inhibición del consumo de nitrato (Tabla 26). Los resultados obtenidos fueron similares para los distintos aminoácidos cuando éstos se añadieron a la suspensión celular 45 min antes de la adición del nitrato, manteniéndose las células durante este período de tiempo en condiciones de ensayo.

Si la concentración de glutamina o de arginina añadida a la suspensión celular 30 min antes de la adición del nitrato era de 2 mM, se seguía encontrando el drástico efecto inhibitorio de la arginina, mientras que ya no se observaba la inhibición por glutamina. En la Figura 47 se presentan los resultados de un experimento en el que se estudió el efecto de distintas concentraciones de arginina sobre el consumo de nitrato, y en el que se encontró que un cambio en la concentración de arginina de 0,4 a 2 mM causa un aumento en la inhibición del consumo de nitrato desde un 10% a un 70% de inhibición. Una preincubación de 20 min con arginina a concentración 0,75 mM no aumentaba la inhibición por este aminoácido del consumo de nitrato, con respecto a un control en el que la arginina se añadía a la vez que el nitrato a la suspensión celular (inhibición por arginina 0,75 mM:30%).

Con objeto de comprobar si la glutamina y la arginina tenían capacidad para causar inhibición de la utilización del nitrato,

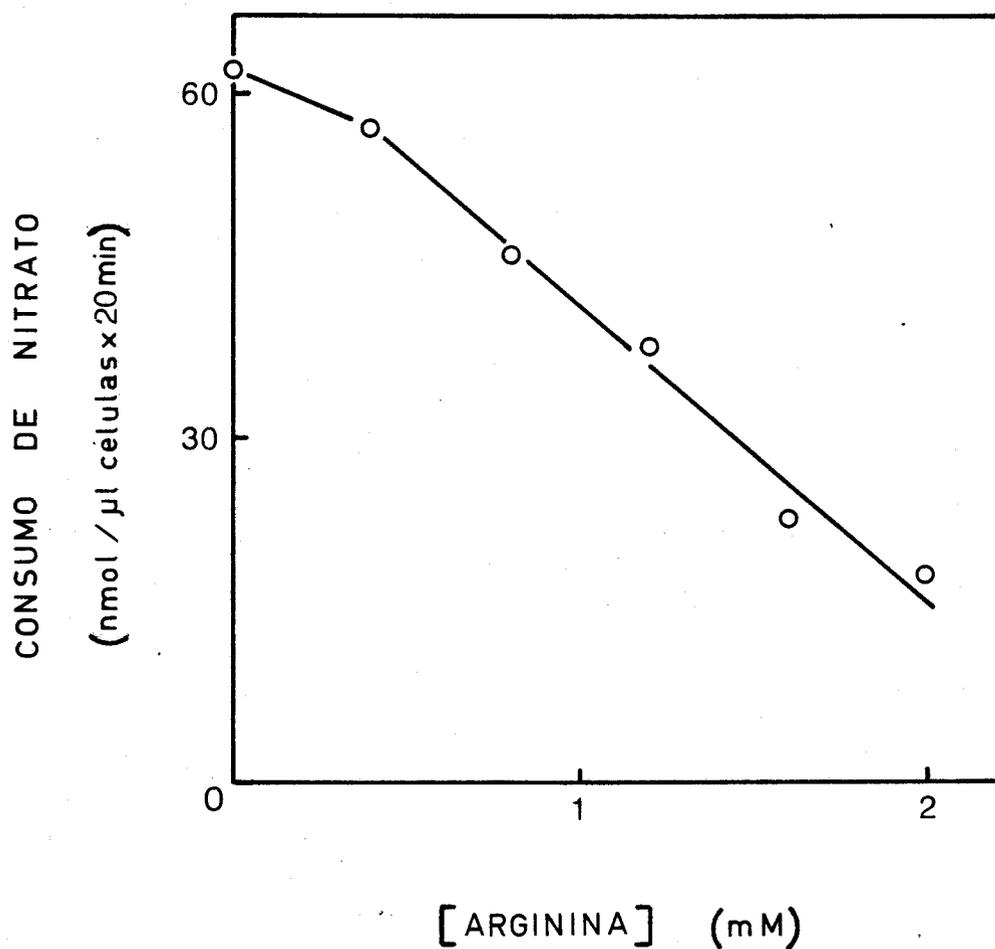


Figura 47. Efecto de la concentración de arginina añadida sobre el consumo de nitrato por A.nidulans

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1,5 μl de células por ml de tampón de ensayo, suplementado a tiempo cero con NO_3K (concentración final, 0,2 mM) y L-arginina a la concentración indicada.

trato en condiciones en las que el amonio no podía ejercer su efecto inhibitor, por encontrarse inactivada la glutamina sintetasa, se estudió el efecto de estos aminoácidos sobre el consumo de nitrato por células pretratadas con MSX. En la Tabla 27 se presentan los resultados obtenidos, incluyéndose como control un ensayo en presencia de amonio, presentándose también, en todos los casos, los valores de liberación de amonio por las células. Por haber sido pretratadas con MSX, la presencia de amonio en la suspensión no inhibe el consumo de nitrato por las células. Los valores de inhibición por glutamina o por arginina, ambas a concentración 10 mM, son, sin embargo, menores que los que se obtenían en células sin tratar con MSX (comparar con los datos de la Tabla 26), reduciéndose la inhibición por arginina a un 55% y haciéndose la de la glutamina poco destacada, sólo de un 15%.

En los resultados presentados en la Tabla 27 destaca el hecho de que mientras que, como cabía esperar, en las suspensiones no suplementadas con aminoácido se encontraba una producción de amonio por las células próxima (87-92%) a la cantidad de nitrato consumida, en las suspensiones suplementadas con glutamina o con arginina se encontraba una producción de amonio que excedía al consumo de nitrato, y que era de una magnitud especialmente notable para el caso de la arginina.

A la vista de la producción de amonio, catalizada por las células, a partir de glutamina y arginina, la menor inhibición por estos aminoácidos del consumo de nitrato en células tratadas con MSX en comparación con las células normales no trata-

Tabla 27. Efecto de la glutamina y de la arginina sobre la utilización del nitrato y sobre la liberación de amonio por células de A. nidulans tratadas con MSX e incubadas en presencia de nitrato

Adiciones	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)	Amonio producido (nmol/ μ l células)
Ninguna	199	183
Amonio	203	176
Glutamina	170	202
Arginina	91	378

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1,65 μ l de células, que habían sido previamente tratadas con MSX, por ml de tampón de ensayo sin suplementar con MSX. A tiempo cero la suspensión celular se suplementó con NO_3K (0,4 mM, concentración final) sólo o en combinación con los compuestos indicados a las siguientes concentraciones finales: ClNH_4 , 0,4 mM; L-glutamina, 10 mM; L-arginina, 10 mM. Tiempo de ensayo, 20 min. En el experimento se utilizaron células recogidas y lavadas por filtración, que habían sido incubadas con MSX 1 mM y NO_3K 0,4 mM en tampón de ensayo, a la luz y a 40°C, durante 30 min.

das, puede interpretarse en términos de que la inhibición observada en las suspensiones de células normales era en parte (arginina), o casi totalmente (glutamina), provocada por el amonio producido a partir de los aminoácidos.

Utilizando como material biológico experimental células de A.nidulans pretratadas durante 15 min con MSX 1 mM se investigó el efecto de 21 aminoácidos sobre el consumo de nitrato. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28, donde se observa que sólo los aminoácidos arginina y lisina provocan, a corto plazo, una inhibición notable de la utilización del nitrato. Aparte de éstos, solamente la asparagina y la ornitina presentaban un cierto efecto inhibitor del consumo de nitrato.

En experimentos paralelos, llevados a cabo sin añadir nitrato a la suspensión celular, se investigó la producción de amonio en las suspensiones suplementadas con los distintos aminoácidos. Se encontró una notable producción de amonio a partir de los aminoácidos básicos arginina, lisina y ornitina, y, en menor cuantía, a partir de glutamina. La liberación de amonio a partir de los aminoácidos básicos en A.nidulans se encuentra catalizada por una aminoácido oxidasa específica de L-aminoácidos básicos (véase la caracterización del proceso que se presenta en el apartado 3.4.), mientras que la producción de amonio a partir de glutamina podría explicarse en base a la acción de una glutaminasa, grupo de enzimas de distribución universal (Prusiner y Stadtman, 1973).

Tabla 28. Efecto de distintos aminoácidos sobre el consumo de nitrato por células de A. nidulans pretratadas con MSX

Aminoácido añadido	Consumo de nitrato (% del control)
Alanina	100
Arginina	22
Asparagina	85
Aspartato	110
Cisteína	93
Fenilalanina	113
Glicina	101
Glutamato	97
Glutamina	121
Histidina	94
Isoleucina	142
Leucina	107
Lisina	56
Metionina	107
Ornitina	82
Prolina	100
Serina	105
Tirosina	110
Treonina	94
Triptofano	106
Valina	94

El experimento se llevó a cabo con suspensiones conteniendo 1 μ l de células por ml de tampón Tricina-NaOH 50 mM, pH 8,1, suplementadas con NO_3K (0,33 mM, concentración final) sólo o con el aminoácido indicado a concentración 20 mM, excepto la ornitina (24 mM) y la tirosina (añadida a saturación). Excepto la glicina, todos los aminoácidos se añadieron como isómero L. El ensayo se llevó a cabo en ausencia de MSX, con células tratadas previamente con este inhibidor. El consumo de nitrato se estimó como producción de amonio dependiente de nitrato; es decir, corrigiendo la cantidad de amonio producida en presencia de nitrato y aminoácido con la cantidad encontrada en presencia de aminoácido sólo. El 100% de la actividad de consumo de nitrato corresponde a 98-200 nmol por μ l de células en 30 min.

3.2.4.3.- Caracterización de la inhibición por aminoácidos básicos.

En la Tabla 29 se muestra el efecto de distintas concentraciones de arginina sobre el consumo de nitrato por células de Anacystis pretratadas con MSX. El cambio de la concentración de arginina en el medio de 4 a 24 mM provocó un aumento de la inhibición de la utilización del nitrato de un 29% a un 57%, lo que, si se compara con la dependencia de concentración de arginina de la producción de amonio dependiente de este aminoácido (véase Fig. 53), indica que la concentración de arginina necesaria para inhibir el consumo de nitrato es del mismo orden de magnitud que la concentración de este aminoácido que permite, como sustrato, velocidades elevadas de funcionamiento de la aminoácido oxidasa.

A la vista de este resultado y dado que en experimentos de tiempo corto con células tratadas con MSX, como los que aquí se han presentado, sólo manifiestan una notable inhibición del consumo de nitrato los aminoácidos que precisamente son sustratos de la L-aminoácido oxidasa, se ha investigado si existe alguna relación entre el funcionamiento de esta enzima y la inhibición de la utilización del nitrato. Unos inhibidores característicos de la aminoácido oxidasa de A.nidulans son los cationes divalentes, entre los que es especialmente efectivo el Mg^{++} (apartado 3.4.2.). Se ha estudiado, en consecuencia, el efecto de la arginina sobre la utilización del nitrato en suspensiones de células pretratadas con MSX, suplementadas con una concentración

Tabla 29. Efecto de distintas concentraciones de arginina sobre el consumo de nitrato por células de A. nidulans pre-tratadas con MSX

{Arginina} (mM)	Nitrato consumido (nmol/ μ l células)
0	171
4	121
12	104
24	74

El ensayo de consumo de nitrato se llevó a cabo en ausencia de MSX en suspensiones conteniendo 0,8 μ l de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1. A tiempo cero las suspensiones se suplementaron con NO_3K (0,4 mM, concentración final) y, donde se indica, con L-arginina a las concentraciones finales indicadas. El consumo de nitrato se estimó como producción de amonio dependiente de nitrato. Tiempo de ensayo, 20 min.

de Mg^{++} que inhibe fuertemente de la producción de amonio dependiente de arginina. En la Tabla 30 se presentan los resultados obtenidos, que indican que la presencia de Mg^{++} en el medio suprime totalmente el efecto inhibitor de la arginina sobre el consumo de nitrato, mientras que no afecta a este último. Por lo tanto, parece existir una relación entre el funcionamiento de la aminoácido oxidasa y la capacidad de los aminoácidos básicos para inhibir la utilización del nitrato en Anacystis nidulans.

Los resultados que se han presentado en este apartado no permiten sugerir la participación en el sistema de regulación de la utilización del nitrato de ninguno de los aminoácidos cuyo efecto sobre el consumo de nitrato se ha ensayado. Los únicos aminoácidos que provocan una inhibición resaltable de la utilización del nitrato por las células tratadas con MSX, la arginina y la lisina, manifiestan dicho efecto a unos valores elevados de concentración, que es incierto que se puedan encontrar en las células en condiciones fisiológicas.

Tabla 30. Prevención por Cl_2Mg de la inhibición por arginina del consumo de nitrato en células pretratadas con MSX

Adiciones	Nitrato consumido (nmol/ μl células)
Ninguna	124
Arginina	70
Cl_2Mg	120
Cl_2Mg , arginina	110

El ensayo de consumo de nitrato se llevó a cabo en ausencia de MSX en suspensiones conteniendo 1 μl de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1. A tiempo cero las suspensiones se suplementaron con NO_3K (0,5 mM, concentración final) sólo o con las adiciones indicadas a las siguientes concentraciones finales: Cl_2Mg , 1mM; L-arginina, 25 mM. El consumo de nitrato se estimó como producción de amonio dependiente de nitrato. Tiempo de ensayo, 20 min.

3.3. INHIBICION POR AMONIACO DE LA FOTOSINTESIS EN A.nidulans

Al tratar el tema de la regulación de la utilización del nitrato en Anacystis, se han presentado datos de una inhibición del consumo de nitrato por concentraciones bajas de amonio, habiendo sido menores de 0,5 mM las utilizadas habitualmente en los experimentos. Una característica de esa inhibición es que mientras que anula totalmente el consumo de nitrato en células normales de Anacystis, no afecta en absoluto a células tratadas con MSX.

Sin embargo, un aumento considerable de la concentración del amonio añadido sí llega a afectar negativamente a la capacidad de utilización del nitrato por células de A.nidulans tratadas con MSX, en una inhibición que se hace especialmente evidente cuando se aumenta el pH del medio de ensayo de consumo de nitrato (Fig. 48). Dado que el pKa del par amoniaco/ión amonio es 9,2, la relación con el pH de esta inhibición del consumo de nitrato por altas concentraciones de amonio, en células tratadas con MSX, sugiere un papel de la forma amoniaco en dicha inhibición. La concentración de amoniaco necesaria para causar un 50% de inhibición del consumo de nitrato es aproximadamente 2,9 mM.

Por otra parte, el amonio a concentración y pH elevados también inhibe la fijación fotosintética de CO₂, estimada aquí siguiendo su desprendimiento de oxígeno asociado, tanto en células normales (Fig. 49) como en células tratadas con MSX. La inhibición por amonio de esta actividad fotosintética en Anacys-

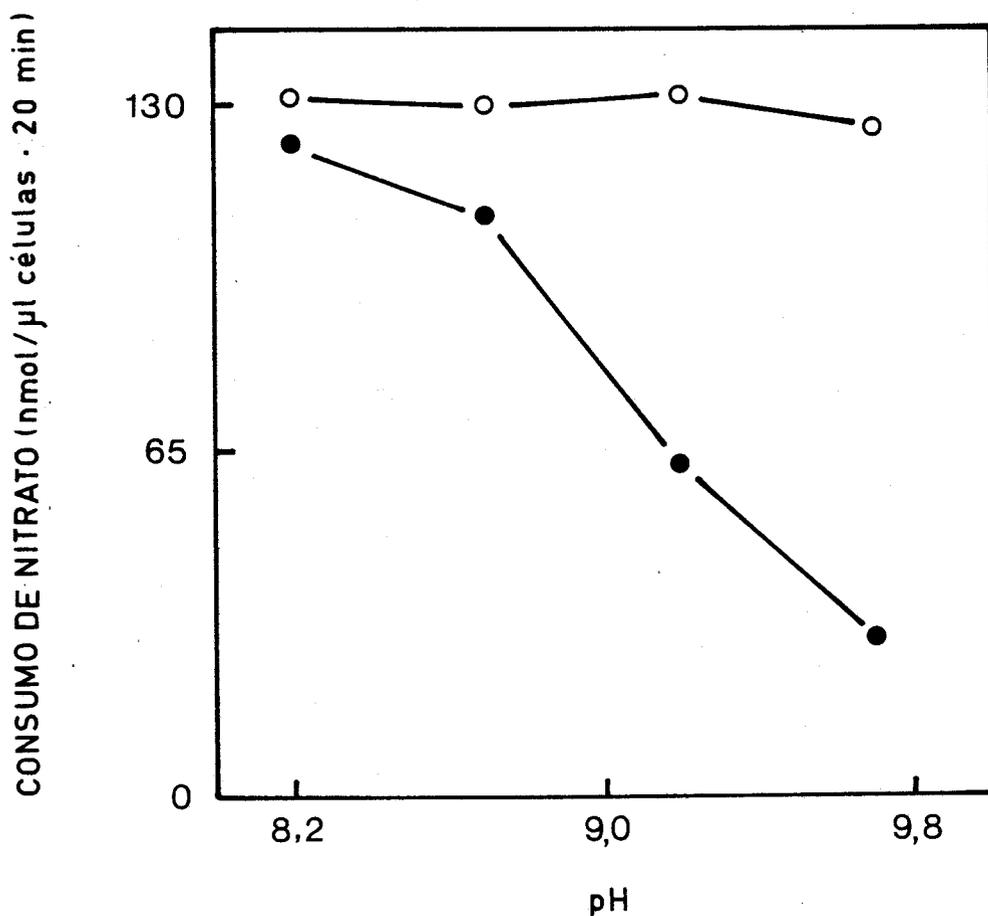


Figura 48. Efecto del pH sobre la inhibición del consumo de nitrato por 6 mM de ClNH_4 en células de A.nidulans tratadas con MSX

El experimento se llevó a cabo con células que habían sido tratadas con MSX 1 mM. Los ensayos se realizaron con suspensiones conteniendo 1 µl de células por ml de tampón Tricina 35 mM-Glicina 35 mM-NaOH del pH indicado en cada caso y suplementados con 0,4 mM de NO_3K (o) ó 0,4 mM de NO_3K y 6 mM de ClNH_4 (●). El experimento se inició encendiendo la luz.

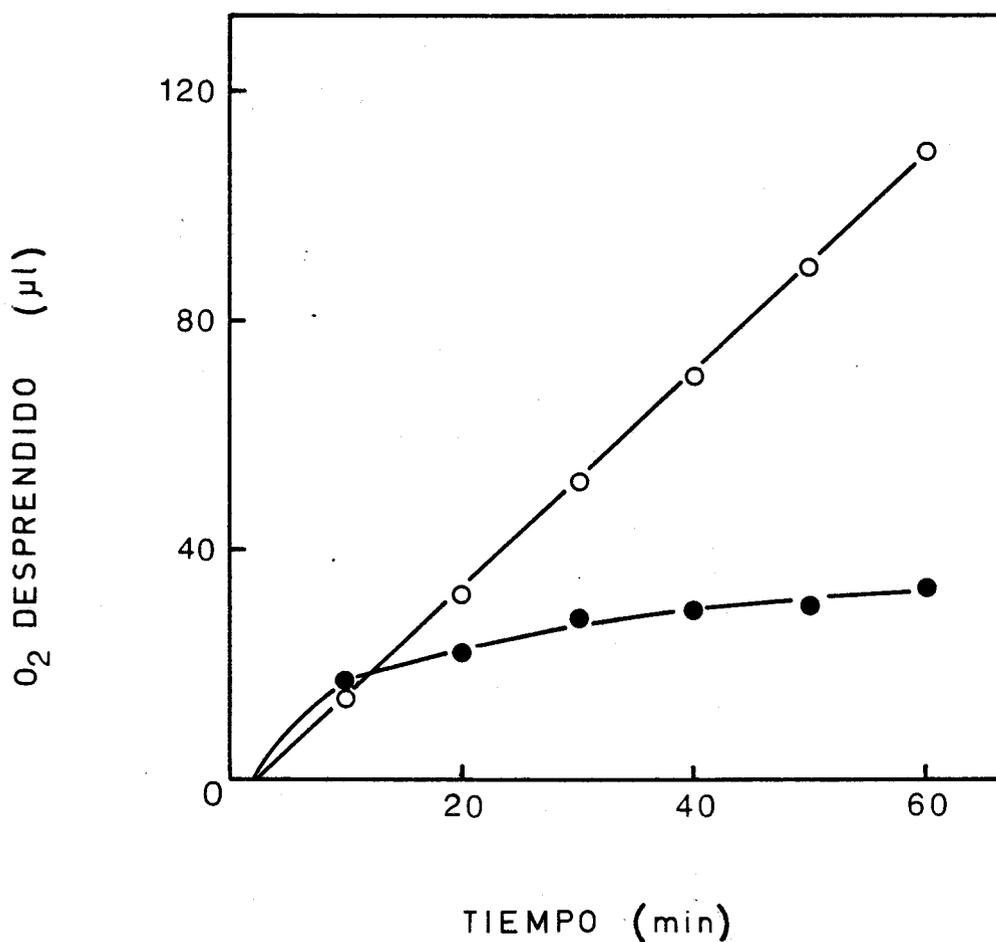


Figura 49. Inhibición por cloruro amónico de la asimilación fotosintética del CO_2 en A.nidulans

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg conteniendo, en el compartimento principal, 2,7 μl de células en 2,5 ml de tampón Glicina-NaOH 30 mM, pH 9,6, y, en el pocillo central, 0,3 ml de tampón bicarbonato/carbonato 0,5 M, pH 9,6. El ensayo se inició encendiendo la luz. A tiempo cero se añadieron desde el brazo lateral 0,2 ml de agua (○) ó 0,2 ml de una disolución de ClNH_4 para dar una concentración final en la suspensión celular de 10 mM (●).

tis se ha caracterizado en cuanto a su relación con el pH (Fig. 50) y con la concentración de amonio a un valor fijo de pH (Fig. 51). La dependencia de esta inhibición respecto al pH del medio sugiere un papel activo del amoniaco en la misma, siendo la concentración de amoniaco necesaria para causar un 50% de inhibición de la fijación del CO_2 alrededor de 2,5 mM.

Se observa una notable semejanza entre las características de la inhibición por amoniaco de la fijación fotosintética de CO_2 en A.nidulans y del consumo de nitrato por células de esta especie tratadas con MSX. Dado el carácter fotosintético de la reducción del nitrato en Anacystis (apartado 3.1.3.), se sugiere que este efecto inhibitorio del amoniaco sobre la utilización del nitrato se encuentra enmarcado dentro de una inhibición, más general, de la fotosíntesis, por amoniaco.

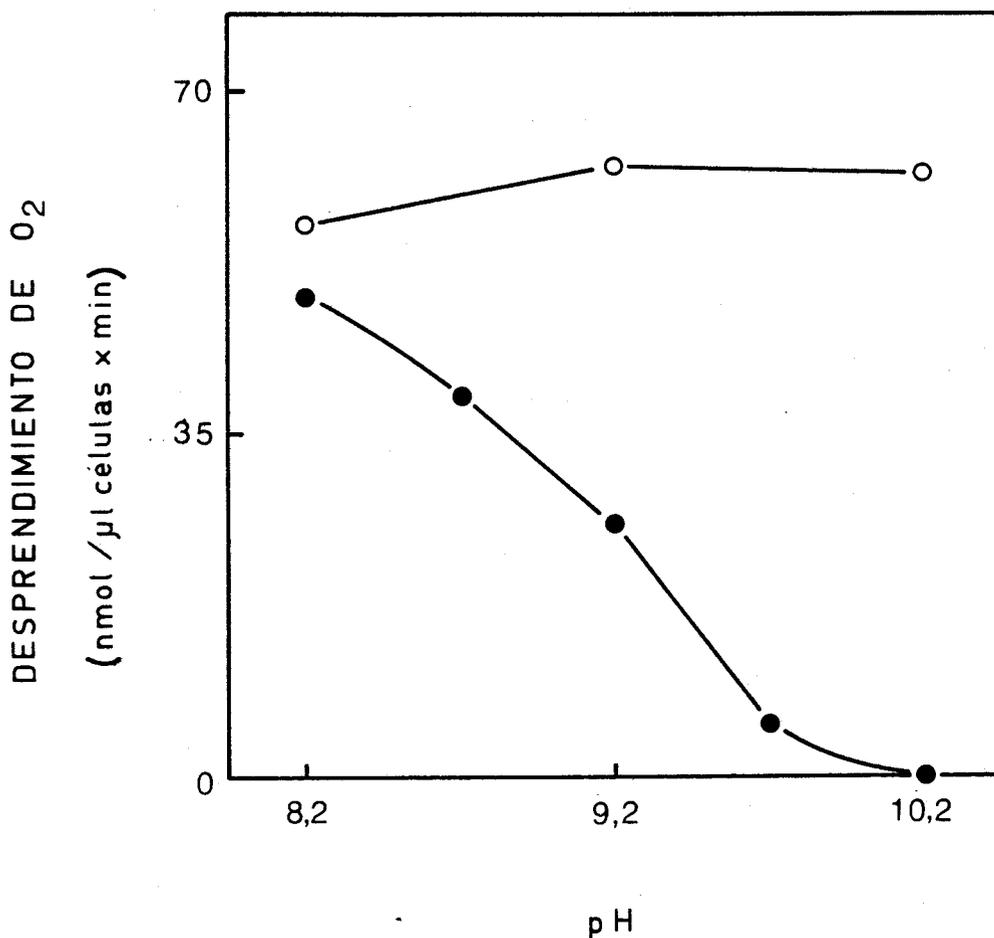


Figura 50. Efecto del pH sobre la inhibición por cloruro amónico de la asimilación fotosintética del CO₂ en A.nidulans

El experimento se desarrolló en vasijas de Warburg en condiciones análogas a las descritas en la leyenda de la Figura 49, salvo que se usaron tampones Tricina 48 mM-Glicina 48 mM-NaOH (concentraciones finales), del pH indicado en cada caso. Cuando se indica (●), las suspensiones celulares se suplementaron a tiempo cero con ClNH₄ 6 mM. Los ensayos se llevaron a cabo durante 60 min, habiéndose considerado como valores de velocidad los alcanzados después de su estabilización en cada caso, la cual tenía lugar 10-20 min después de iniciado el desprendimiento de oxígeno.

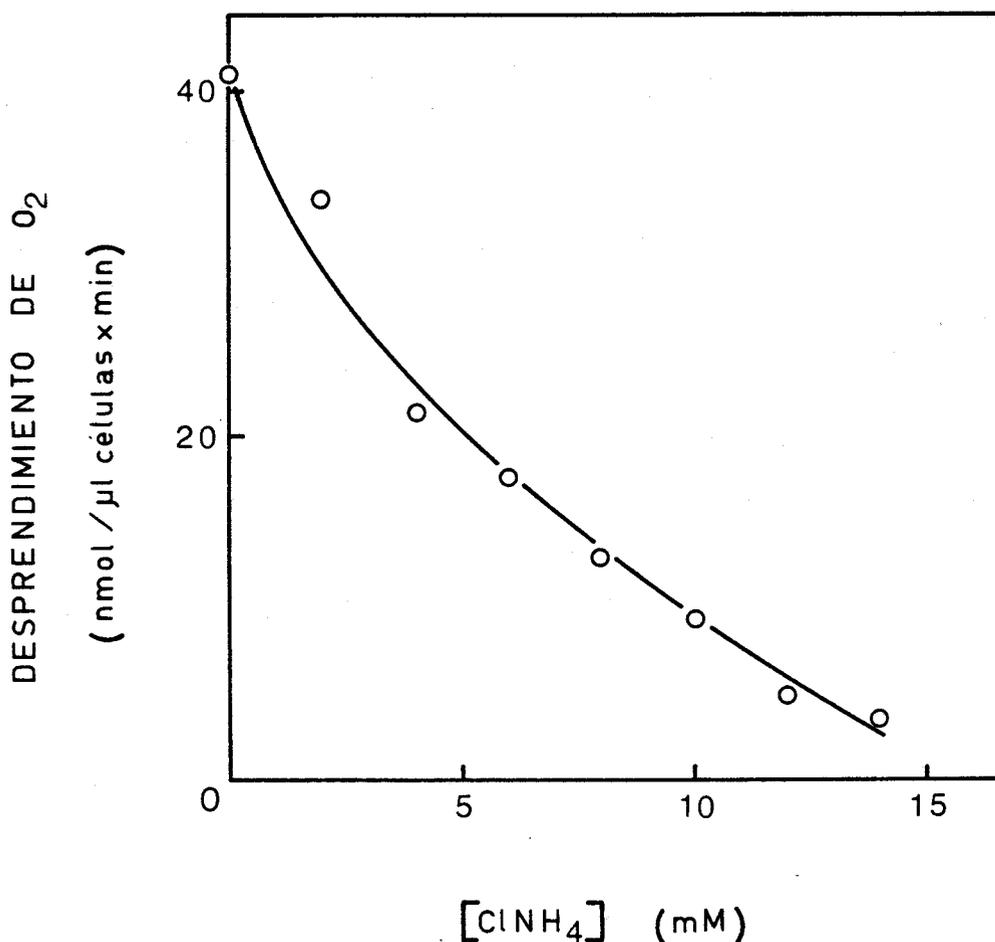


Figura 51. Efecto de la concentración de cloruro amónico sobre la asimilación fotosintética del CO₂, a pH 9,2, en A. nidulans

El experimento se llevó a cabo en vasijas de Warburg en condiciones análogas a las descritas en la leyenda de la Figura 49, salvo que el tampón utilizado fué Tricina 46 mM-Glicina 46 mM-NaOH (concentraciones finales), de pH 9,2. Las suspensiones se suplementaron a tiempo cero con la concentración de ClNH₄ indicada en cada caso. Los ensayos se desarrollaron durante 60 min, habiéndose tomado las velocidades observadas tras la estabilización del proceso después de transcurridos los primeros 20 min.

3.4.- PRODUCCION DE AMONIO DEPENDIENTE DE L-AMINOACIDOS BASICOS POR A.nidulans

Durante los estudios encaminados a establecer la naturaleza de los productos de la asimilación del amonio que podrían participar en la regulación por amonio de la utilización del nitrato, en los que se ensayó el efecto de diferentes aminoácidos sobre el consumo de nitrato por células de Anacystis nidulans tratadas con MSX, se observó que en presencia de ciertos aminoácidos tenía lugar una notable producción de amonio (véase apartado 3.2.4.).

Dado que la información existente en la actualidad sobre el catabolismo de aminoácidos en cianobacterias es muy escasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Weather et al., 1978), se decidió investigar la naturaleza de los procesos relacionados con la generación de amonio a partir de aminoácidos por Anacystis. En este apartado se presenta la caracterización de esta actividad metabólica en células de A.nidulans tratadas con MSX, utilizando como sustratos aminoácidos básicos. La información conseguida indica la participación en el proceso de una aminoácido oxidasa específica para L-aminoácidos básicos, enzima que se ha aislado y caracterizado recientemente en Anacystis (Pistorius et al., 1979; Pistorius y Voss, 1980).

3.4.1.- Caracterización de sustratos

Cuando suspensiones de células de Anacystis tratadas con MSX se incubaban en la oscuridad en ausencia de fuente de nitrógeno añadida, se encontraba una acumulación en el medio de pequeñas cantidades de amonio, probablemente resultante del catabolismo de compuestos celulares nitrogenados. La adición de ciertos aminoácidos a las suspensiones de células tratadas con MSX daba como resultado una acumulación de amonio significativamente mayor que la registrada en los controles sin aminoácido añadido. Esta liberación extra de amonio se encontró repetitivamente en presencia de glutamina, arginina, lisina u ornitina, siendo especialmente significativa para el caso de los tres últimos aminoácidos, todos los cuales tienen caracter básico (Tabla 31). Ocasionalmente se encontró acumulación de pequeñas cantidades de amonio en presencia de cisteína y de histidina. Sin embargo, no se encontró producción de amonio dependiente de aminoácido en presencia de ninguno de los siguientes: alanina, asparagina, aspartato, canavanina, citrulina, glutamato, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina, todos ellos ensayados hasta una concentración final de 20 mM. En todos los casos presentados (excepto glicina) los aminoácidos empleados fueron en forma del isómero L. Los resultados en la Tabla 31 también muestran el hecho de que la generación de amonio a partir de arginina, lisina u ornitina era específica para los isómeros L de estos aminoácidos básicos, siendo inefectivos como sustratos los correspondiendo

Tabla 31. Producción de amonio a partir de algunos aminoácidos por células de A. nidulans tratadas con MSX

Adición	Amonio producido (nmol/ μ l células)
Ninguna	20
L-Glutamina	63
L-Arginina	631
L-Lisina	662
L-Ornitina	264
D-Arginina	19
D-Lisina	12
D-Ornitina	15

Suspensiones conteniendo 1 μ l de células previamente tratadas con MSX 30 mM, pH 8,1, se suplementaron con los aminoácidos indicados a concentración final 25 mM. Tiempo de ensayo, 30 min.

tes isómeros D.

Aunque la producción de amonio a partir de arginina, lisina u ornitina se observaba también con células normales no tratadas, se utilizaron rutinariamente en los ensayos células tratadas con MSX para evitar cualquier posible asimilación del amonio producido. La liberación de amonio al medio dependiente de los aminoácidos básicos es proporcional al tiempo de incubación durante al menos 30 min (Fig. 52) y también a la cantidad de células presente en el ensayo, y dicha producción también tiene lugar en la luz a velocidades similares a las que se encuentran en condiciones de oscuridad.

Se ha estudiado la velocidad de generación de amonio en función de la concentración de arginina, de lisina y de ornitina (Fig. 53). Para los casos de la arginina y de la lisina se encontraron curvas hiperbólicas de saturación por el sustrato, mientras que para el caso de la ornitina se encontró un comportamiento cinético más complejo. Los valores de K_m , calculados a partir de representaciones de Hanes-Woolf de los resultados obtenidos para concentraciones de sustrato en el intervalo de 0 a 20 mM, fueron de 4 mM para la arginina y de 8 mM para la lisina. Las velocidades máximas obtenidas fueron similares con arginina y con lisina, del orden de 15 a 20 nmol de amonio producido por μ l de células por min, para una concentración de sustrato 50 mM. Con la misma concentración de ornitina se observaba una velocidad de generación de amonio aproximadamente mitad de la obtenida con arginina o con lisina.

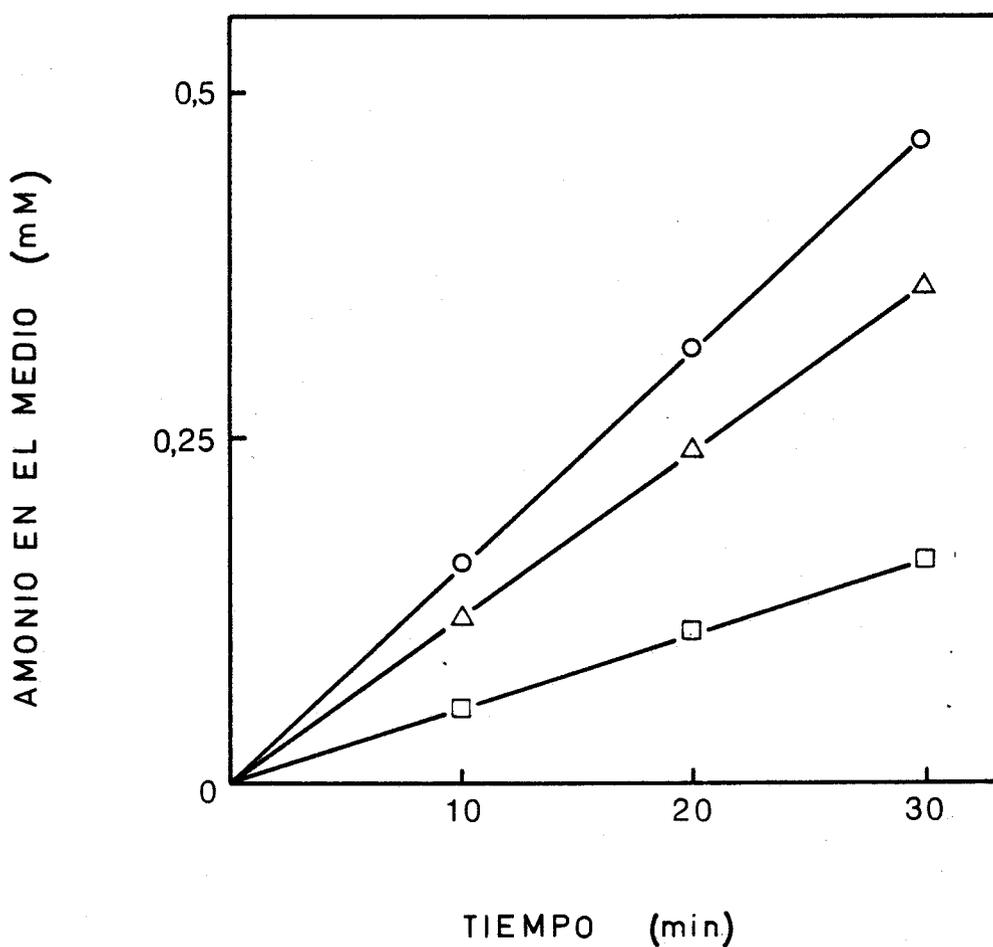


Figura 52. Cinética de la generación de amonio a partir de L-aminoácidos básicos por células de A.nidulans tratadas con MSX

Suspensiones conteniendo 1,18 μ l de células, previamente tratadas con MSX 1 mM, por ml de tampón de ensayo se suplementaron con L-arginina (o), L-lisina (Δ) o L-ornitina (\square) a concentración final 25 mM.

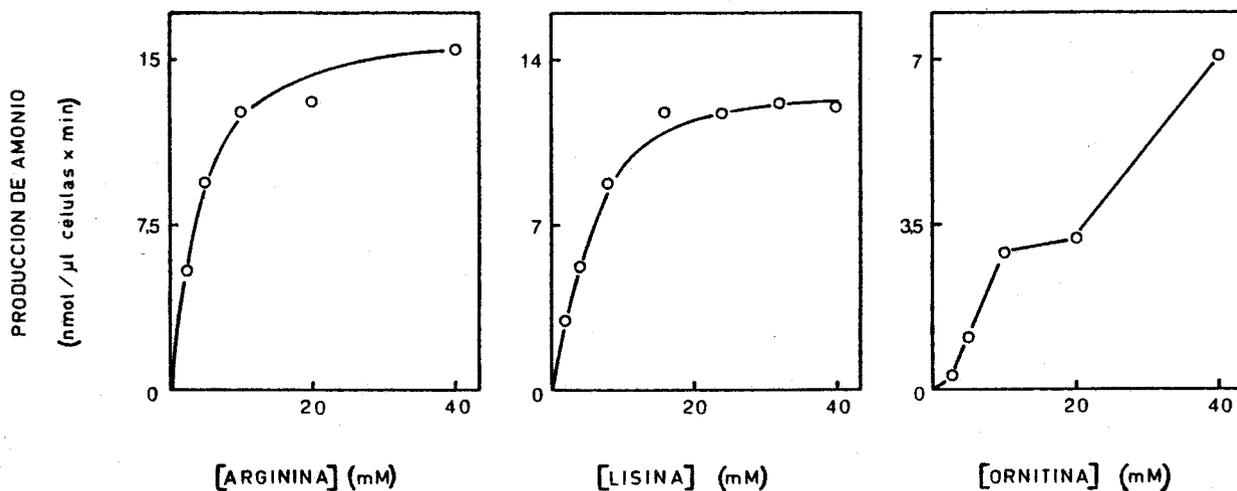


Figura 53. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de producción de amonio a partir de L-arginina, L-lisina y L-ornitina por células de A.nidulans tratadas con MSX

Los experimentos se realizaron con células previamente tratadas con MSX, suspendidas en disoluciones de los distintos L-aminoácidos a las concentraciones indicadas, en tampón de ensayo.

Se ha intentado establecer si la generación de amonio a partir de arginina, lisina y ornitina son procesos independientes o si, por el contrario, comparten algún elemento común. Para ello se ha estudiado la producción de amonio por células de Anacystis tratadas con MSX suspendidas en mezclas de dos de los aminoácidos básicos, y los valores obtenidos se han comparado con los encontrados en suspensiones suplementadas con un aminoácido sólo, arginina, lisina u ornitina. En la Tabla 32 se presentan los datos obtenidos para dos concentraciones distintas de los aminoácidos. Las velocidades de generación de amonio en las mezclas de dos de los aminoácidos siempre fueron menores que la suma de las velocidades obtenidas con cada uno de los dos sustratos ensayados individualmente. Si la producción de amonio a partir de las mezclas hubiera sido igual a dicha suma, ello habría indicado la intervención de procesos independientes. La capacidad limitada de las células para generar amonio a partir de arginina, lisina y ornitina sugiere la participación de un factor común en el catabolismo de estos aminoácidos básicos.

3.4.2.- Participación de una aminoácido oxidasa de L-aminoácidos básicos en la generación de amonio a partir de arginina, lisina y ornitina

Recientemente se ha aislado en A.nidulans una L-aminoácido oxidasa (deaminante), E.C. 1.4.3.2., específica para aminoácidos básicos, la cual ha sido caracterizada en detalle (Pisto-

Tabla 32. Generación de amonio por células de A. nidulans tratadas con MSX a partir de mezclas conteniendo dos de los aminoácidos sustratos

Aminoácido	Amonio producido (nmol/ μ l células)	
	Concentración de cada aminoácido:	
	5 mM	50 mM
Arginina	181	256
Lisina	177	261
Ornitina	58	145
Arginina, lisina	227	256
Lisina, ornitina	183	248
Ornitina, arginina	204	238

Suspensiones conteniendo 1 μ l de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, se suplementaron con los L-aminoácidos indicados a las concentraciones señaladas. Tiempo de ensayo, 15 min.

rius et al., 1979; Pistorius y Voss, 1980). Los mejores sustratos para esta enzima son la arginina y la lisina, mientras que su velocidad de reacción con ornitina es aproximadamente la mitad que la que manifiesta con arginina. La enzima purificada puede también usar la histidina como sustrato, pero la velocidad de reacción en este caso es mucho menor que con otros aminoácidos básicos. La actividad de producción de amonio por células tratadas con MSX con histidina como sustrato es también baja, sólo un 1 ó 2 % de la observada con concentraciones similares de arginina. Las analogías con respecto a la especificidad por los aminoácidos básicos y a la afinidad para la arginina que manifiestan ambos sistemas, indican la posibilidad de que exista una relación entre ellos. Como se ha mencionado, la K_m para la arginina de la producción de amonio por células intactas tiene un valor de 4 mM; por su parte, la L-aminoácido oxidasa presenta una K_m para la arginina de 5 mM (Pistorius y Voss, 1980).

Si esta aminoácido oxidasa fuese de hecho la responsable de la producción de amonio por células intactas de A.nidulans, la actividad in vivo que se presenta en este trabajo no debería observarse en condiciones de anaerobiosis y, además, debería presentar asociada una absorción concomitante de oxígeno (Pistorius y Voss, 1980). La producción de amonio a partir de arginina, lisina u ornitina apenas tenía lugar, de hecho, en anaerobiosis, encontrándose en estas condiciones valores de acumulación de amonio entre el 4 y el 10% de los encontrados en presencia de oxígeno (Tabla 33). Por otra parte, se ha observado la

Tabla 33. Inhibición por condiciones anaeróbicas de la producción de amonio a partir de aminoácidos básicos por células de A. nidulans tratadas con MSX-

Adición	Amonio producido (nmol/ μ l células)	
	Aire	Argon
Ninguna	12	9
Arginina	179	16
Lisina	182	18
Ornitina	93	17

Suspensiones conteniendo 1 μ l de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, se incubaron con los L-aminoácidos indicados a concentración final 25 mM en atmósfera de aire o de argon. Tiempo de ensayo, 15 min.

existencia de una absorción de oxígeno asociada a la generación de amonio a partir de aminoácidos básicos por células de Anacystis tratadas con MSX e incubadas en aerobiosis. Las estequiometrías encontradas han sido alrededor de 0,6 a 0,7 mol de oxígeno consumido por mol de amonio producido (Tabla 34). Estas estequiometrías se afectaban sólo ligeramente por la presencia en el medio de CNK a concentración 1-5 mM, compuesto que inhibe el desprendimiento de oxígeno a partir de H_2O_2 que cataliza la enzima catalasa.

La producción de amonio a partir de arginina por células de Anacystis nidulans tratadas con MSX se inhibía por o-fenantrolina y por los cationes divalentes Mg^{++} y Ca^{++} (Tabla 35). Tanto los cationes divalentes como la o-fenantrolina son inhibidores inusuales de aminoácido oxidasas, pero inhiben drásticamente la actividad de la aminoácido oxidasa de L-aminoácidos básicos de Anacystis (Pistorius y Voss, 1980). Por otra parte, la velocidad de generación de amonio a partir de arginina no se afectaba por la presencia en el medio de los inhibidores metabólicos FCCP, DCCD o cianuro (Tabla 36), todos ellos a concentraciones cuya efectividad inhibiendo distintos procesos en Anacystis se había puesto de manifiesto previamente (véase apartado 3.1.2.). Ya que la aminoácido oxidasa parece estar localizada intracelularmente (Pistorius et al., 1979; Pistorius y Voss, 1980), la falta de efecto del FCCP, del DCCD y del CN^- sugiere que la entrada de los aminoácidos básicos en la célula debe ocurrir pasivamente, por difusión, ya sea facilitada o no.

Tabla 34. Consumo de oxígeno asociado a la producción de amonio a partir de arginina, lisina y ornitina por células de A. nidulans tratadas con MSX

Aminoácido (50 mM)	Oxígeno consumido (μmol)	Amonio aparecido (μmol)	Relación O_2/NH_4^+
Arginina	5,80	9,98	0,58
Lisina	6,16	9,60	0,64
Ornitina	2,86	4,61	0,62

Los experimentos se llevaron a cabo en vasijas de Warburg conteniendo 11 μl de células previamente tratadas con MSX en 2,45 ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, en el compartimento principal, 0,25 ml de KOH al 20% en el pocillo central, y 0,3 ml de una disolución 458,3 mM del correspondiente L-aminoácido en el brazo lateral. A tiempo cero el contenido del brazo lateral se añadió al compartimento principal. La absorción de oxígeno en presencia de los aminoácidos se corrigió respecto a la respiración endógena, y los valores de aparición de amonio se corrigieron con la cantidad de amonio producido por las células en ausencia de los aminoácidos añadidos. El tiempo de ensayo fué de 60 min.

Tabla 35. Inhibición por cationes divalentes y por o-fenantrolina de la producción de amonio a partir de arginina por células de A. nidulans tratadas con MSX

Adición	Concentración (mM)	Inhibición (%)
Cl ₂ Mg	0,1	43
Cl ₂ Mg	1	97
Cl ₂ Ca	0,1	7
Cl ₂ Ca	1	75
<u>o</u> -fenantrolina	1	2
<u>o</u> -fenantrolina	10	69

Suspensiones celulares conteniendo 1 μ l de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón Tricina-NaOH 30 mM, pH 8,1, se suplementaron con L-arginina a concentración 25 mM y con las adiciones indicadas. El valor de producción de amonio del control sin inhibidores añadidos fué de 242 nmol/ μ l células en 15 min.

Tabla 36. Efecto de varios inhibidores metabólicos sobre la producción de amonio a partir de arginina por células de A. nidulans tratadas con MSX

Adición	Amonio producido (nmol/ μ l células)
Ninguna	241
CNK (5 mM)	218
FCCP (20 μ M)	231
DCCD (32 μ M)	235

Suspensiones conteniendo 0,93 μ l de células previamente tratadas con MSX por ml de tampón de ensayo, se suplementaron con los inhibidores indicados. Tras 10 min de incubación a 40°C en presencia de los inhibidores, se empezó la reacción por adición de L-arginina (40 mM, concentración final). Tiempo de ensayo, 20 min.

Los resultados expuestos en este apartado permiten sugerir que la L-aminoácido oxidasa (deaminante) de aminoácidos básicos de Anacystis es la enzima responsable la producción de amonio a partir de arginina, lisina y ornitina por células intactas de esta cianobacteria. No se conoce cuál es la función de esta enzima en el metabolismo celular, aunque se han hecho algunas sugerencias (Pistorius et al., 1979; Pistorius y Voss, 1980). Sin embargo, cabe señalar la notable magnitud de producción de amonio por células de A.nidulans en suspensiones suplementadas con los aminoácidos básicos, que es muy superior, por ejemplo, a las velocidades de asimilación de nitrógeno inorgánico, y aproximadamente del mismo orden de magnitud que el desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de CO_2 . La generación de amonio a partir de arginina podría explicar la capacidad de Anacystis para crecer con este aminoácido como única fuente de nitrógeno. De hecho, se ha comprobado que la velocidad de crecimiento de A.nidulans con arginina es muy próxima a la que se obtiene con nitrato o amonio (tiempo de generación, 4 h).

4.- DISCUSSION

•

En la primera parte de este trabajo se ha presentado una descripción de la naturaleza de los elementos que participan en las distintas etapas de la asimilación del nitrato en Anacystis nidulans.

El nitrato parece entrar en la célula mediante un sistema de transporte que actúa concentrativamente, según se deduce a partir de las distintas propiedades que presentan el proceso de utilización del nitrato y el sistema de reducción del mismo. Por un lado, las células intactas presentan una afinidad por el nitrato de, al menos, dos órdenes de magnitud superior que la que presenta la nitrato reductasa. Por otra parte, el proceso de utilización del nitrato manifiesta un requerimiento por energía en forma de ATP que no puede adscribirse al sistema de reducción.

La afinidad hacia el nitrato que manifiestan las células de Anacystis (K_m para el nitrato menor de $10 \mu\text{M}$) es similar a la descrita para otras algas (Eppley y Coatsworth, 1968; Serra et al., 1978a; Syrett y Leftley, 1976; Tischner y Lorenzen, 1979) y para la cianobacteria filamentosa Oscillatoria (Zevenboom y Mur, 1979; Zevenboom et al., 1980). La alta afinidad por el nitrato que presentan las células de estas distintas especies tiene un sentido ecológico claro, ya que las concentraciones de nitrato que se encuentran en las aguas en la Naturaleza son normalmente de 1 a $10 \mu\text{M}$ y raramente superiores a 30 ó $40 \mu\text{M}$ (Fogg, 1975). Así, estos microorganismos poseen sistemas capaces de utilizar este nutriente con gran efectividad a las concentraciones a las que usualmente se presenta en hábitats naturales.

La íntima relación existente entre la desaparición de nitrato del medio y su reducción intracelular, en diversos tipos de organismos, ha llevado a Butz y Jackson (1977) a proponer que la propia nitrato reductasa es la molécula que actúa como permeasa del nitrato. Por otra parte, también se encuentra en la literatura la sugerencia de que el nitrato podría entrar en la célula por simple difusión no facilitada (Gibson, 1981). Los datos que se han presentado en este trabajo (apartado 3.1.2.1.) se interpretan mejor, sin embargo, asumiendo la participación de una permeasa, distinta de la molécula de nitrato reductasa, en el paso de entrada del nitrato al interior de la célula. Si la nitrato reductasa fuera el elemento celular responsable de la captación del nitrato del medio, la afinidad de las células hacia este nutriente se esperaría que fuera similar a la K_m de dicha enzima para el mismo. Una K_m de las células para un sustrato de menor magnitud que la K_m para el mismo de la primera enzima intracelular implicada en su metabolización, como ocurre en el caso de la asimilación del nitrato en Anacystis, es un hecho que sugiere la participación de una permeasa (probablemente catalizando un transporte activo) en la entrada del sustrato al interior de la célula (véase, por ejemplo, Hayashi y Lin, 1965).

La sensibilidad del proceso de utilización del nitrato al desacoplante FCCP y al inhibidor de ATPasas DCCD confirma el carácter activo del transporte de nitrato. La inhibición del consumo de nitrato por agentes desacoplantes se ha descrito en diversos microorganismos (Hofmann, 1972; Schloemer y Garret, 1974;

Ullrich, 1974; Cresswell y Syrett, 1981; Larsson y Andersson, 1981), incluida la cianobacteria Anabaena cylindrica (Ohmori et al., 1977). El nitrato parece pues ser concentrado, en contra de su gradiente electroquímico, en el interior celular.

La capacidad de las células de Anacystis para concentrar nitrato se deduce también de la velocidad de reducción de nitrato in vivo que pueden manifestar en condiciones de baja concentración de nitrato en el medio externo. Las células tratadas con MSX presentan velocidades de consumo de nitrato de alrededor de 7 nmol/min· μ l células, incluso con concentraciones de nitrato en el medio tan bajas como 15 ó 20 μ M. Dado que estas células presentan un contenido en nitrato reductasa de unas 30 mU/ μ l células (según estimaciones in situ, con metil viológeno reducido con ditionito como reductor) y que la K_m (NO_3^-) de la enzima es 0,7 mM (Candau, 1979), la concentración intracelular de nitrato requerida para que se den las velocidades de reducción observadas in vivo es de alrededor de 0,2 mM. La necesidad de un transporte activo para conseguir estas concentraciones intracelulares de nitrato se hace aún más evidente si se considera la naturaleza aniónica del sustrato, ya que las células de Anacystis, de forma similar a otros organismos, generan, en condiciones fisiológicas, un potencial eléctrico de membrana de alrededor de 100 mV, negativo en el interior con respecto al exterior (Paschinger, 1977; Zdrou y Tromballa, 1981). Para un potencial de membrana de -100 mV, el nitrato estaría en equilibrio a ambos lados de la membrana (gradiente electroquímico de nitrato igual a cero) cuando

do la concentración extracelular fuera 40 veces superior a la intracelular.

A pesar de la existencia de un transporte concentrativo de nitrato en A.nidulans, experimentalmente se ha observado una relación estrecha entre consumo y metabolización intracelular del sustrato (apartado 3.1.1.2.), hasta el punto de que la inhibición del paso de reducción provocaba una anulación de cualquier desaparición estimable de nitrato del medio. Este tipo de dependencia por actividad nitrato reductasa del consumo de nitrato se ha empleado para apoyar la interpretación de la identidad nitrato reductasa-permeasa del nitrato. Las siguientes consideraciones pueden aclarar las dificultades experimentales que se encuentran al intentar estimar la desaparición de nitrato del medio en un sistema de células carentes de actividad nitrato reductasa, esto es el intento de estudio del paso de transporte de nitrato aislado, aún cuando participe activamente un sistema concentrativo de nitrato. Consideremos, a modo de ejemplo, que el nitrato se concentra en la célula hasta alcanzar un valor 1 mM. Dado que en nuestros experimentos se han utilizado suspensiones conteniendo entre 1 y 2 μ l de células por ml y que el volumen intracelular puede representar sobre un 75% del volumen de células empaquetadas (Ihlenfeldt y Gibson, 1975), el nitrato concentrado en las células representaría una desaparición del medio de alrededor de 1 nmol de nitrato por ml, cantidad que se sitúa en el límite inferior de detección de este ión por los métodos analíticos disponibles. No hay contradicción, por lo tanto, entre

los hechos de que experimentalmente la desaparición apreciable de nitrato del medio exija metabolización del mismo y de que exista transporte concentrativo de nitrato.

Se desconoce por el momento el mecanismo de acoplamiento de energía metabólica al transporte de nitrato. El efecto negativo del DCCD sobre la utilización del nitrato indica la participación del ATP a algún nivel en dicho acoplamiento. Sin embargo, queda abierta la cuestión de si el ATP tiene un papel directo como sustrato de la permeasa del nitrato (que actuaría como una ATPasa), como se ha sugerido para distintas especies de algas (Falkowski, 1975), o si actúa como sustrato de una ATPasa translocadora de protones que generaría el gradiente electroquímico de protones necesario para acoplar la entrada de nitrato, en contra de gradiente, con una entrada de protones, a favor de gradiente, como se ha descrito en Lemna (Novacky et al., 1978). En el primer caso, la sensibilidad del proceso de utilización del nitrato en Anacystis al FCCP y al DCCD se debería a la inhibición por estos agentes de la síntesis de ATP; en el segundo caso, los inhibidores impedirían el consumo afectando tanto a la síntesis como, en sentido amplio, a la utilización del ATP. Un mecanismo de acoplamiento mediante cotransporte $\text{NO}_3^- - \text{H}^+$ no parece probable por la dependencia de pH del proceso de utilización del nitrato (véase Fig. 2), el cual se encuentra especialmente favorecido a valores altos de pH, es decir cuando la concentración de H^+ en el medio es menor. Se ha considerado la posibilidad de que el transporte de nitrato ocurriera acoplado al de otros cationes

diferentes a H^+ , tales como K^+ ó Na^+ , pero no se ha encontrado un requerimiento específico por ninguno de éstos para la utilización del nitrato (resultados no presentados).

Las consideraciones expuestas concernientes al transporte de nitrato son aplicables también al caso del nitrito, con la salvedad de que en la entrada de nitrito a la célula, además del transporte activo, hay una participación estimable de entrada pasiva, que probablemente tiene lugar como difusión de ácido nitroso. Una interpretación similar sobre la entrada de nitrito en las células se ha propuesto para Scenedesmus (Larsson y Andersson, 1981). La existencia de una entrada de ácido nitroso por difusión explicaría, además de la menor sensibilidad al FCCP y al DCCD del consumo de nitrito con respecto al de nitrato, el hecho de que las células de Anacystis presenten elevadas actividades de utilización de nitrito a los pH más ácidos ensayados, a los que apenas consumen nitrato. Esto redundaría, a su vez, en la idea de que en nuestras condiciones experimentales no se da una entrada pasiva de nitrato, al menos como difusión de ácido nítrico.

La segunda etapa considerada en la ruta de asimilación del nitrato es la reducción de éste hasta el término de amonio. El sistema reductor del nitrato en Anacystis nidulans se había caracterizado en detalle, a los niveles subcelular y enzimático, previamente a este trabajo (Manzano, 1977; Candau, 1979). Aquí se han tratado de aclarar las características del funcionamiento in vivo de este sistema en lo referente a su relación con la ge-

neración fotosintética de poder reductor. Mientras que el carácter fotosintético de la reducción del nitrito en organismos fototrofos es universalmente reconocido, el grado de la relación entre reducción del nitrato a nitrito y fotosíntesis constituye una cuestión controvertida, pudiendo haber notables diferencias entre diversos tipos de organismos.

En un organismo fototrofo estricto, como Anacystis, cualquier proceso metabólico que consuma energía depende en última instancia de la generación fotosintética de la misma. El cese inmediato de la utilización de nitrato en respuesta a la interrupción de la iluminación a una suspensión celular que se encuentra consumiendo este sustrato (apartado 3.1.3.1.) indica, sin embargo, la existencia in vivo de una íntima relación entre asimilación de nitrato y fotosíntesis. El también inmediato efecto inhibitor del DCMU sobre la utilización del nitrato en Anacystis (apartado 3.1.3.1.) indica, concretamente, una relación muy directa entre la reducción del nitrato y la generación fotosintética de poder reductor en este microorganismo.

La reducción de nitrato y de nitrito por células de Anacystis nidulans presenta un desprendimiento de oxígeno asociado (apartado 3.1.3.2.). Las estequiometrías encontradas de 2 moles de oxígeno desprendido por mol de nitrato reducido a amonio y 1,5 para el caso del nitrito, demuestran concluyentemente que el poder reductor utilizado in vivo para la reducción de nitrato a nitrito y de éste a amonio en células de Anacystis expuestas a la luz se origina en la fotólisis del agua, indicando el carácter

de reactivos de Hill naturales de ambos sustratos.

El hecho de que estas estequiometrías entre desprendimiento de oxígeno y reducción de nitrato o nitrito, observadas en células tratadas con MSX, se hayan encontrado tanto en condiciones de fijación fotosintética de CO_2 simultánea como en condiciones de utilización de nitrato y/o nitrito como únicos reactivos de Hill, y de que las velocidades de utilización de nitrato y nitrito en ambas situaciones (presencia o ausencia de CO_2) sean similares, indican la independencia de la reacción de reducción fotosintética del nitrato respecto a la reducción fotosintética del CO_2 . La utilización del nitrato, en ausencia completa de CO_2 , por células de A.nidulans tratadas con MSX representa un ejemplo simple de fotosíntesis in vivo con este sustrato como único reactivo de Hill. No parecen pues requerirse productos recientes de la fijación del CO_2 como intermediarios en el suministro de ATP y/o poder reductor para la utilización del nitrato en este microorganismo.

En la sección de Introducción se resumieron los datos que mantienen la controversia respecto a la relación entre reducción de nitrato y fotosíntesis en microorganismos fototrofos. Los resultados presentados en este trabajo, junto con los estudios previos (Manzano et al., 1976; Candau et al., 1976) cuya validez se confirma, permiten definir la reducción del nitrato en Anacystis nidulans como un proceso fotosintético. Existen datos indicando la naturaleza fotosintética de la reducción del nitrato también en Anabaena 7119 y Nostoc 6719 (Ortega et al.,

1976; Serrano et al., 1981). Parece pues razonable proponer la reducción del nitrato en cianobacterias como un proceso genuinamente fotosintético.

La utilización del nitrato es pues un proceso que en sus primeras etapas utiliza los dos componentes del Poder Asimilatorio generado fotosintéticamente: el ATP, que se requiere para el transporte del nutriente al interior de la célula, y el poder reductor, que participa en la reducción del nitrato hasta amonio. La naturaleza fotosintética de la utilización del nitrato en Anacystis nidulans viene así definida no sólo en base a la relación existente entre los procesos de reducción del nitrato y generación fotosintética de poder reductor, sino también por la dependencia del proceso por energía metabólica, que en un organismo como Anacystis se genera en las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

El amonio resultante de la reducción del nitrato se incorpora a esqueletos carbonados, en Anacystis nidulans, fundamentalmente mediante el concurso de la ruta glutamina sintetasa/ /glutamato sintasa (apartado 3.1.4.). El funcionamiento de la ruta requiere la fijación simultánea de CO_2 , que probablemente actúa suministrando los esqueletos carbonados en forma de α -ceto glutarato, y parece depender del aporte fotosintético de poder reductor, ya que se observa una notable inhibición por DCMU de la utilización de amonio por las células. La reacción que requiere poder reductor en esta ruta de asimilación de amonio es la catalizada por la glutamato sintasa, enzima que utiliza ferredo-

xina reducida como donador de electrones en numerosos organismos fototrofos, incluídas las cianobacterias en las que se ha estudiado esta cuestión (Lea y Miflin, 1975). Nuestros resultados abundan, por lo tanto, en la idea del caracter fotosintético, en organismos fototrofos, de la reacción catalizada por la glutamato sintasa (Lea y Miflin, 1979; Andersson, 1981).

Como se expuso en la sección de Introducción, la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa es la responsable de la asimilación del amonio en prácticamente todas las cianobacterias estudiadas. Sin embargo, en Anacystis nidulans estirpe UTCC 625, que es distinta a la que se ha utilizado en este trabajo, se ha descrito que la incorporación del amonio opera fundamentalmente mediante la glutamato deshidrogenasa, siendo el glutamato formado utilizado prioritariamente en la reacción de la glutamina sintetasa (Meeks et al., 1978). Es de interés, por lo tanto, contrastar los resultados que se han obtenido en este trabajo con esta última hipótesis sobre la ruta de incorporación del amonio. Hay dos hechos incompatibles con el funcionamiento del sistema glutamato deshidrogenasa/glutamina sintetasa para la asimilación de amonio en la estirpe de A.nidulans que se ha utilizado en este trabajo. Por un lado se encuentra la drástica inhibición del consumo de amonio causada por MSX y por azaserina (apartado 3.1.4.), lo que contrasta con lo observado para A.nidulans estirpe UTCC 625, donde el MSX a concentración 1 mM sólo provocaba un 30% de inhibición de la asimilación de amonio (Meeks et al., 1978). Por otra parte, si el amonio fuera asimilado median-

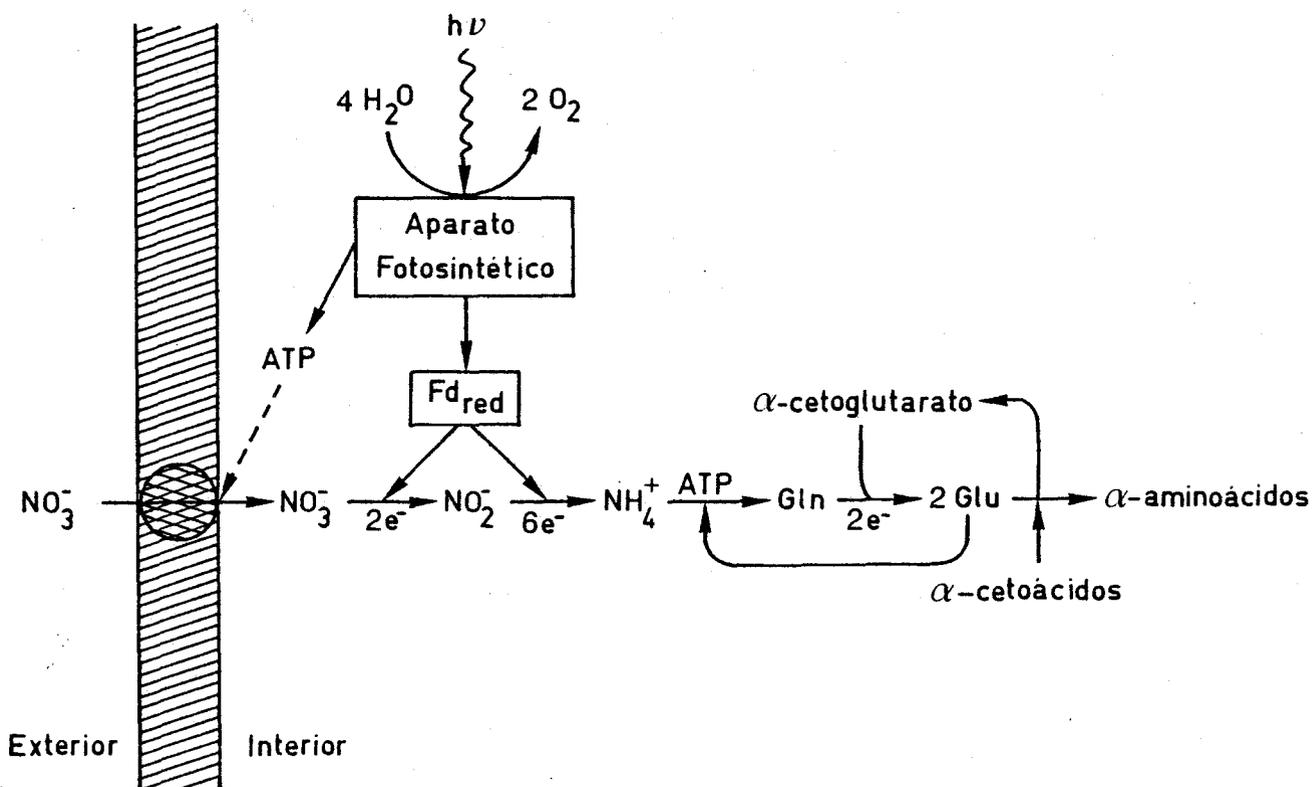
te glutamato deshidrogenasa/glutamina sintetasa, no se esperaría una disminución del contenido en glutamato de las células tratadas con azaserina e incubadas con amonio (véase Tabla 13), sino, más bien, una acumulación del propio glutamato y de glutamina.

Finalmente cabe resaltar el hecho de que la inhibición por MSX de la asimilación de amonio que se ha observado a lo largo de este trabajo, si bien tiene un carácter drástico (85-90% de inhibición), no es absoluta. Esto debe interpretarse en términos de la participación de otras rutas distintas a la de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa, de menor importancia cuantitativa que ésta, en la incorporación del amonio a esqueletos carbonados (Meeks et al., 1977).

En el Esquema 3 se presenta una visión de las primeras etapas de la ruta de asimilación del nitrato, que resume los resultados obtenidos en este trabajo e integra algunos antecedentes, resaltando la participación del poder asimilatorio generado fotosintéticamente en la entrada y reducción del nitrato.

En la segunda parte de este trabajo se ha presentado un estudio sobre la regulación de la utilización del nitrato en Anacystis nidulans.

El consumo de nitrato por células normales (cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno) de A.nidulans se puede alterar en respuesta a la disponibilidad de carbono y nitrógeno para las células. Así, la presencia de amonio en la suspensión celular a bajas concentraciones provoca, de forma asociada a su



Esquema 3. Características esenciales de los primeros estadios de la asimilación del nitrato en *Anacystis nidulans*. Se destacan el posible papel del ATP y de una permeasa en la entrada del nitrato a la célula, la naturaleza fotosintética del transporte de nitrato y de su reducción hasta el término de amonio, y el papel de la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa en la incorporación de este último a esqueletos carbonados.

consumo, una drástica inhibición de la utilización de nitrato, la cual, por otra parte, depende manifiestamente del suministro de CO_2 a la suspensión celular (apartados 3.2.1. y 3.2.2.). Los resultados presentados en este trabajo han permitido elaborar una interpretación que integra ambos fenómenos.

La base de dicha interpretación es la pérdida (o atenuación) de respuesta del consumo de nitrato tanto al amonio como al CO_2 , bien en células conteniendo la glutamina sintetasa inactivada por un tratamiento por MSX o bien en células deficientes en nitrógeno. Tanto las células tratadas con MSX como las células deficientes en nitrógeno presentan, además, una velocidad incrementada de consumo de nitrato, que no puede explicarse por cambios en el contenido celular de nitrato reductasa.

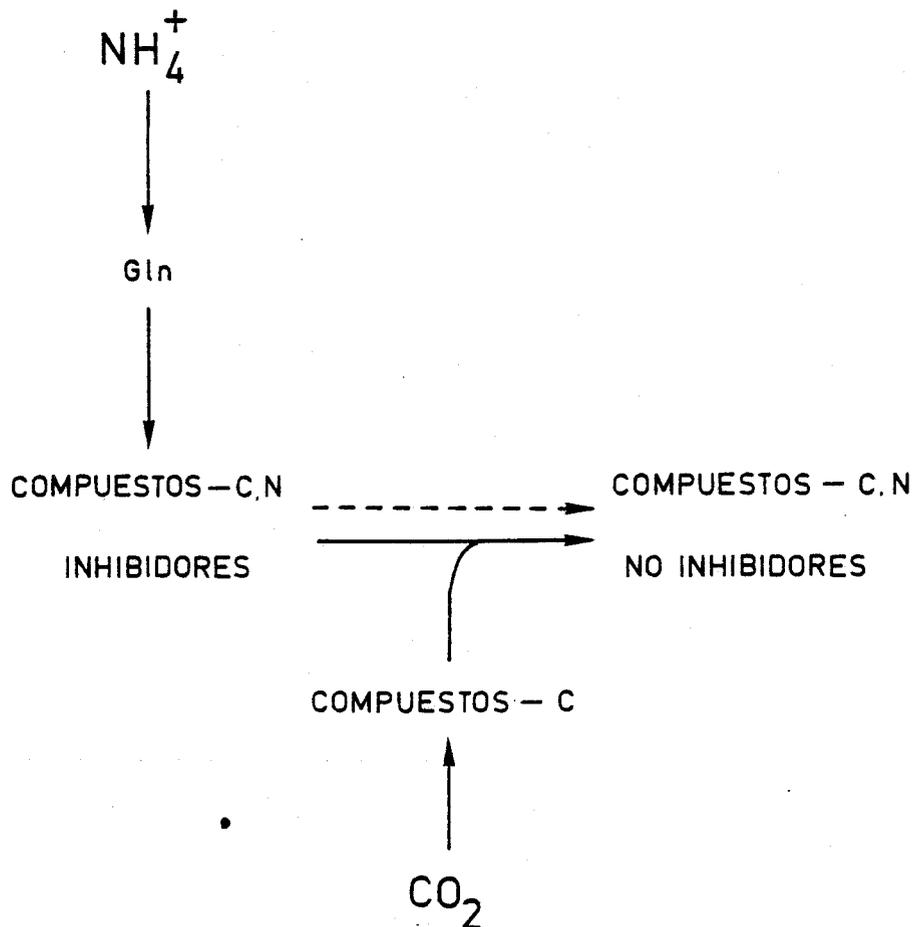
Se propone que la utilización del nitrato en Anacystis se encuentra sometida a regulación por metabolitos específicos resultantes de la asimilación del amonio que actúen como inhibidores. Al impedirse la formación de estos metabolitos por inactivación de la glutamina sintetasa, primera enzima de la ruta fundamental de asimilación del amonio en este microorganismo, se estimula el consumo de nitrato y se previene de los efectos negativos resultantes de la adición de amonio al medio.

El efecto positivo del CO_2 sobre el consumo de nitrato se debería al aporte de esqueletos carbonados que, al reaccionar con los productos de la asimilación del amonio con carácter inhibitor del consumo de nitrato, darían lugar a otros metabolitos orgánicos nitrogenados, sin carácter inhibitor de la utilización

del nitrato. No puede excluirse que, además, algún o algunos productos de la fijación del CO_2 desempeñen un papel de efectos positivos sobre el consumo de nitrato. La velocidad de utilización del nitrato podría así estar modulada conjuntamente por efectores negativos y por efectores positivos, y el CO_2 podría tener el papel doble de aportar efectores positivos y de contribuir a la eliminación de los inhibidores presentes en las células.

En las células deficientes en nitrógeno habría un exceso de metabolitos orgánicos no nitrogenados acumulados. Esto eliminaría el requerimiento por productos recientes de la fijación del CO_2 que presentan las células de Anacystis normales (no deficientes en N y no tratadas con MSX) para consumir nitrato. Tales metabolitos, de carácter no inhibidor, reaccionarían con los productos inhibidores resultantes de la asimilación de amonio, provocando una reducción en el nivel de estos últimos. Los metabolitos orgánicos acumulados en las células deficientes en N podrían actuar, además, como efectores positivos de la utilización del nitrato.

Esta propuesta sobre el papel del amonio y del CO_2 en la determinación de los niveles celulares de los efectores implicados en la regulación de la asimilación del nitrato en A.nidulans se resume en el Esquema 4. Se consideran dos hipótesis sobre la naturaleza de los efectores que regularían la utilización del nitrato. El sistema de regulación podría incluir efectores negativos (compuestos-C,N inhibidores) sólo o en combinación con efectores



Esquema 4. Papel del amonio y del anhídrido carbónico en el establecimiento de los niveles celulares de los metabolitos inhibidores del transporte de nitrato en *Anacystis nidulans*. Aunque no se señale en el esquema, no se excluyen las posibilidades de que el metabolito inhibidor sea la propia glutamina ni de que los productos de la fijación del CO_2 (compuestos-C) tengan un papel directo en la regulación como efectores positivos.

res positivos (compuestos-C). Una tercera hipótesis, que la utilización del nitrato esté regulada sólo por efectores positivos, aunque no se pueda descartar, no se encuentra favorecida por algunos de los resultados presentados en este trabajo. La adición de MSX a suspensiones de células incubadas con nitrato en ausencia de CO_2 resulta, tras un cierto período de tiempo, en un consumo de nitrato por las células (véase Fig. 38). En las condiciones del experimento citado (ausencia de CO_2) no debe tener lugar un aporte neto de efectores positivos al sistema.

La inhibición por amonio del consumo de nitrato es un fenómeno que se ha descrito en distintos tipos de microorganismos (véase Introducción). Es importante distinguir entre el efecto de regulación por bajas concentraciones de amonio, que se previene por el tratamiento de las células con MSX (apartado 3.2.1), del efecto más general de inhibición del metabolismo fotosintético que causa el amoníaco cuando se encuentra presente a elevadas concentraciones en el medio (apartado 3.3.) y que afecta a la capacidad de consumo de nitrato incluso en células tratadas con MSX.

Excluída la posibilidad de que sea el amonio per se el causante directo del efecto regulador, existen en la literatura varias propuestas, alternativas a la que se ha presentado aquí, para explicar el efecto inhibitor por bajas concentraciones de amonio de la asimilación del nitrógeno, no sólo en forma de nitrato.

La inhibición por amonio del consumo de nitrato podría resultar de una interferencia entre el transporte de amonio y el de nitrato, procesos que podrían competir por algún elemento común a los dos sistemas de transporte o por una fuente de energía cuya disponibilidad fuera limitante. En levaduras se ha propuesto un mecanismo de este tipo para la inhibición mutua entre los sistemas de transporte de amonio y L-aminoácidos (Roon et al., 1977). Por otra parte, en Azotobacter vinelandii se ha propuesto que el efecto inhibidor del amonio sobre la fijación de nitrógeno este causado, en última instancia, por una modificación del estado de energía de la membrana, causada por el transporte de amonio (Laane et al., 1980). Esta hipótesis de que la inhibición por amonio del consumo de nitrato en A.nidulans resulte de una competencia por algún elemento común a los sistemas de transporte de los dos nutrientes, no parece que pueda explicar todos los hechos observados que se han presentado en este trabajo (apartado 3.2.1.). Así, mientras que en las células tratadas con MSX o con azaserina el amonio apenas se consume y no ejerce su efecto inhibidor sobre el consumo de nitrato, en las células tratadas con aminooxiacetato no desaparece la inhibición por amonio mientras que éste se consume al mismo bajo nivel que en las células tratadas con MSX o con azaserina. Por lo tanto, el principal responsable de la inhibición por amonio del consumo de nitrato no parece ser un efecto de competencia a nivel de transporte, aunque no pueda excluirse totalmente la posibilidad de que pueda contribuir a la citada inhibición.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el consumo de amonio que resulta en la inhibición de la utilización del nitrato se encuentra acompañado, de hecho, por la metabolización del amonio. Como la incorporación del amonio a través de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa es un proceso que consume ATP, Ohmori et al. (1977) han propuesto que la asimilación del amonio a través de esta ruta podría reducir la disponibilidad de ATP para el transporte activo de nitrato en Anabaena cylindrica. Sin embargo, los resultados de Ohmori y Hattori (1978) no apoyan esta proposición, ya que estos autores observaron que tras la adición de amonio a las células de Anabaena sólo tenía lugar un cambio transitorio en el contenido celular de ATP, recuperándose rápidamente los niveles normales de este metabolito, especialmente en la luz, aún cuando todavía se encontrarán presentes en el medio concentraciones de amonio inhibitoras. Un hecho destacable es que el cambio transitorio en el nivel celular de ATP podría corresponderse con la abrupta incorporación de amonio que tiene lugar inmediatamente después de su adición a la suspensión celular, y que se traduce en síntesis de glutamina a partir de glutamato catalizada por la glutamina sintetasa (véanse Figs. 28 y 46). De hecho, el cambio transitorio en el contenido de ATP tras la adición de amonio no se observaba en células de Anabaena cylindrica tratadas con MSX (Ohmori y Hattori, 1978). La adición de amonio a suspensiones de Anabaena asimilando dinitrógeno causa unos cambios similares en los niveles celulares de glutamato y glutamina (Rowell et al., 1977).

El efecto negativo del amonio sobre la asimilación de nitrato o de dinitrógeno también se ha interpretado en otras ocasiones de forma análoga a la propuesta en este trabajo. La sugerencia de un compuesto orgánico nitrogenado como mediador del amonio en la inhibición de la utilización del nitrato se sugirió para Chlorella en base a la ausencia de efecto del amonio sobre el consumo de nitrato en células deficientes en carbono, que eran incapaces de asimilar el amonio (Syrett y Morris, 1963). La incorporación del amonio en componentes celulares nitrogenados también se piensa que se encuentre implicada en la inhibición por amonio de la fijación del dinitrógeno en bacterias fotosintéticas (Zumft y Castillo, 1978; Jones y Monty, 1979).

El requerimiento por anhídrido carbónico del consumo de nitrato, cuyos antecedentes se recogen en la sección de Introducción, no se ha interpretado anteriormente en los términos, en los que se hace en este trabajo, de participación de productos de la fijación del CO_2 en la regulación del consumo de nitrato. A esto puede haber contribuido el hecho de que, posiblemente, el CO_2 tenga varios efectos simultáneos sobre el consumo de nitrato en eucariotas fotosintéticos, siendo muy probable que algunos productos de su fijación jueguen un papel de intermediarios en el suministro de ATP y poder reductor para la asimilación del nitrato en este tipo de organismos (Beevers y Hageman, 1981).

La propuesta para el mecanismo de regulación de la asimilación del nitrato en A.nidulans que se ofrece en este trabajo, y que ya se ha expuesto en detalle, integra el efecto de di-

versas alteraciones de las condiciones ambientales (adición de amonio, suministro de CO_2) con la autorregulación del consumo de nitrato. En definitiva, se trata de un sistema de regulación que modula la utilización del nitrato para mantener un balance C/N adecuado en la célula. Dos cuestiones fundamentales a discutir son: cuál de las etapas del proceso de utilización del nitrato es el blanco del sistema de regulación y qué metabolitos celulares constituyen dicho sistema.

En el apartado 3.2.1.3. se expusieron, por una parte, resultados de medidas directas de nitrato reductasa que parecen excluir una inactivación de esta enzima como responsable de la inhibición por bajas concentraciones de amonio del consumo de nitrato y, por otra parte, resultados que sugerían que el paso de transporte del nitrato al interior de la célula es el blanco de los efectores que integran el sistema de regulación. El transporte de nitrato como la etapa de la asimilación de este nutriente sometida a inhibición por amonio también se ha propuesto para diatomeas (Serra et al., 1978b; Cresswell y Syrett, 1979). Dos tipos de pruebas apuntaban esta posibilidad del transporte de nitrato como el proceso sujeto a regulación en Anacystis. Por un lado, el efecto del pH del medio sobre el consumo de nitrato era radicalmente distinto en células de Anacystis tratadas y no tratadas con MSX. Esto indica que, de alguna forma, la desregulación de las células (en lo referente a la asimilación del nitrato) causada por la inactivación de la glutamina sintetasa por MSX tenía un efecto drástico sobre algún factor

celular (implicado en la ruta de utilización del nitrato) relacionado directamente con el medio externo, como debe ser el caso de la permeasa del nitrato. Por otro lado, en la utilización del nitrito parecía existir un componente sometido y otro no sometido a regulación, pudiendo establecerse un paralelismo entre la fracción del consumo de nitrito sometida a regulación y la fracción de transporte activo de nitrito.

Al resaltar los datos de regulación del transporte activo de nitrito en la discusión acerca del blanco del sistema de regulación de la utilización del nitrato, se asume que el sistema de regulación puede tener un carácter más general de regulación de la asimilación de nitrógeno, incluyendo entre sus efectos no sólo la modulación del transporte de nitrato sino también la del transporte de nitrito. Una posibilidad alternativa es que la permeasa del nitrito sea la misma que la del nitrato. La existencia de un elemento común para el transporte de nitrato y nitrito en Anacystis se ha demostrado en este trabajo (apartado 3.1.2.4.).

La sugerencia de que la regulación de la utilización del nitrito opera a nivel de su entrada en la célula mediante el sistema de transporte activo se basa, en resumen, en el hecho de que a medida que aumenta la fracción de nitrito que entra en la célula mediante transporte activo, en respuesta al incremento del pH del medio, aumenta el efecto negativo del amonio sobre el consumo de nitrito (apartado 3.2.1.3.) y la dependencia por CO_2 del mismo (apartado 3.2.2.4.).

Por el momento se desconoce la naturaleza de los efectores que integran el sistema de regulación del transporte de nitrato. La posibilidad de que la glutamina juegue un papel clave en la regulación de la asimilación del nitrógeno en diversos microorganismos se ha señalado en diversas ocasiones (algunos ejemplos son: Thomas et al., 1977; Zumft y Castillo, 1978; Jones y Monty, 1979; Premakumar et al., 1979; Rigano et al., 1980; Wood y Haselkorn, 1980). En este sentido resultaron muy sugerentes las observaciones de que la adición de amonio a una suspensión celular consumiendo nitrato resultara en una inmediata acumulación de glutamina en las células (véase Fig. 46), acumulación que no tenía lugar en células tratadas con MSX (véase Tabla 25). En las descripciones existentes en la literatura no se ha distinguido, sin embargo, entre las posibilidades de que la glutamina tenga un efecto per se como agente inhibidor o que tenga que metabolizarse para dar lugar a los efectores negativos. El comportamiento de las células de Anacystis tratadas con azaserina es reseñable a este respecto. Estas células presentan altas velocidades de consumo de nitrato, en presencia de amonio, a pesar de contener altos niveles de glutamina (apartados 3.2.1.2. y 3.2.4.1.). Así, parece claro que la inhibición del consumo de nitrato no puede resultar sencillamente de una acumulación de glutamina en las células.

La glutamina todavía podría tener, sin embargo, un papel directo en la regulación, en un sistema que incluyera, además de la glutamina, otros efectores. El efecto de la azaserina

podría explicarse para un sistema combinado de efectores negativos y positivos en términos de la acumulación, en las células tratadas con azaserina, de efectores positivos (un ejemplo podría ser el α -cetoglutarato) que contrarrestasen el efecto negativo de la glutamina.

Los efectos de los inhibidores de la asimilación del amonio azaserina y aminooxiacetato pueden dar información sobre la naturaleza de los productos derivados de la glutamina que, alternativamente, actuarían como efectores negativos del transporte de nitrato. Mientras que la azaserina libera al consumo de nitrato del control a que en condiciones normales se encuentra sometido, el aminooxiacetato no lo hace e incluso provoca inhibición de la utilización del nitrato en ausencia de amonio añadido. La azaserina es un inhibidor de las glutamina-amido transferasas, mientras que el aminooxiacetato lo es de las transaminasas. Parece pues que en la generación de los efectores negativos del sistema de regulación puede tener un papel importante la donación del grupo amido de la glutamina.

Un metabolito que sea constituyente del sistema de regulación del transporte de nitrato, debe cumplir dos requisitos: que tenga capacidad de afectar al consumo de nitrato (inhibiéndo lo o estimulándolo, según se trate de efectores negativos o positivos) y que sus niveles celulares respondan adecuadamente a cambios en las condiciones a que se sometan las células que provoquen una modificación de su capacidad de utilización del nitrato (por ejemplo, acumulación de efectores negativos en situacio-

nes fisiológicas determinantes de inhibición del consumo de nitrato). Estas consideraciones dan pie a la propuesta de dos tipos de acercamientos experimentales para la investigación de la identidad de los metabolitos que integren el sistema de regulación del transporte de nitrato.

El primero consistiría en el estudio del efecto de diversos metabolitos sobre el consumo de nitrato. Los resultados obtenidos en los primeros experimentos llevados a cabo dentro de este acercamiento, que han incluido la investigación del efecto de varios aminoácidos, se han presentado en el apartado 3.2.4, aunque por el momento no hayan revelado la identidad de ningún probable regulador de la asimilación del nitrato.

El otro acercamiento experimental que se propone para la identificación de posibles reguladores del transporte de nitrato en Anacystis consistiría en el estudio de los niveles celulares de diversos metabolitos en distintas situaciones fisiológicas de relevancia en cuanto a la regulación de la asimilación del nitrato. En este trabajo se han descrito situaciones fisiológicas para las células de Anacystis que pueden ser útiles en este tipo de estudios. Un ejemplo son las células sometidas a ayuno de nitrógeno, que tienen alterada la capacidad de regulación de la utilización del nitrato (apartado 3.2.3.). Una comparación de los niveles de distintos metabolitos en estas células con los niveles de los mismos en células normales, podría ser muy informativa en cuanto a la naturaleza de los posibles efectos que integran el sistema de regulación del transporte de nitrato en A. nidulans.

5.- CONCLUSIONES

- 1.- En Anacystis nidulans la entrada de nitrato al interior de la célula parece estar mediada por un sistema de transporte activo. Un sistema similar parece estar también implicado en la entrada de nitrito.

- 2.- La reducción de nitrato a amonio en A.nidulans es un proceso que in vivo utiliza directamente poder reductor generado en la fotólisis del agua.

- 3.- En la estirpe de A.nidulans estudiada en este trabajo, el amonio se incorpora a esqueletos carbonados a través de la ruta de asimilación glutamina sintetasa-glutamato sintasa.

- 4.- El amonio es un eficaz antagonista de la utilización del nitrato en A.nidulans. La inhibición por amonio del consumo de nitrato se encuentra mediada por productos de la asimilación del amonio, que parecen actuar inhibiendo el transporte de nitrato al interior de la célula.

- 5.- La utilización del nitrato en A.nidulans depende manifiestamente del suministro de anhídrido carbónico a las células. El CO_2 parece ejercer su efecto sobre el consumo de nitrato a través de productos de su fijación fotosintética, los que actuarían como antagonistas de los productos de la asimilación del amonio con carácter inhibitor de la utilización de nitrato.

6.- La asimilación de nitrato en A.nidulans parece pues estar controlada por un sistema integrado de regulación que modula el transporte de nitrato en función del balance C/N de la célula.

6.- BIBLIOGRAFIA

Allen MM, Smith AJ (1969) Arch Mikrobiol 69:114-120.

Anderson JW (1981) En "The biochemistry of plants" (ed Stumpf PK, Conn EE), Vol 8, pp. 473-500. Academic Press, New York.

Arnon DI (1971) Proc Nat Acad Sci USA 68:2883-2892.

Arnon DI, McSwain BD, Tsujimoto HY, Wada K (1974) Biochim Biophys Acta 375:231-245.

Bailey JL (1976) "Techniques in protein chemistry", 2^a ed, p. 340. Elsevier, Amsterdam.

Bassham JA (1971) Proc Nat Acad Sci USA 68:2877-2882.

Beevers L, Hageman RH (1981) En "The biochemistry of plants" (ed Stumpf PK, Conn EE), Vol 5, pp. 115-168. Academic Press, New York.

Bergmeyer HU (1974) "Methoden der enzymatischen Analyse", 2^a ed. Verlag Chemie, Weinheim.

Betlach MR, Tiedje JM, Firestone RB (1981) Arch Microbiol 129:135-140.

Biggins J (1969) J Bacteriol 99:570-575.

Bongers LHJ (1958) Neth H Agric Sci 6:79-88.

Brock TD (1973) En "The biology of blue-green algae" (ed Carr NG, Whitton BA), pp. 487-500. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Butz RG, Jackson WA (1977) *Phytochem* 16:409-417.
- Calero F, Ullrich WR, Aparicio PJ (1980) En "The blue light syndrome" (ed Senger H), pp. 411-421. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Candau P (1979) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Candau P, Manzano C, Losada M (1976) *Nature* 262:715-717.
- Candau P, Manzano C, Guerrero MG, Losada M (1980) *Photobiochem Photobiophys* 1:167-174.
- Cawse PA (1967) *Analyst* 92:311-315.
- Chua N-H (1971) *Biochim Biophys Acta* 245:277-287.
- Clendenning KA, Ehrmantraut HC (1950) *Arch Biochem Biophys* 29:387-403.
- Coleman JR, Colman B (1981) *Plant Physiol* 67:917-921.
- Colman B, Chemg KH, Ingle RK (1976) *Plant Sci Lett* 6:123-127.
- Cramer M, Myers J (1949) *J Gen Physiol* 32:93-102.
- Cresswell RC, Syrett PJ (1979) *Plant Sci Lett* 14:321-325.
- Cresswell RC, Syrett PJ (1981) *J Exp Bot* 126:19-25.
- Davis EA (1953) *Plant Physiol* 28:539-544.
- Döhler G (1976) *Planta* 131:129-133.

- Eisele R, Ullrich WR (1977) *Plant Physiol* 59:18-21.
- Eppley RW, Coatsworth JL (1968) *J Phycol* 4:151-156.
- Eppley RW, Rogers JN (1970) *J Phycol* 6:344-351.
- Falkner G, Horner F, Werdan K, Heldt HW (1976) *Plant Physiol* 58:717-718.
- Falkowski PG (1975) *Limnol Oceanogr* 20:412-417.
- Flores E (1981) EMBO Workshop sobre "Gene Cloning and Molecular Biology in Cyanobacteria", Orsay.
- Flores E, Guerrero MG (1979a) VIII Congreso de la SEB, Murcia. Abstracts, 35.
- Flores E, Guerrero MG (1979b) VIII Congreso de la SEB, Murcia. Abstracts, 37.
- Flores E, Guerrero MG (1980) II Congreso de la FESPP, Santiago de Compostela. Abstracts, 99.
- Flores E, Guerrero MG, Losada M (1978a) XVII Reunión de la SEB, Madrid. Abstracts, 108.
- Flores E, Manzano C, Candau P, Guerrero MG (1978b) III Reunión de la SEFV, Granada. Abstracts, 66.
- Flores E, Guerrero MG, Losada M (1980) *Arch Microbiol* 128:137-144.

Flores E, Romero JM, Guerrero MG (1981) II Congreso de la FESBE, Madrid. Abstracts, 147.

Flores E, Herrero A, Guerrero MG (1982a) Arch Microbiol 131:91-94.

Flores E, Guerrero MG, Losada M (1982b) Enviado para su publicación a Biochim Biophys Acta.

Fogg GE (1975) "Algal cultures and phytoplankton ecology", 2^a ed. The University of Wisconsin Press, Madison.

Gibson J (1981) Arch Microbiol 130:175-179.

Good NE (1977) En "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (ed Trebst A, Avron M), Vol. 5, pp. 429-436. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Grant BR, Turner IM (1969) Comp Biochem Physiol 29:995-1004.

Guarino LA, Cohen SS (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76:3184-3188.

Guerrero MG, Flores E (1980) 5^o Congreso Internacional sobre Fotosíntesis, Halkidiki. Abstracts, 235.

Guerrero MG, Manzano C, Losada M (1974a) Plant Sci Lett 3:273-278.

Guerrero MG, Manzano C, Cárdenas J, Losada M (1974b) "Manometría" Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.

- Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) *Ann Rev Plant Physiol* 32: 169-204.
- Harold FN, Baarda JR, Baron C, Abrams A (1969) *J Biol Chem* 244: 2261-2268.
- Hattori A (1962) *Plant Cell Physiol* 3:355-369.
- Hattori A, Uesugi I (1968) *Plant Cell Physiol* 9:689-699.
- Hauska G (1977) En "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (ed Trebst A, Avron M), Vol. 5, pp. 253-265. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hayashi S, Lin ECC (1965) *Biochim Biophys Acta* 94:479-487.
- Herrero A, Flores E, Guerrero MG (1981a) *J Bacteriol* 145:175-180.
- Herrero A, Flores E, Guerrero MG (1981b) II Congreso de la FESBE, Madrid. Abstracts, 491.
- Hofmann A (1972) *Planta* 102:72-84.
- Ihlenfeldt MJA, Gibson J (1975) *Arch Microbiol* 102:13-21.
- Jansz ER, MacLean FI (1973) *Can J Microbiol* 19:497-504.
- Jones BL, Monty KJ (1979) *J Bacteriol* 139:1007-1013.
- Kallas T, Castenholz RW (1982) *J Bacteriol* 149:229-236.
- Kessler E (1955) *Nature* 176:1069-1070.

- Kessler E, Zumft WG (1973) *Planta* 111:41-46.
- Kleiner D (1981) *Biochim Biophys Acta* 639:41-52.
- Kratz WA, Myers J (1955) *Amer J Bot* 42:282-287.
- Kulandaivelu G, Spiller H, Böger P (1976) *Plant Sci Lett* 7: 225-231.
- Laane C, Krone W, Konings W, Haaker H, Veeger C (1980) *Eur J Biochem* 103:39-46.
- Ladha JK, Rowell P, Stewart WDP (1978) *Biochem Biophys Res Commun* 83:688-696.
- Larsson C-M (1980) *Physiol Plant* 48:326-332.
- Larsson C.M, Andersson M (1981) En "Proceedings of the 5th International Congress on Photosynthesis". International Science Services, Jerusalem.
- Lea PJ, Mifflin BJ (1975) *Biochem Soc Trans* 3:381-384.
- Lea PJ, Mifflin BJ (1979) En "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (ed Gibbs M, Latzko E) Vol. 6, pp.445-456. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Lieth H, Whittaker RH (1975) "Primary productivity of the Biosphere". Springer-Verlag, Berlin.
- Losada M (1972) *Discurso de Ingreso, Real Academia de Ciencias, Madrid.*

Losada M, Guerrero MG (1979) En "Topics in Photosynthesis" (ed Barber J), Vol. 3, pp. 365-408. Elsevier, Amsterdam.

Losada M, Guerrero MG, Vega JM (1981) En "Biology of inorganic nitrogen and sulfur" (ed Bothe H, Trebst A), pp. 30-63. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Mackinney G (1941) J Biol Chem 140:315-322.

Manzano C (1977) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Manzano C, Candau P, Gómez-Moreno C, Relimpio AM, Losada M (1976) Mol Cell Biochem 10:161-169.

Manzano C, Candau P, Guerrero MG (1978) Anal Biochem 90:408-412.

Meeks JC, Wolk CP, Thomas J, Lockau W, Shaffer PW, Austin SM, Chien W-S, Galonsky A (1977) J Biol Chem 252:7894-7900.

Meeks JC, Wolk CP, Lockau W, Schilling N, Shaffer PW, Chien W-S (1978) J Bacteriol 134:125-130.

Méndez JM, Vega JM (1981) Physiol Plant 52:7-14.

Méndez JM, Herrero A, Vega JM (1981) Z Pflanzenphysiol 103:305-315.

Miller AG, Colman B (1980) Plant Physiol 65:397-402.

Novacky A, Fischer E, Ullrich-Eberius CI, Lüttge U, Ullrich WR (1978) FEBS Lett 88:264-267.

- Ohmori M, Hattori A (1978) Arch Microbiol 117:17-20.
- Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H (1977) Arch Microbiol 114:225-229.
- Ortega T, Castillo F, Cárdenas J (1976) Biochem Biophys Res Commun 71:885-891.
- Padan E, Zilberstein D, Rottenberg H (1976) Eur J Biochem 63:533-541.
- Paschinger H (1977) Arch Microbiol 113:285-291.
- Pelroy RA, Bassham JA (1972) Arch Mikrobiol 86:25-38.
- Pelroy RA, Rippka R, Stanier RY (1972) Arch Mikrobiol 87:303-322.
- Peschek GA (1979) FEBS Lett 106:34-38.
- Pistorius EK, Voss H (1980) Biochim Biophys Acta 611:227-240.
- Pistorius EK, Gewitz H-S, Voss H, Vennesland B (1976) Planta 128:73-80.
- Pistorius EK, Funkhouser EA, Voss H (1978) Planta 141:279-282.
- Pistorius EK, Jetschmann K, Voss H, Vennesland B (1979) Biochim Biophys Acta 585:630-642.
- Premakumar R, Sorger GJ, Gooden D (1979) J Bacteriol 137:1119-1126.

- Ramos JL, Flores E, Guerrero MG (1980) II Congreso de la FESPP, Santiago de Compostela. Abstracts, 226.
- Relimpio AM, Vega JM, Guerrero MG, Losada M (1977) "Potenciometría y bioenergética". Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Sevilla.
- Rigano C, di Martino Rigano V, Fuggi A, Vona V (1980) II Congreso de la FESPP, Santiago de Compostela. Abstracts, 235.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) J Gen Microbiol 111:1-61.
- Rognstad R, Clark DG (1974) Arch Biochem Biophys 161:638-646.
- Ronzio RA, Rowe WB, Meister A (1969) Biochemistry 8:1066-1075.
- Roon RJ, Levy JS, Larimore F (1977) J Biol Chem 252:3599-3604.
- Rowell P, Enticott S, Stewart WDP (1977) New Phytol 79:41-54.
- Saha S, Ouitrakul R, Izawa S, Good NE (1971) J Biol Chem 246:3204-3209.
- Schloemer RH, Garrett RH (1974) J Bacteriol 118:259-269.
- Serra JL, Llama MJ, Cadenas E (1978a) Plant Physiol 62:987-990.
- Serra JL, Llama MJ, Cadenas E (1978b) Plant Physiol 62:991-994.
- Serrano A, Rivas J, Losada M (1981) Photosynthesis Res 2: 175-184.

- Shapiro BM, Stadtman ER (1970) *Methods Enzymol* XVII a:910-922.
- Smith AJ, London J, Stanier RY (1967) *J Bacteriol* 94:972-983.
- Snell FD, Snell CT (1949) En "Colorimetric methods of analysis", Vol. 3, pp. 804-805. Van Nostrand, New York.
- Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977) *Ann Rev Microbiol* 31:225-274.
- Stevens SE, Van Baalen C (1973) *Plant Physiol* 51:350-356.
- Stewart WDP (1980) *Ann Rev Microbiol* 34:497-536.
- Stewart WDP, Rowell P (1975) *Biochem Biophys Res Commun* 65:846-856.
- Syrett PJ, Leftley JW (1976) En "Perspectives in experimental biology" (ed Sunderland N), Vol. 2, pp. 221-234. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Syrett PJ, Morris I (1963) *Biochim Biophys Acta* 67:566-575.
- Tempest DW, Meers JL, Brown CM (1970) *Biochem J* 117:405-407.
- Thacker A, Syrett PJ (1972) *New Phytol* 71:423-433.
- Thayer JR, Huffaker RC (1982) *J Bacteriol* 149:198-202.
- Thomas J, Meeks JC, Wolk CP, Shaffer PW, Austin SM, Chien W-S (1977) *J Bacteriol* 129:1545-1555.
- Tischner R, Lorenzen H (1979) *Planta* 146:287-292.

Tyler B (1978) *Ann Rev Biochem* 47:1127-1162.

Ullrich WR (1974) *Planta* 116:143-152.

Ullrich WR (1982) En "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (ed Läuchli A, Bielaske E), Vol. 12. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. En prensa.

Ullrich-Eberius CI (1973) *Planta* 115:25-36.

Van Niel CB, Allen MB, Wright BE (1953) *Biochim Biophys Acta* 12:67-74.

Vennesland B, Guerrero MG (1979) En "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series" (ed Gibbs M, Latzko E), Vol. 6, pp. 425-444. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Warburg O (1964) *Ann Rev Biochem* 33:1-14.

Warburg O, Negelein E (1920) *Biochem Z* 110:66-115.

Warburg O, Krippahl G, Jetschmann C (1965) *Z Naturforsch* 20:993-996.

Weathers PJ, Chee HL, Allen MM (1978) *Arch Microbiol* 118:1-6.

Whittenbury R (1978) En "Essays in Microbiology" (ed Norris JR, Richmond MH), Cap. 16. John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto.

Wolk CP (1973) *Bacteriol Rev* 37:32-101.

- Wolk CP (1981) En "The biochemistry of plants" (ed Stumpf PK, Conn EE), Vol. 1, pp. 659-686. Academic Press, New York.
- Wolk CP, Thomas J, Shaffer PW, Austin SM, Galonsky A (1976) J Biol Chem 251:5027-5034.
- Wood NB, Haselkorn R (1980) J Bacteriol 141:1375-1385.
- Zevenboom W, Mur LR (1979) FEMS Microbiol Lett 6:209-212.
- Zevenboom W, de Groot GJ, Mur LR (1980) Arch Microbiol 125:59-65.
- Zdrou I, Tromballe HW (1981) Arch Microbiol 129:325-330.
- Zumft WG, Castillo F (1978) Arch Microbiol 117:53-60.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FAACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Enrique Flores Garcia

titulada "Utilización de antibióticos por la erianofac-
teria *Arthrospira medularis*. Producción y regula-
ción".

acordó otorgarle la calificación de

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Sevilla, 8 de Junio

1982

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

[Signature]

B. Valde

[Signature]

El Presidente,

[Signature]

[Signature]

Enrique Flores



500292853

DOI 10.1007

292853