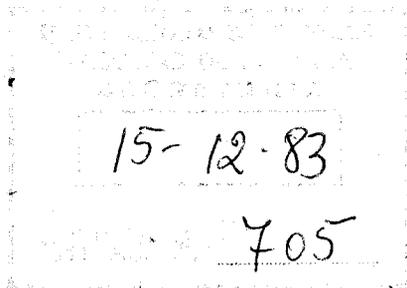


R.4430



TRANSPORTE Y ASIMILACION DE NITRATO EN LA  
BACTERIA AEROBIA *Azotobacter chroococcum*



Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Licenciada María Elisa Revilla Torres.

Elisa Revilla

Sevilla, Diciembre de 1.983

DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Antonio Paneque Guerrero".

Dr. Antonio Paneque Guerrero  
Profesor de Investigación  
del C.S.I.C.

PONENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Manuel Losada Villasante".

Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica

T.D. V36

A mis padres

A mi tío Paco

El trabajo aquí presentado 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 D. Manuel Losada Villasante, a quien agradezco el haberme acogido en su grupo de investigación.

Al profesor D. Antonio Paneque Guerrero, agradezco profundamente su constante interés y dedicación en mi formación científica y humana y, muy especialmente, su comprensión y optimismo en los malos momentos.

Al Dr. Angel María Relimpio, quiero agradecerle su colaboración en la realización de este trabajo.

Deseo expresar un especial agradecimiento al Dr. Antonio Llobell González por su inestimable ayuda, estímulo y amistad, así como por su aportación de ideas y la labor crítica en este trabajo.

A José Moreno quiero agradecer su gran ayuda e interés por mi trabajo, así como su inapreciable amistad.

Quiero agradecer su amistad y colaboración a mis compañeros, Juan Luis, J. Cejudo, Angel, Rufino, Toño, Pepa, J. Caballero, Pedro, Paco y J. Florencio.

A los demás miembros del Departamento, así como a las personas que desde fuera de él han compartido conmigo estos años, agradezco la ayuda y apoyo que en todo momento me han ofrecido.

## INDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS .....	1
I. INTRODUCCION .....	4
II. MATERIALES Y METODOS .....	24
II.A. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	25
II.A.1. Material biológico .....	25
II.A.2. Condiciones estándar de cultivo .....	25
II.A.3. Modificaciones del medio estándar .....	26
II.A.4. Establecimiento de hambre de nitrógeno ....	26
II.A.5. Mantenimiento del organismo y preparación de inóculos .....	27
II.B. RECOGIDA DE CELULAS .....	28
II.B.1. Ensayo del sistema de consumo de nitrato .	28
II.C. ESTIMACION DE LOS NIVELES ENZIMATICOS .....	29
II.C.1. Permeabilización con tolueno .....	29
II.C.2. Permeabilización con M.T.A.B. ....	30
II.D. ENSAYOS ENZIMATICOS .....	30
II.D.1. Ensayo de la actividad nitrato reductasa .	30
II.D.2. Ensayo de la actividad nitrito reductasa .	31
II.D.3. Ensayo de la actividad glutamina sinteta- sa .....	32
II.D.4. Ensayo de la actividad nitrogenasa .....	33
II.E. METODOS ANALITICOS .....	34
II.E.1. Determinación de nitrato .....	34

II.E.2. Determinación de nitrito .....	35
II.E.3. Determinación de $\gamma$ -glutamyl-hidroxamato .	35
II.E.4. Determinación de amonio .....	36
II.E.5. Determinación de etileno .....	37
II.E.6. Determinación del consumo de oxígeno ....	37
II.E.7. Determinación de proteína .....	37
II.F. TECNICAS EXPERIMENTALES .....	38
II.F.1. Centrifugaciones .....	38
II.F.2. Determinaciones espectrofotométricas ....	38
II.F.3. Medidas de pH .....	38
II.F.4. Establecimiento de condiciones anaerobias	38
REACTIVOS .....	40
III. RESULTADOS .....	41
III.A. UTILIZACION DE NITRATO POR CELULAS DE <i>A. chroococum</i> .....	42
III.A.1. Dependencia del consumo de nitrato de la fuente de nitrógeno .....	45
III.A.2. Caracterización de la utilización de nitrato por <i>A. chroococum</i> .....	50
III.A.2.1. Efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre su consumo por <i>A. chroococum</i> ...	50
III.A.2.2. Requerimiento de una fuente de carbono y aerobiosis para la utilización de nitrato por <i>A. chroococum</i> .....	54
III.A.2.3. Requerimiento de energía metabólica para la utilización de nitrato por <i>A. chroococum</i> ...	60

III.A.2.4.	Efecto de un sistema artificial donador de electrones sobre el consumo de nitrato por <i>A. chroococcum</i> .....	65
III.A.2.5.	Efecto del pH sobre el consumo de nitrato por <i>A. chroococcum</i> .	68
III.B.	REGULACION DE LA UTILIZACION DE NITRATO POR <i>A. chroococcum</i> .....	71
III.B.1.	Efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato por <i>A. chroococcum</i> .....	71
III.B.2.	Efecto de inhibidores de la asimilación de amonio sobre el consumo de nitrato y sobre su inhibición por amonio .....	74
III.B.2.1.	Efecto del par ascorbato/PMS sobre la asimilación de amonio por <i>A. chroococcum</i> . Inactivación de la GS.....	89
III.B.3.	Efecto de análogos del nitrato sobre el consumo de nitrato por <i>A. chroococcum</i> ..	93
III.B.4.	Efecto de azida y cianuro sobre el consumo de nitrato por <i>A. chroococcum</i> .....	98
III.B.5.	Efecto de diversos aminoácidos sobre el consumo de nitrato .....	100
III.C.	INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN <i>A. chroococcum</i> .....	103
III.C.1.	Regulación de la síntesis de nitrato reductasa .....	104
III.C.1.1.	Evolución de la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato .....	104

III.C.2.	Evolución de la actividad nitrato reductasa en presencia de cianato .....	113
III.C.3.	Consumo de nitrato por células de <i>A. chroococcum</i> con el sistema asimilador de nitrato inducido por cianato .....	120
III.C.4.	Efecto del cloranfenicol sobre la inducción de la nitrato reductasa de <i>A. chroococcum</i> en presencia de nitrato o cianato .....	123
III.C.5.	Efecto de la fuente de carbono sobre la inducción de la actividad nitrato reductasa y sobre el consumo de nitrato en células de <i>A. chroococcum</i> cultivadas en un medio sin fuente de nitrógeno combinado y transferidas a un medio con cianato o nitrato .....	123
III.C.6.	Efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato en células de <i>A. chroococcum</i> cultivadas en un medio sin fuente de nitrógeno combinado y transferidas a un medio con cianato .....	125
III.C.7.	Evolución de las actividades nitrogenasa y nitrato reductasa en presencia de cianato y nitrato .....	129
IV.	DISCUSION .....	133
V.	CONCLUSIONES .....	158
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	161

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	Absorbencia de luz; también se utiliza DO
aa	Aminoácido
ADP	Adenosín 5'-difosfato
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
ATPasa	Adenosín 5'-trifosfatasa
BV	Bencil viológeno
Cit	Citocromo
D	Dalton
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DNP	Dinitrofenol
DO	Densidad óptica
DPIP	2,6 Diclorofenol-indofenol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
$E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ mM}}$	Coefficiente de extinción milimolar para un paso de luz de 1 cm
FCCP	Trifluorometoxicarbonilcianuro fenil-hidrazona
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
g	Aceleración de la gravedad
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Gln	Glutamina

Glu	Glutamato
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
Km	Constante de Michaelis
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetoglutarato
l	Litro
MES	Acido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
min	Minuto
ml	Mililitro
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MSF	L-Metionina sulfona
MSX	L-Metionina-D,L-sulfoximina
MTAB	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido forma reducida
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, forma reducida
NNEDA	N- {naftil- (1) } - etilen-diamina diclorhidrato
NO <sub>3</sub> Rasa	Nitrato reductasa
NO <sub>2</sub> Rasa	Nitrito reductasa
p/p	Peso/peso
PMS	Metil sulfato-metilfenazina
PPT	Fosfinotricina

p/v	Peso/volumen
r.p.m.	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
TMPD	Tetrametil-fenilen-diamina
Tricina	N-tris (hidroximetil) metilglicina
Tris	Trihidroximetilaminometano
U	Unidad enzimática
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
v/v	Volumen/volumen

## I. INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los componentes claves de los seres vivos, donde se encuentra formando parte de moléculas esenciales como son las proteínas y los ácidos nucleicos. En la naturaleza el nitrógeno se encuentra en diferentes estados de oxidación, siendo sólo en su estado de máxima reducción capaz de combinarse con esqueletos carbonados y originar dichas biomoléculas. Los organismos vivos, a excepción de los animales, obtienen el nitrógeno necesario para su metabolismo, principalmente, a partir de dinitrógeno o asimilando nitrato o amonio.

La asimilación de nitrato es un proceso que realizan tanto organismos eucariotas: plantas superiores, algas y hongos, como organismos procariotas: bacterias y cianobacterias; mientras que la capacidad de fijar dinitrógeno, está limitada a organismos procariotas (Losada et al., 1.981; Guerrero, 1.982).

*A. chroococcum*, bacteria Gram-negativa, heterótrofa y aerobia estricta, organismo utilizado para la realización de los estudios que aquí se presentan, puede utilizar como fuente de nitrógeno tanto el dinitrógeno atmosférico, como el nitrato, nitrito o amonio (Kleiner, 1.975; Eady y Postgate, 1.974). El nitrógeno molecular, el nitrato y el nitrito, son reducidos hasta amonio y éste es posteriormente incorporado en esqueletos carbonados (Nagatani et al., 1.971). La evidencia experimental de que se dispone, ha per-

mitido establecer que la asimilación de nitrato, en los organismos en que se ha investigado, es un proceso que incluye las tres etapas fundamentales que se representan en el esquema 1, y que son: entrada del ión nitrato al interior celular; reducción de éste a nitrito y amonio e incorporación del amonio en esqueletos carbonados para originar los aminoácidos.

La distinción de estas tres etapas en el proceso de asimilación de nitrato es común a organismos unicelulares carentes de vacuolas de almacenamiento; mientras que, cuando se trata de organismos pluricelulares u organismos vacuolados, podemos distinguir otras etapas además de las anteriormente citadas. Una de estas etapas consiste en la acumulación de nitrato en las vacuolas; otra la constituye el posible transporte de nitrato de unas células a otras (Ullrich, 1.983).

Para el estudio de la asimilación de nitrato en *A. chroococcum*, hemos utilizado un método de ensayo basado en la medida de la desaparición de nitrato del medio. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los microorganismos que asimilan nitrato éste es rápidamente reducido, las medidas de desaparición de nitrato del medio corresponden no sólo a la entrada de éste al interior celular, sino también a la metabolización intracelular de dicho ión, lo cual impide distinguir ambos procesos; así como determinar si diver-

ASIMILACION DE NITRATO POR *A. chroococcum*

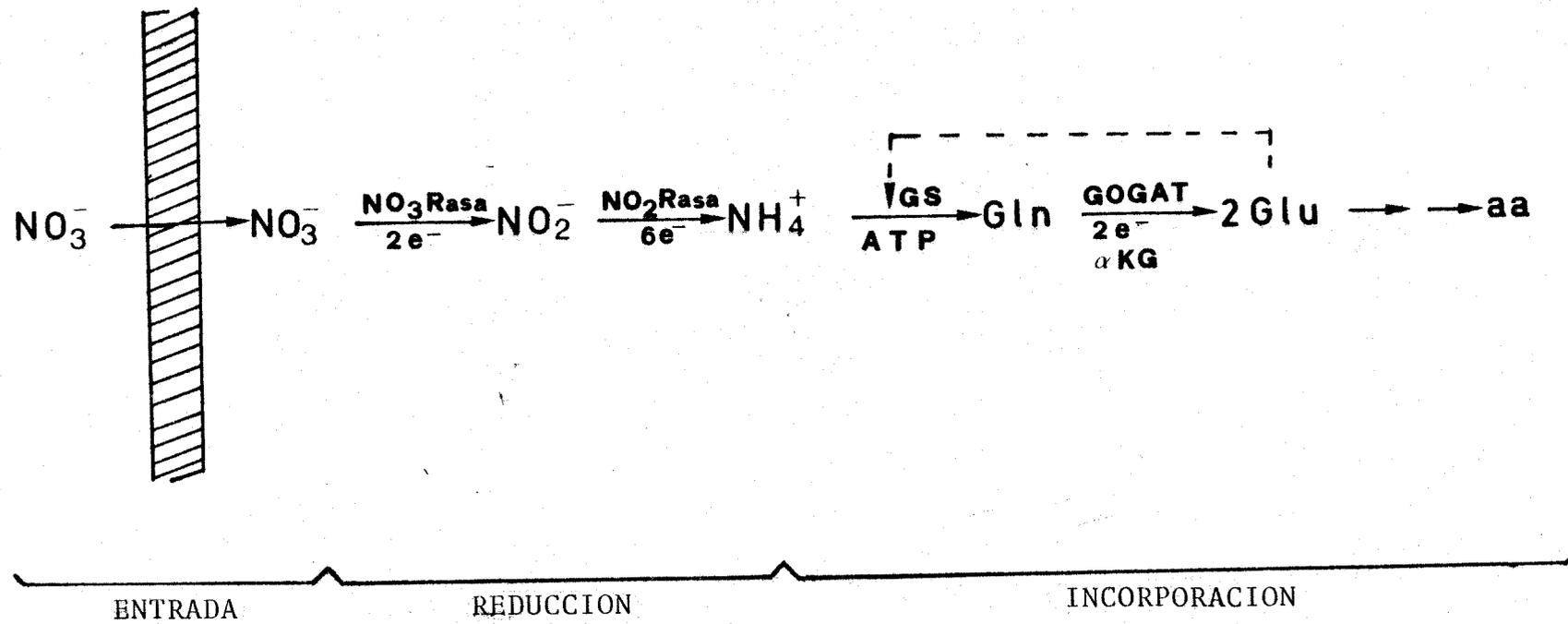


Fig. 1

Los factores, por ejemplo, el amonio, actúa sobre la entrada del nitrato o sobre su posterior metabolización. Sin embargo, los estudios realizados en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cresswell y Syrett, 1.981), permiten separar las etapas de entrada y reducción de nitrato, ya que estos organismos acumulan nitrato en su interior. En estos organismos se ha puesto de manifiesto que la entrada de nitrato es un proceso que tiene lugar mediante un transporte activo, es decir, requiere energía, y que la adición de amonio inhibe la entrada de nitrato más que la reducción de éste. Estudios realizados en otra diatomea, *Skeletonema costatum* (Serra et al., 1.978), han permitido también la separación de las dos etapas mencionadas, ya que observan que en presencia de tungstato, que se incorpora en la nitrato reductasa y la hace catalíticamente inactiva, la entrada de nitrato no se ve afectada, pero sí su reducción. Otros trabajos realizados en hongos (Schloemer y Garrett, 1.974) y algas verdes (Eisele y Ullrich, 1.977; Tischner y Lorenzen, 1.979; Ullrich, 1.983), permiten también separar el paso de entrada de nitrato y el de su reducción; así como demostrar la naturaleza activa de la entrada de nitrato y su carácter acumulativo, además de describir una inhibición por amonio de dicha entrada.

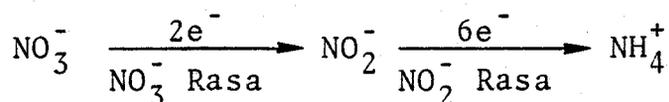
Las investigaciones sobre la asimilación de nitrato por bacterias quimiotróficas son escasas. No obstante, los

estudios realizados en *Klebsiella pneumoniae* (Thayer y Huffaker, 1.982) y *Pseudomonas fluorescens* (Betlach et al 1.981), utilizando el isótopo radioactivo  $^{13}\text{N}$ , han puesto de manifiesto que la entrada de nitrato es un proceso acumulativo. Suspensiones celulares de *K. pneumoniae* cultivadas en presencia de tungsato presentan nitrato reductasa inactiva, pero acumulan nitrato de 6-10 veces en el interior celular respecto a la concentración externa de nitrato. Por otro lado, en *Pseudomonas fluorescens*, se ha encontrado que el amonio inhibe la entrada de nitrato, pero no afecta la actividad nitrato reductasa, al menos en tiempos cortos. También se ha adelantado que, en esta bacteria la entrada de nitrato al interior celular está mediada por una permeasa que exhibe una afinidad por el nitrato superior a la que presenta la nitrato reductasa.

Estudios realizados en *Rhodopseudomonas capsulata*, (Jackson et al., 1.981), utilizando un electrodo de nitrato, demuestran que la entrada de nitrato en dicho organismo es un proceso que requiere energía. El carácter activo de la entrada de nitrato también ha sido comprobado en *Klebsiella pneumoniae* (Thayer y Huffaker, 1.982); *Pseudomonas fluorescens* (Betlach et al., 1.981) y en la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Flores, 1.982).

Una vez que el nitrato entra en la célula, es reducido hasta amonio. Estudios llevados a cabo en una gran va-

riedad de organismos han establecido definitivamente, que la reducción asimilatoria de nitrato tiene lugar mediante dos metaloproteínas que catalizan consecutivamente la reducción de nitrato a nitrito y de éste a amonio según el esquema siguiente:



(Vennesland y Guerrero, 1.979; Guerrero et al., 1.981). Estas dos enzimas difieren en sus propiedades moleculares, así como en la naturaleza de sus donadores fisiológicos de electrones, dependiendo del material biológico estudiado (Losada y Guerrero, 1.979; Losada et al., 1.981).

En eucariotas la nitrato reductasa es una molibdo-proteína que contiene flavina (FAD) y un grupo hemo (Cit b<sub>557</sub>). La fuente donadora de electrones la constituye los piridín nucleótidos reducidos de origen fotosintético o provenientes de la oxidación de carbohidratos (Losada, 1.976; Garrett y Amy, 1.978; Vennesland y Guerrero, 1.979; Hewitt y Notton, 1.980; Losada et al., 1.981). El peso molecular de dicha enzima es de 200-500 kdaltons. Estas nitrato reductasas dependientes de piridín nucleótido presentan dos actividades que pueden ensayarse separadamente: actividad diaforasa, que cataliza la reducción por NAD(P)H de

varios aceptores de electrones como FAD; citocromo c; ferricianuro; MV o BV u otros oxidantes. La otra actividad es la terminal, mediante la cual el nitrato es reducido por flavinas reducidas o por viológenos reducidos.

Por otro lado, en procariotas, la nitrato reductasa es una molibdo proteina de peso molecular inferior a la de eucariotas, que no lleva en su molécula flavina ni grupo hemo y que es incapaz de utilizar los piridín nucleótidos como donadores de electrones, utilizando, sin embargo, ferredoxina reducida como fuente de electrones.

La nitrato reductasa de *A. chroococcum*, ha sido parcialmente caracterizada en trabajos realizados en nuestro laboratorio (Guerrero et al., 1.973). Se ha descrito que es una proteína localizada en la fracción soluble después de la rotura de las células y que reduce nitrato *in vitro* utilizando para ello algunos donadores de electrones artificiales como son el BV y el MV reducidos químicamente por ditionito. La molécula tiene un peso molecular de 100 kdaltons y contiene molibdeno como cofactor, siendo incapaz de utilizar los piridín nucleótidos como donadores de electrones *in vitro*. Está aún por identificar la cadena completa desde los piridín nucleótidos, o el correspondiente reductor terminal, hasta el nitrato en *Azotobacter*. En trabajos realizados en nuestro laboratorio (Tortolero et al., 1.975), se consiguió reducir nitrato utilizando como fuente de po-

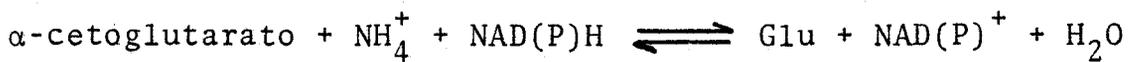
der reductor ferredoxina de este organismo reducida por un sistema de cloroplastos iluminados de espinacas o por NADPH y  $\text{NADP}^+$  reductasa de espinacas. Otros estudios (Llobell et al., 1.980), ponen de manifiesto que las flavina: FMN y riboflavinas reducidas, son donadores efectivos de la nitrato reductasa de *A. chroococcum*.

La otra enzima del sistema reductor de nitrato es la nitrito reductasa. En organismos fotosintéticos, tanto eucariotas como procariotas, la nitrito reductasa es una enzima dependiente de ferredoxina (Hucklesby et al., 1.976; Zumft, 1.972; Ho et al., 1.976). Por otro lado, en organismos no fotosintéticos, la nitrito reductasa es dependiente de piridín nucleótido reducido (Guerrero et al., 1.981).

La nitrito reductasa de *A. chroococcum* (Vega et al., 1.973), presenta alta especificidad por NADH como donador de electrones; existen pruebas de la participación de metales y flavinas en el transporte de electrones desde el NADH hasta el nitrito a través de la nitrito reductasa. El producto de la reacción catalizada por esta enzima es el amonio, que como hemos señalado anteriormente, es el estado de reducción del nitrógeno que se incorpora en esqueletos carbonados dando origen a los aminoácidos.

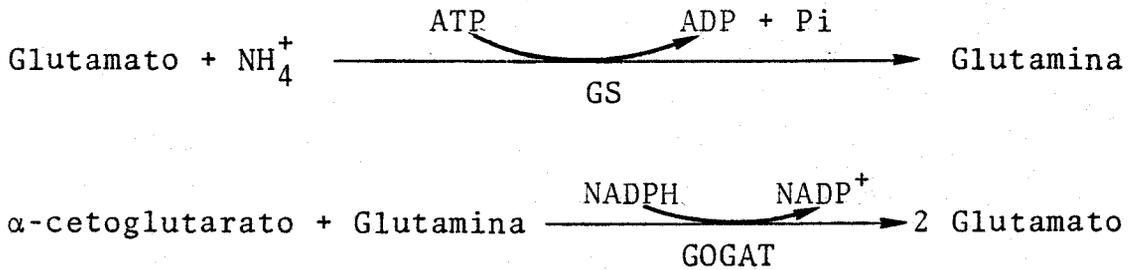
Existen varias vías metabólicas que podrían ser utilizadas para la asimilación del amonio generado en el inte-

rior celular, bien como resultado de la fijación de dinitrógeno o como resultado de la reducción de nitrato o nitrito. Durante muchos años, se consideró que la principal ruta de asimilación de amonio era la catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual cataliza la aminación reductiva del  $\alpha$ -cetoglutarato dando glutamato.



Esta actividad, GDH, se encontraba en gran cantidad de organismos, sin embargo, debido a que presenta una elevada  $K_m$  para el amonio, diversos autores consideraron la posibilidad de la existencia de otra ruta metabólica, al menos cuando la concentración de amonio es baja, capaz de asimilar amonio. En esta línea, estudios realizados en *Klebsiella aerogenes* (Meers et al., 1.970), mostraron que los niveles de GDH eran elevados cuando el factor limitante no era el amonio, mientras que cuando éste se encontraba a concentraciones del orden de 10 veces menor que la  $K_m$  de la GDH, los niveles de la enzima descendían hasta un 3%, aproximadamente, del original, por lo que no podría satisfacer las necesidades biosintéticas del organismo. Después de una serie de experimentos a nivel fisiológico y enzimático, observaron que el primer aminoácido formado tras la incorporación de amonio, era la glutamina, que posteriormente originaba glutamato. Este proceso tenía lugar a tra-

vés de dos enzimas que catalizan las reacciones siguientes:



La primera reacción está catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS) y la segunda por la glutamato sintasa (GOGAT). A esta ruta se le denomina GS/GOGAT.

Hoy día, se admite (Tempest et al., 1.973; Miflin y Lea, 1.976; Tyler, 1.978), que la ruta GS/GOGAT es la principal vía de incorporación de amonio en la mayor parte de los organismos estudiados, a excepción de hongos (Brown et al., 1.974). Por otro lado, se ha comprobado que algunas bacterias carecen de actividad GDH detectable, como por ejemplo en *Bacillus megaterium* (Elmerich y Aubert, 1.971); *Rhodopseudomonas capsulata* (Johansson y Gest, 1.976); *Rhizobium* (Ludwig, 1.978) y en *A. chroococcum* (Bárcena, 1.980). También se ha comprobado la ausencia de GDH en la mayoría de cianobacterias (Meeks et al., 1.977).

La glutamina sintetasa es una enzima que ha sido estudiada en una gran cantidad de organismos (Magasanik et al., 1.974; Magasanik et al., 1.977), como bacterias fotosintéticas (Johansson y Gest, 1.976); *Klebsiella aerogenes*

(Bender et al., 1.977); *E. coli* (Shapiro y Stadtman, 1.970; Stadtman et al., 1.979); *Chlamydomonas reinhardtii* (Floren-  
cio, 1.983); *Azotobacter vinelandii* (Kleinschmidt y  
Kleiner, 1.978).

Actualmente está admitido que todas las bacterias Gram negativas poseen una glutamina sintetasa interconver-  
tible en dos formas: una desadenililada activa y otra ade-  
nililada menos activa, mientras que la mayoría de las Gram  
positivas no presentan esta característica (Tronick et al.,  
1.973).

La glutamina sintetasa de *A. chroococcum* ha sido  
parcialmente purificada en nuestro laboratorio (Bárcena,  
1.980) y se ha podido comprobar que es una enzima similar  
a la de otras bacterias Gram negativas (Kleinschmidt y  
Kleiner, 1.978; Siedel y Shelton, 1.979; Shapiro y Stadtman,  
1.970). Es un oligómero formado por doce subunidades, cada  
una de las cuales puede unir covalentemente un grupo adeni-  
lo formando una subunidad adenililada, que es catalítica-  
mente poco activa. El número de subunidades adenililadas  
(0-12), dá el grado de adenililación de la enzima, la cual  
es menos activa cuantas más subunidades adenililadas tiene.  
El grado de adenililación varía según la fuente de nitró-  
geno utilizada en el medio de cultivo, estando desadenili-  
lada en ausencia de amonio o nitrato y adenililada cuando  
uno de dichos iones está presente en el medio.

La otra enzima de la ruta GS/GOGAT, la glutamato sintasa, ha sido también objeto de diversos estudios, habiendo sido purificada en diversos organismos (Adachi y Suzuki, 1.977; Boland, 1.979; Cullimore y Sims, 1.981; Mantsala y Zalkin, 1.976; Schmidt y Jervis, 1.980; Barcena, 1.980).

La asimilación de nitrato en diferentes organismos ha sido estudiada bajo distintas condiciones ambientales, tales como luz, temperatura, pH, CO<sub>2</sub>, nivel de oxígeno, fuente de nitrógeno y otros factores (Beevers y Hageman, 1.972; Garrett y Amy, 1.978; Losada y Guerrero, 1.979; Syrett y Leftley, 1.976; Vennesland y Guerrero, 1.979). Sin embargo, ha sido la reducción de nitrato la fase más estudiada respecto a su papel en la regulación de la asimilación de dicho ión. En diferentes células y tejidos con capacidad asimilatoria de nitrato, se observó que la actividad nitrito reductasa era varias veces mayor que la actividad nitrato reductasa, por lo que se pensó que la reducción de nitrato era el paso limitante en la velocidad de su asimilación (Beevers y Hageman, 1.972) y, por tanto, el punto principal de control sobre la actividad asimilatoria de nitrato. Sin embargo, las evidencias de la existencia de un sistema de transporte de nitrato sugirió que podía ser éste y no la reducción del ión, el punto de control de la asimilación de nitrato. Anteriormente, hemos señalado

que las etapas de entrada y reducción de nitrato son muy difíciles de separar, principalmente en organismos unicelulares y sin vacuolas de almacenamiento; así, Butz y Jackson (1.977), postularon que fundamentalmente en este tipo de organismos, la entrada de nitrato a la célula y su posterior reducción eran dependientes de una misma molécula: nitrato reductasa. Sin embargo, hay evidencias de que no siempre existe esa estrecha correlación entre la entrada del ión y su reducción, ya que se ha podido demostrar que en diversos organismos tiene lugar entrada de nitrato al interior celular estando la nitrato reductasa en estado no funcional (Doddema et al., 1.978; Heimer y Filner, 1.970; Schloemer y Garrett, 1.974). Por tanto, los diferentes factores que afectan al consumo de nitrato pueden ejercer su acción sobre la entrada de éste al interior celular, sobre su reducción o sobre ambos procesos.

Una atención especial se ha dedicado al papel del amonio, que es el producto final de la reducción de nitrato y el cual puede actuar tanto a nivel de entrada de éste como a nivel de síntesis de actividad nitrato reductasa (Guerrero et al., 1.981; Ullrich, 1.983).

Hay una gran variedad de evidencias de que el amonio ejerce una rápida inhibición del consumo de nitrato en diferentes estirpes de *Chlorella* (Cramer y Myers, 1.949; Syrett y Morris, 1.963; Pistorius et al., 1.978; Tischner

y Lorenzen, 1.979); *Chlamydomonas reinhardtii* (Thacker y Syrett, 1.972; Florencio y Vega, 1.981); cianobacterias (Ohmori et al., 1.977; Flores et al., 1.980); *Pseudomonas fluorescens* (Betlach et al., 1.981); *Klebsiella pneumoniae* (Thayer y Huffaker, 1.982); en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cresswell y Syrett, 1.981), así como en hongos (Morton y MacMillan, 1.954).

En la mayoría de los casos estudiados, esta inhibición del consumo de nitrato en presencia de amonio era de carácter reversible, desapareciendo dicha inhibición cuando el amonio se agotaba del medio (Cramer y Myers, 1.949; Syrett y Morris, 1.963; Flores et al., 1.980; Ohmori et al., 1.977; Morton, 1.956). Aunque diversos autores habían sugerido que la inhibición por amonio tenía lugar sobre la actividad nitrato reductasa (Ferguson, 1.969) se ha demostrado inequívocamente que cuando se añaden bajas concentraciones de amonio a una suspensión celular consumiendo nitrato, el consumo de dicho ión es rápidamente interrumpido, mientras que no hay cambios significativos en los niveles celulares de actividad nitrato reductasa (Flores et al., 1.980; Ohmori et al., 1.977; Pistorius, 1.978). En estudios realizados en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cresswell y Syrett, 1.979), se observa que en presencia de amonio se produce una inmediata y reversible inhibición de la acumulación de nitrato en el interior ce-

lular; en estudios posteriores Cresswell y Syrett (1.981), concluyeron que el amonio inhibe el consumo de nitrato a nivel del sistema de entrada de éste al interior celular. Hay evidencias recientes (Flores et al., 1.980), de que el efecto inhibitor del consumo de nitrato que tiene lugar en presencia de amonio, es debido a algún(os) de los producto(s) de su asimilación y no al propio amonio, ya que en presencia de inhibidores de la asimilación de éste no se detecta el efecto inhibitor del amonio sobre la entrada de nitrato a la célula.

El desarrollo del sistema de entrada de nitrato ha sido estudiado en *Neurospora* (Schloemer y Garrett, 1.974) y en células de tabaco; en ambas la presencia de nitrito o nitrato es esencial para el desarrollo del sistema de transporte. En *Neurospora crassa*, el sistema de transporte de nitrato puede ser caracterizado más como un sistema inducible que como un sistema represible, ya que el amonio no reprime la formación del sistema de transporte de nitrato. En este mismo trabajo se señalaba también que el amonio inhibe en este organismo la entrada de nitrato de manera no competitiva. Por otro lado, en la diatomea *P. tricornutum* (Cresswell y Syrett, 1.981), se ha puesto de manifiesto que el desarrollo del sistema de transporte de nitrato no precisa la presencia de nitrato sino la ausencia de amonio.

Por otra parte, ha sido estudiado en gran cantidad de organismos el posible efecto inductor del nitrato, así como el papel represor del ión amonio, sobre la síntesis del sistema reductor de nitrato. Se ha podido observar, en general, que los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa son elevados en organismos cultivados en nitrato, mientras que cuando dichos organismos son cultivados en medios con dinitrógeno o amonio como fuente de nitrógeno, sólo se aprecian niveles basales de dichas actividades. Los estudios realizados en gran variedad de algas, han puesto de manifiesto que el amonio actúa como represor de la síntesis de nitrato reductasa (Herrera et al., 1.972; Morris y Syrett, 1.963; Vega et al., 1.971) sin embargo, el papel inductor del nitrato ha sido rechazado, al menos en un gran número de algas verdes (Herrera et al., 1.972; Sosa et al., 1.978; Syrett y Hipkin, 1.973; Vega et al., 1.971) y algas rojas (Rigano y Violante, 1.973), donde se observó que había síntesis de nitrato reductasa en ausencia de nitrato.

Estudios realizados en bacterias no fijadoras de nitrógeno (Villalobo et al., 1.977), así como en *Penicillium* (Morton, 1.956), pusieron de manifiesto que estos organismos desarrollan actividad nitrato reductasa al ser transferidos de un medio con amonio a un medio sin fuente de nitrógeno. Los estudios realizados en cianobacterias (Herrero

et al., 1.981), establecen que en cepas no fijadoras de di-nitrógeno, como es el caso de *Anacystis nidulans*, la síntesis de nitrato reductasa es reprimida en presencia de amonio, mientras que la síntesis de novo de la enzima tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de nitrato; esto pone de manifiesto que, en estos organismos, no se requiere la presencia de nitrato para inducir a la enzima. La represión por amonio de la síntesis de nitrato reductasa, no tiene lugar cuando las células son tratadas con inhibidores de la glutamina sintetasa, lo que sugiere que dicha represión no es producida por el propio amonio, sino que éste debe ser asimilado para que tenga lugar dicha represión, es decir, se requiere la presencia de algún(os) producto(s) de la metabolización del amonio. Contrarios a estos resultados son los obtenidos en el estudio de *Anabaena* *espy* en *Nostoc* *espy* que señalan al nitrato como inductor de la síntesis de nitrato reductasa y al amonio como inhibidor de la entrada de nitrato a la célula. Así, al no poder entrar el inductor al interior celular, no tiene lugar la síntesis de la enzima (Herrero et al., 1.981). Este efecto del ión amonio desaparece en presencia de inhibidores de la asimilación de amonio.

Estudios realizados en *A. chroococcum*, *in vitro*, (Guerrero et al., 1.973), establecen que cuando las células son cultivadas en nitrato, presentan un elevado nivel de

actividad nitrato reductasa, mientras que cuando son cultivadas en medios con dinitrógeno o amonio, se detectan sólo actividades basales de nitrato reductasa. Cuando las células fueron cultivadas con nitrito como única fuente de nitrógeno, se obtuvieron niveles elevados de actividad nitrato reductasa, aunque inferiores a los obtenidos en presencia de nitrato; por otro lado, cuando la fuente de nitrógeno utilizada fué nitrato amónico, aparecieron niveles de actividad del orden de 1/3 de las detectadas en presencia de nitrato.

En el trabajo que aquí se presenta, hemos estudiado la asimilación de nitrato en *A. chroococcum*; en primer lugar se ha determinado la dependencia del proceso de una fuente de energía. Se ha puesto a punto un sistema artificial que actúa como fuente de energía que permite el consumo de nitrato en ausencia de una fuente de carbono. Por otro lado, hemos podido comprobar que aunque las etapas de entrada de nitrato y de reducción de éste están muy unidas, parece que están mediadas por moléculas diferentes, las cuales presentan distinta afinidad por el nitrato. También hemos estudiado diversos aspectos de la regulación del transporte de nitrato, en la cual parece que intervienen producto(s) de la asimilación del amonio, conclusión a la que se ha llegado después de examinar el efecto de inhibidores de la ruta GS/GOGAT sobre la acción del amonio. Final-

mente, se han investigado los efectos reguladores del nitrato, amonio y cianato sobre los niveles celulares del sistema reductor del nitrato y sobre el desarrollo del sistema de transporte del mismo.

## II. MATERIALES Y METODOS

## II.A.- ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

### II.A.1.- Material biológico

Para la realización del trabajo aquí presentado hemos utilizado la bacteria aerobia fijadora de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum*, ATCC 4412, procedente de la colección de cultivos tipo de la Universidad de Valencia (Prof. F. Uruburu).

### II.A.2.- Condiciones estándar de cultivo

Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer, llenados con medio sintético hasta la mitad de su capacidad total, a 27°C en un cultivador NEW BRUNSWICK, SCIENTIFIC Co, modelo G-25 con una agitación constante de 150-220 r.p.m.

El medio contenía las siguientes cantidades de nutrientes por litro de agua destilada:  $\text{KNO}_3$ , 8 mmoles;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 mmoles;  $\text{NaCl}$ , 3,4 mmoles;  $\text{CaCl}_2$ , 0,34 mmoles;  $\text{NaMO}_4$ , 0,012 mmoles; manitol, 27,5 mmoles; tampón fosfato potásico, pH 7,5, 20 mmoles;  $\text{FeSO}_4$ , 0,5 mmoles y EDTA, 0,5 mmoles. Estos dos últimos productos, se añadían de una solución preparada según Arnon et al., (1.974).

Los matraces conteniendo el medio completo, excepto el fosfato, y tapados con algodón graso se esterilizaron

en un autoclave eléctrico SELECTA, modelo 437-G a una atmósfera de presión (120°C), durante 20 min. El fosfato potásico se esterilizó aparte para evitar que precipitara en forma de sal férrica, después se dejó enfriar y se vertió sobre el medio de cultivo en condiciones estériles.

#### II.A.3.- Modificaciones del medio estándar

Las variaciones del medio estándar que se hicieron, afectaban a la fuente de nitrógeno y/o a la fuente de carbono. Cuando se modificó la fuente de nitrógeno, el nitrato potásico fué sustituido por dinitrógeno, por acetato amónico o por una mezcla de argón y oxígeno cuando se quiso someter a las células a deficiencia (hambre) de nitrógeno. Cuando fué la fuente de carbono la que se modificó, el manitol fué sustituido por otras fuentes de carbono cuya naturaleza y concentración se indicarán en cada caso.

#### II.A.4.- Establecimiento de hambre de nitrógeno

Para someter a las células a hambre de nitrógeno, se gasearon con una atmósfera de oxígeno al 20% (v/v) en argón durante 4 ó 5 horas en tubos de 45 mm de diámetro por 400 mm de largo, tapados con algodón graso.

#### II.A.5.- Mantenimiento del organismo y preparación de inóculos

Para la conservación y mantenimiento de las células de *Azotobacter chroococcum*, se hicieron siembras de células en tubos con medio sólido, de composición igual que la descrita en el apartado II.A.2.- pero eliminando el nitrato, es decir, en condiciones de fijación de dinitrógeno, y suplementando con agar al 2,5% (p/v); tras 2 días de crecimiento a 27°C, se guardaban en frío (0-4°C).

Los inóculos se iniciaron a partir de las células de estos tubos, previamente puestos a temperatura ambiente durante 1 ó 2 horas. En condiciones estériles, se tomaba una cierta cantidad de masa celular, se resuspendían en 100 ml de medio líquido con la fuente de nitrógeno deseada y se dejaban crecer durante 1 ó 2 días. De este cultivo se tomaban 10 ml con los que se inoculaban 250 ml de medio fresco, el cual se utilizaba como inóculo de partida transcurridas unas 12 horas (antes de que alcance la fase estacionaria), añadiéndose 2 a 2,5 volúmenes de esta suspensión por cada 100 volúmenes de medio fresco.

## II.B.- RECOGIDA DE CELULAS

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{560nm} = 0,5-0,6$ ) por centrifugación a  $9.000 \times g$  durante 10 min en una centrífuga SORVALL RC-2B a  $4$  ó  $5^{\circ}C$ . Posteriormente se lavaron dos veces con tampón MOPS-KOH, 25 mM pH 7,5. A continuación se resuspendió el precipitado, concentrando 7-10 veces, en tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5, al que se añadía manitol al 1% (p/v) para experimentos de menos de 30 min de duración y al 2% (p/v) para experimentos de mayor duración.

### II.B.1.- Ensayo del sistema de consumo de nitrato

En la realización de este trabajo, denominamos consumo de nitrato al conjunto formado por la entrada y asimilación de nitrato en *A. chroococcum*, ya que el método usado para la determinación de nitrato sólo nos permite detectar la desaparición de nitrato en el medio, no pudiendo valorar el nitrato que se acumula en el interior celular.

El consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* lo medimos en suspensiones celulares preparadas como se indica en el apartado anterior y colocadas en matraces Erlenmeyer llenados hasta la mitad de su capacidad y puestos en agitación (70-100 oscilaciones por min) a  $27^{\circ}C$ . A estas suspensiones se le añadía nitrato potásico a una concentración de 0,3-0,5 mM y se tomaban alícuotas de 2 ml cada cier

to tiempo. Estas alícuotas eran filtradas, utilizando un sistema de filtración MILLIPORE de 12 orificios, mediante papel de filtro GLASS MICROFIBRE PAPER (GF/C) de WHATMAN. Posteriormente, se recogían los filtrados y se determinaba el nitrato del medio por el método de Cawse, descrito en el apartado II.E.1.-. Además de nitrato, en el filtrado se hacían otras determinaciones, que se indican en cada caso.

## II.C.- ESTIMACION DE LOS NIVELES ENZIMATICOS

En este trabajo, hemos determinado los niveles celulares de las enzimas: Nitrato reductasa, Nitrito reductasa y Glutamina sintetasa. Debido a la necesidad de estimar dichos niveles enzimáticos inmediatamente después de exponer las células a distintas condiciones experimentales, las actividades enzimáticas se determinaron *in situ*, después de permeabilizar las células.

### II.C.1.- Permeabilización con tolueno

Para hacer permeables las membranas de *A. chroococcum* a sustancias de bajo peso molecular y poder determinar actividades enzimáticas, se tomaron 5 ml de la suspensión celular descrita en II.B.-, se centrifugó a 9.000 x g durante 5 min a 4-5°C, se lavaron con MOPS-KOH, 25 mM, pH 7,5 y se resuspendieron en 1,0 ml de una solución de

MOPS-KOH 0,125 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,25 mM, alcanzándose así una concentración de 2-4 mg de proteína celular por ml. Posteriormente, se sometía durante 2 min a agitación vigorosa en presencia de tolueno a una concentración final de 2 % (v/v). De aquí se tomaba una alícuota y se ensayaba con ella la actividad enzimática deseada.

#### II,C.2.- Permeabilización con M.T.A.B.

La permeabilización de las membranas celulares con el detergente iónico M.T.A.B., no requería pretratar a las células con el detergente, sino que éste se añadía a una concentración de 100 µg/ml, a una mezcla de reacción para el ensayo de la actividad enzimática considerada. A esta mezcla de reacción se adicionaba una alícuota de una suspensión de células no permeabilizadas, preparadas como se describe en el apartado II.C.1.- Después se agitaba vigorosamente durante 2-5 seg para homogenizar y se iniciaba el ensayo enzimático considerado.

#### II.D.- ENSAYOS ENZIMATICOS

##### II.D.1.- Ensayo de la actividad nitrato reductasa

Para estimar el nivel celular de actividad nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* se determinó según el método descrito por Guerrero et al., (1.973). El ensayo

se llevó a cabo al aire en tubos de ensayo reforzados de 10 ml de capacidad. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 3 ó 5 min y contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-ClH, pH 7,5, 100  $\mu$ moles; KNO<sub>3</sub>, 10  $\mu$ moles; metil viológeno, 0,2  $\mu$ moles; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, disuelto en 0,1 ml de Tris-ClH de pH 7,5, 0,8 mg. A esta mezcla de reacción se añadía una cantidad adecuada de células permeabilizadas, como se describe en el apartado II.C.1.- ó en II.C.2.-. La reacción se inició añadiendo Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y se detuvo agitando fuertemente la mezcla de reacción en un aparato vibrador Super-mixer, hasta la desaparición del color azul del metil viológeno reducido.

El nitrito formado en la reacción se determinó como se describe en el apartado II.E.2.

Una unidad de actividad enzimática corresponde a un micromol de nitrito formado por minuto.

La disolución de ditionito sódico se preparaba inmediatamente antes de usarse.

#### II.D.2.- Ensayo de la actividad nitrito reductasa

El ensayo se llevó a cabo según el método descrito por Vega et al., (1.973) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-ClH, pH 7,5, 100  $\mu$ moles; NaNO<sub>2</sub>, 20  $\mu$ moles; metil viológeno 0,2  $\mu$ moles; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, disuelto en 0,1 ml de NaHCO<sub>3</sub>, 0,29 M, 2,6 mg y una cantidad adecuada de una suspensión

celular permeabilizada.

El ensayo se iniciaba con la adición de ditionito, se incubaba la mezcla durante 5-10 min a 30°C y se detenía la reacción por agitación vigorosa.

El nitrito desaparecido en la reacción se determinó como se indica en el apartado II.E.2.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de un micromol de nitrito en un minuto.

#### II.D.3.- Ensayo de la actividad glutamina sintetasa

El ensayo se llevó a cabo determinando colorimétricamente la actividad "transferasa" según Shapiro y Stadtman (1.970), mediante el procedimiento de Kleiner (1.975) ligeramente modificado. La reacción se realizó en tubos de ensayo reforzados de 10 ml de capacidad; en un volumen de 1 ml conteniendo: MOPS-KOH, pH 7,5, 100  $\mu$ moles; glutamina, 25  $\mu$ moles; ADP-Na, 0,5  $\mu$ moles;  $MnCl_2$ , 0,3  $\mu$ moles;  $NH_2OHC1H$ , 25  $\mu$ moles;  $Na_2HAsO_4$ , 25  $\mu$ moles y una cantidad adecuada de células permeabilizadas. Cuando se midió la actividad dependiente de  $Mg^{2+}$ , se añadían 60  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ . La mezcla de reacción se incubaba a 30°C durante 10 ó 15 min y se paraba la reacción por adición de  $FeCl_3$  como se indica en el apartado II.F.3. A continuación se centrifugaba para eliminar la turbidez que

producía la proteína precipitada.

Como control, se hacía un ensayo en el que se omitían el ADP y el  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  para corregir la formación de  $\gamma$ -glutamil-hidroxiato mediante reacciones distintas a la catalizada por la glutamina sintetasa.

El  $\gamma$ -glutamil-hidroxiato se determinó como se indica en el apartado II.E.3.

Una unidad de actividad enzimática se definía como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -glutamil-hidroxiato por minuto.

#### II.D.4.- Ensayo de la actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa, *in vivo*, se determinó por la técnica de reducción de acetileno descrita por Stewart et al., (1.967).

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 10 ml de capacidad, cerrados con tapones de goma de los que equipan los tubos B-D Vacutainer 4827, que contenían 2 ml de suspensión celular bajo una atmósfera de acetileno al 10% en aire. Las vasijas se ponían en agitación en un baño Warburg, marca Braum, a 100 oscilaciones por minuto y a 27 °C. A los 15 min se extraía con una jeringa HAMILTON especial para gases, una alícuota y se determina-

ba el etileno producido según se describe en el apartado II.E.5. Transcurridos 10 min, se tomaba otra alícuota y se volvía a determinar el etileno producido. En las condiciones de ensayo, la producción de etileno era lineal durante al menos 2 horas.

## II.E.- METODOS ANALITICOS

### II.E.1.- Determinación de nitrato

El nitrato se determinó por absorbancia a 210 nm en disolución ácida según el método descrito por Cawse (1.967). Un volúmen de 1 ml de muestra conteniendo entre 0-100 nmoles de nitrato se suplementaba con 1 ml de ácido amidosulfúrico al 2% (p/v). Tras incubar 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 3 ml de ácido perclórico al 6,65%. Transcurridos 25 min a temperatura ambiente, se estimaba la concentración de nitrato midiendo la absorbancia de la disolución a 210 nm empleando un coeficiente de extinción  $E_1^1 \frac{\text{mM}}{\text{cm}} = 6,4$ . El tratamiento con ácido amidosulfúrico eliminaba cualquier pequeña cantidad de nitrito presente en la disolución, el cual absorbe también la luz ultravioleta en medio ácido.

Cuando se utilizó ácido ascórbico en algún experimento, hubo que eliminarlo antes de determinar el nitrato,

ya que el ácido ascórbico absorbe a 210 nm. Esta interferencia, se evitó según el método de Katoh (1.963) de eliminación de ácido ascórbico. Se añadió, a 1 ml de muestra, 0,3 ml de NaOH 1 N y a continuación se calentó al baño María a 80°C durante 10 min. Una vez enfriada la mezcla se empleó el método de Cawse para determinar nitrato.

### II.E.2.- Determinación de nitrito

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Illosway, según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1.949). A 1 ml de muestra conteniendo entre 0-30 nmoles de nitrito, se añadía 1 ml de una disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 N y 1 ml de una disolución de N(1-naftil)etilendiamina dichlorhidrato al 0,02% (p/v) en agua. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se determinaba espectrofotométricamente la concentración del complejo coloreado, utilizando un coeficiente de extinción a 540 nm  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mM}} = 55$ .

### II.E.3.- Determinación de $\gamma$ -glutamil-hidroxamato

El  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato se determinó por la reacción con  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido según Shapiro y Stadtman (1.970). A 1 ml de disolución conteniendo  $\gamma$ -glutamil-hidroxamato se añadían 2 ml del reactivo anterior, que incluía en 1 l de volúmen final: HCl al 37% (v/v), 7,73 ml; ácido

tricloroacético al 20% (v/v), 60,24 ml;  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 33,33 g. La concentración del producto formado se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm  $E_1^{1 \text{ mM}} = 3$ .

#### II.E.4.- Determinación de amonio

El ión amonio se determinó enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de este último, según Bermeyer (1.974). La mezcla de reacción contenía en un volúmen final de 1 ml: tris-tricina, pH 8 250  $\mu\text{moles}$ ;  $\alpha$ -cetoglutarato, 10  $\mu\text{moles}$ ; ADP, 1,2  $\mu\text{moles}$ ; NADPH, 0,2-0,25  $\mu\text{moles}$  y una alícuota de muestra conteniendo entre 0-80 nmoles de amonio. La reacción se iniciaba por adición de 20  $\mu\text{l}$  de una preparación de glutamato deshidrogenasa (7-10 U de enzima) y se desarrollaba durante 10 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción después de desarrollarse ésta, se determinaba espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 340 nm  $E_1^{1 \text{ mM}} = 6,2$ . Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido, se corregían con blancos a los que no se añadía amonio.

#### II.E.5.- Determinación de etileno

El etileno se determinó por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases PYE UNICAM 204, equipado con un detector de ionización de llama y una columna de Porapak Q mantenida a 50°C. La señal de salida era recogida por un registrador PHILIPS PM 8251 y el área de los picos se determinó mediante un integrador PYE UNICAM DP 88. El etileno producido se determinó por comparación con las áreas obtenidas con patrones conocidos de etileno.

#### II.E.6.- Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo de oxígeno HANSATECH, equipado con un registrador PHILIPS PM 8251, siguiendo las instrucciones dictadas por el constructor del aparato.

#### II.E.7.- Determinación de proteína

Para determinar proteína en células enteras, se precipitan previamente con ácido tricloroacético al 10% (v/v) y posteriormente se valora la cantidad de proteína en la muestra según el método de Lowry et al., (1.951), con las modificaciones de Bailey, (1.967).

## II.F.- TECNICAS EXPERIMENTALES

### II.F.1.- Centrifugaciones

Para realizar la recogida de células, se emplearon centrífugas refrigeradas SORVALL modelo RC-2B con rotores SE-12; SS-34 y GSA. Las centrifugaciones a menor velocidad se llevaron a cabo en una centrífuga HERAEUS modelo LABOFUGE.

### II.F.2.- Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron empleando espectrofotómetros BAUSCH-LOMB modelo Spectronic 100 ó PYE UNICAM SP 8-150 UV/VIS de doble haz.

### II.F.3.- Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinó con medidores de pH BECKMAN modelo Expandomatic SS 2 ó METHROM HERISAU modelo E-512, ambos provistos de escala expandida.

### II.F.4.- Establecimiento de condiciones anaerobias

Para la obtención de una atmósfera carente de oxígeno, necesaria para la realización de algunos experimentos, se utilizó un aparato MANIFOLD que permitía realizar ciclos sucesivos de evacuado de la atmósfera inicial y llenado con un gas carente de oxígeno (nitrógeno ó argon de alta

pureza) a un total de doce recipientes.

Las muestras, cuyo volúmen era siempre menor de la quinta parte del volúmen total del recipiente, se colocaban en tubos de ensayo de 10 ó 5 ml de capacidad, BECTON-DICKINSON, Vacutainer 4670 F con tapón de goma, ó en matraces Erlenmeyer de 20 ml de capacidad con tapones de goma de los que equipan los tubos B-D Vacutainer 4827.

Las transferencias de muestras de unos tubos a otros se realizaron mediante jeringas herméticas HAMILTON de la capacidad adecuada en cada caso.

## REACTIVOS:

ADP; L-glutamato deshidrogenasa (tipo II de hígado de vaca); MOPS; MSX;  $\text{NAD}^+$ ; tricina; DTE; ovoalbúmina; NADPH; NADH, eran productos de SIGMA CHEMICAL Co.

Metil viológeno y azaserina fueron suministrados por SERVA.

FCCP, de Boehringer.

DNP; DCCD; cianato, cianuro, ditionito y el resto de los productos utilizados procedían de MERCK.

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA. En el caso de usar agua desionizada, ésta se obtuvo por medio de un equipo desmineralizador SETA modelo R-100.

Los gases utilizados: nitrógeno, argón, acetileno y etileno, eran de alta pureza y fueron suministrados por la S.E.O.

### III. RESULTADOS

### III.A.- UTILIZACION DE NITRATO POR CELULAS DE *A. chroococcum*

Se ha puesto a punto un método para estimar la utilización de nitrato por células de *A. chroococcum*. El consumo de nitrato se valoró midiendo su desaparición del medio extracelular después de separar las células por filtración como se describe en el apartado II.B.1. de Materiales y Métodos. Suspensiones celulares preparadas como se describe en el apartado II.B. de Materiales y Métodos, provenientes de un cultivo con  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno y conteniendo de 0,3-0,4 mg de proteína celular por ml de tampón MOP-KOH, 50 mM, pH 7,5 al que se añadía 1 g/l de manitol, se incubaron a 27°C en un matraz Erlenmeyer abierto y sometido a agitación (70-100 oscilaciones por min). Al determinar el consumo de nitrato por las células, se observaron velocidades del orden de  $20-40 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , para una concentración inicial de nitrato de 0,3-0,5 mM como se presenta en la Fig.1. Como se demuestra en la Tabla I, esta velocidad de consumo varía con el tratamiento al que se somete a las células durante su recogida y las condiciones de lavado. Así, cuando las células son recogidas y lavadas a 4°C, la velocidad de consumo de nitrato es independiente de las adiciones realizadas al tampón de lavado; mientras que las células recogidas a 27°C y preincubadas en el tampón de lavado durante 30 min, antes de resuspender en el tampón de ensayo y añadir el nitrato para determinar su desaparición

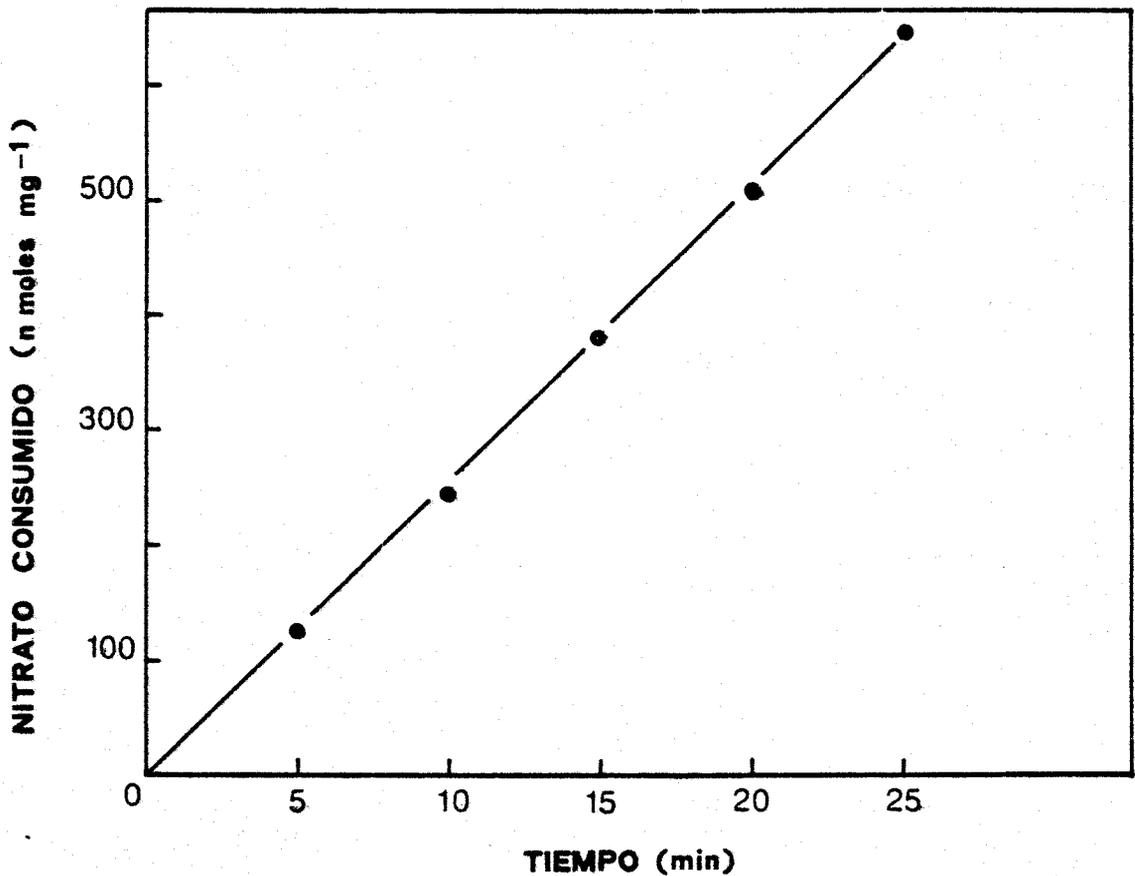


Fig.1.- *Utilización de nitrato por células de A. chroococcum.* Células procedentes de un cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno, fueron recolectadas por centrifugación cuando la  $A_{560 \text{ nm}}$ , era de 0,5; se lavaron dos veces con tampón MOPS-KOH, 25 mM a pH 7,5 suplementado con manitol a una concentración final de 1 g/l, siguiéndose entonces la desaparición de nitrato como se indica en Materiales y Métodos.

Tabla I. Efecto de diversas condiciones de recogida y lavado de las células sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

Adición	Nitrato consumido ( nmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	
	4°C	27°C
Ninguna	53	56
Manitol	49	47
KNO <sub>3</sub>	53	38
Manitol + KNO <sub>3</sub>	50	9

Células provenientes de un cultivo con nitrato, que habían sido recogidas como se especifica en Materiales y Métodos a las temperaturas señaladas, se lavaron con tampón MOPS-KOH 25 mM, pH 7,5, conteniendo, donde se indica, 1 g/l de manitol y/o 0,5 mM de KNO<sub>3</sub>, resuspendiéndose entonces en el tampón de ensayo las recogidas y lavadas a 4°C. Las suspensiones que fueron manipuladas a 27°C, se preincubaron durante 30 min con agitación en el tampón de lavado antes de centrifugar y resuspender en la solución de ensayo. El nitrato consumido se determinó a los 10 min de iniciado el ensayo. Las suspensiones celulares contenían 0,4 mg de proteína por ml de tampón.

del medio, presentaban una velocidad de consumo mucho mayor cuando no fueron sometidas a ningún tratamiento durante su lavado; esto demuestra que las células que presentan mayor deficiencia en nitrato, consumen éste más eficientemente que aquellas que han estado en presencia de nitrato y manitol; éste último, como se señala más adelante, se requiere para que tenga lugar consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*.

La Tabla II muestra que la velocidad de consumo de nitrato no se alteraba significativamente cuando las células fueron recogidas en fase exponencial, deceleración ó estacionaria de crecimiento. La fase de crecimiento establecida en las condiciones estándar del sistema de ensayo de consumo de nitrato está situada hacia la mitad de la exponencial, con una  $A_{560nm}$  de 0,5 a 0,6.

### III.A.1.- Dependencia del consumo de nitrato de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo

Al cultivar las células en medio en el que el nitrato era sustituido por aire ó amonio como fuente de nitrógeno y transferidas posteriormente, una vez lavadas, a tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5, con manitol al que se añadía nitrato, se pudo observar que, tras incubarlas en las condiciones experimentales descritas en el apartado II.B.1. para el ensayo estándar de consumo de nitrato, no había

Tabla II. Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* recogidas en distintas fases de crecimiento

Fase de crecimiento	$A_{560 \text{ nm}}$	Nitrato consumido (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Exponencial temprana	0,299	28
Exponencial mitad	0,550	30
Exponencial final	0,956	26
Deceleración	1,400	27
Estacionaria	2,216	38

Las condiciones experimentales fueron las descritas para la Fig. 1, excepto que las células se recogieron a las densidades ( $A_{560 \text{ nm}}$ ) que se indican.

consumo apreciable de nitrato en los primeros 15-20 min, como se presenta en la Fig.2, donde además, podemos observar que después de transcurrido ese tiempo, se ponía de manifiesto la utilización de nitrato por las células. Por el contrario, las células procedentes de medios con nitrato exhibían un consumo de este ión que era lineal desde el comienzo del ensayo, como ya se describió en la Fig.1.

Cuando se midió la actividad nitrato reductasa, *in situ*, al comienzo y al final del experimento, se pudo comprobar que dicha actividad varía dependiendo de la fuente de nitrógeno utilizada para su crecimiento. Así, la Tabla III, demuestra que las células cultivadas en  $\text{KNO}_3$ , presentan una actividad nitrato reductasa inicial de  $47 \text{ mU mg}^{-1}$  de proteína, mientras que las procedentes de medios conteniendo aire ó amonio como única fuente de nitrógeno, sólo presentan niveles basales de actividad nitrato reductasa inicial. Sin embargo, cuando habían transcurrido los 65 min de duración del experimento, los niveles de nitrato reductasa habían aumentado considerablemente como se presenta también en la Tabla III. Aunque no se muestra, los niveles de actividad nitrito reductasa, la otra enzima del sistema reductor de nitrato, eran también bajos en las células cultivadas en ausencia de nitrógeno combinado y en las de medios con amonio como fuente de nitrógeno. Estos niveles se incrementaron concomitantemente con los señalados de nitrato reductasa.

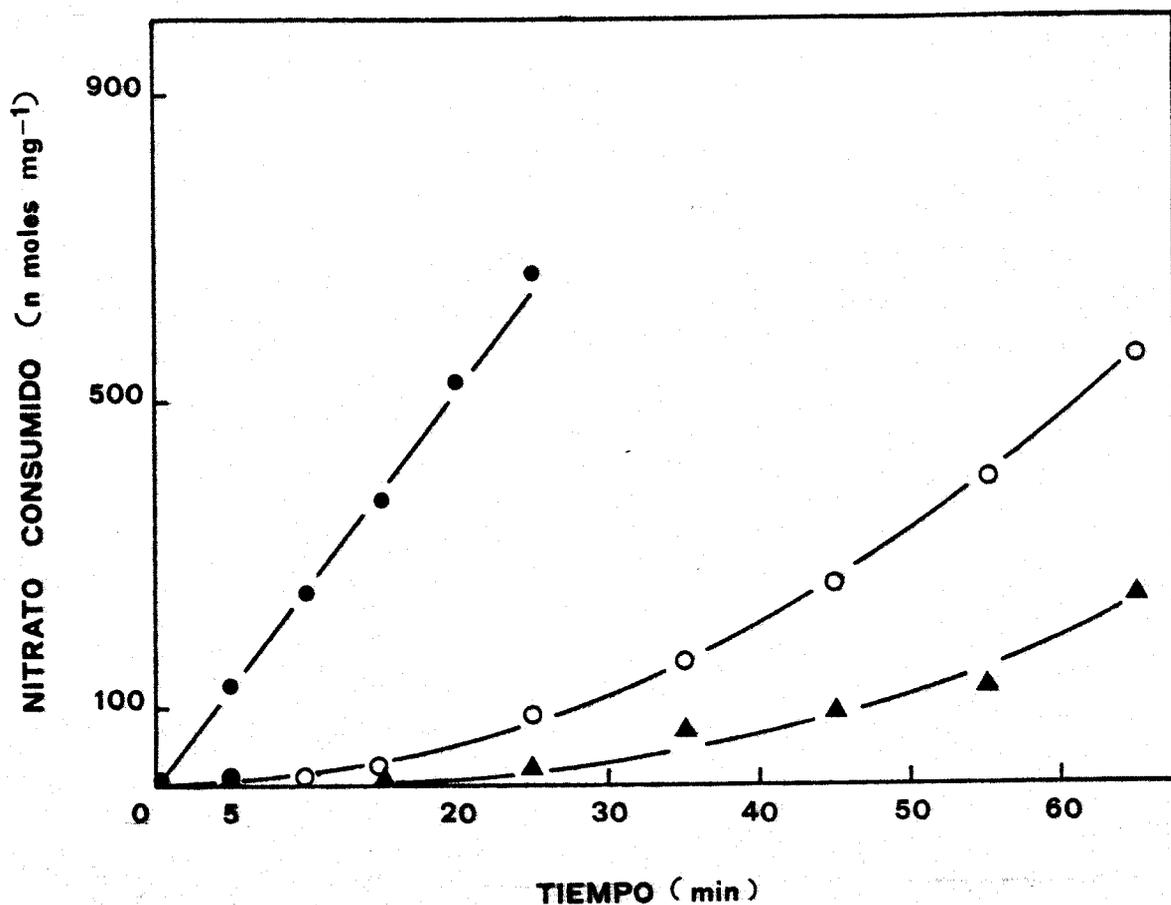


Fig.2.- Utilización de nitrato por células de *A. chroococcum* cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. Tres suspensiones celulares de *A. chroococcum* en medios de cultivo de nitrato (●-●); amonio (○-○) y sin fuente de nitrógeno combinado (▲-▲) se recogieron, lavaron y resuspendieron en las condiciones descritas en la Fig.1. Se añadió  $\text{KNO}_3$  en el tampón de ensayo y se determinó a los tiempos indicados su desaparición del medio.

Tabla III. Niveles de actividad nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno y después incubadas con nitrato

Fuente de nitrógeno	Actividad nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	
	Inicial	65 min de incubación
KNO <sub>3</sub>	47	37
Aire	0,25	8,7
NH <sub>4</sub> Ac.	2,1	11,6

Los niveles de actividad nitrato reductasa se determinaron en las mismas células empleadas en el experimento de la Fig. 2, a los tiempos inicial y después de 65 min de incubación en presencia de nitrato. Las células se permeabilizaron tratándolas con detergente como se indica en Materiales y Métodos, apartado II.C.2.

### III.A.2.- Caracterización de la utilización de nitrato por *A. chroococcum*.

Dado que se conoce que la entrada de nitrato al interior celular en organismos tales como algas (Eisele y Ullrich, 1.977; Ullrich, 1.983); hongos (Schloemer y Garrett, 1.974); cianobacterias (Flores et al., 1.982) y algunas bacterias quimiotróficas estudiadas (Thayer y Huffaker, 1.982), es un proceso que se lleva a cabo mediante un sistema de transporte activo, era interesante elucidar si el nitrato entra en las células de *A. chroococcum* por simple difusión a través de la membrana plasmática ó por el contrario, como en los organismos citados anteriormente, transportado del exterior al interior celular mediante un transporte activo, dependiente de energía.

Las investigaciones realizadas a este respecto incluyen el estudio del efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre la velocidad del proceso y la influencia que ejercen diversos inhibidores del metabolismo energético sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

#### III.A.2.1.- Efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre su consumo por *A. chroococcum*.

La Tabla IV presenta la velocidad de consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*, frente a concentracio-

Tabla IV. Efecto de la concentración extracelular de nitrato sobre el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*.

Concentración extracelular de nitrato, ( mM ).	Nitrato consumido (nmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
0,1	21
0,3	20,8
0,5	20,8
0,7	21
1,0	14

Las condiciones experimentales fueron las descritas para la Fig.1, excepto que el ensayo se inició con las concentraciones indicadas en cada caso. El nitrato consumido se midió a los 5 min de iniciarse el ensayo.

nes iniciales de 0,1 a 1,0 mM de nitrato. Se pudo demostrar que frente a concentraciones iniciales de nitrato comprendidas entre 0,1 y 0,8 mM, la velocidad de consumo permanece constante. Concentraciones superiores a 0,8 mM, presentan dificultades para ser determinadas, ya que hay que hacer diluciones que pueden introducir errores en las medidas. Por otro lado, concentraciones inferiores a 0,1 mM, medidas por el método de Cawse, son poco fiables; por ello, para estudiar hasta qué concentración por debajo de 0,1 mM permanecía constante la velocidad de consumo de nitrato, se siguió la desaparición, a tiempos cortos, de una concentración inicial de nitrato de 0,1 mM. La Fig.3 muestra que la velocidad permanece constante hasta una concentración de nitrato de al menos 42  $\mu$ M. Estos resultados parecen indicar que la entrada de nitrato al interior de las células de *A. chroococcum* no es por difusión, ya que, si así fuera, la velocidad de consumo de nitrato sería mayor al aumentar la concentración extracelular de nitrato. Esto sugiere que en la entrada de nitrato en *A. chroococcum* interviene una permeasa con una  $K_m$  para el nitrato inferior a 42  $\mu$ M.

Dado que la  $K_m$  para el nitrato de la nitrato reductasa, primera enzima implicada en el metabolismo intracelular del nitrato, tiene un valor de 0,25 mM en condiciones óptimas de ensayo (Guerrero et al., 1.973) y que la veloci-

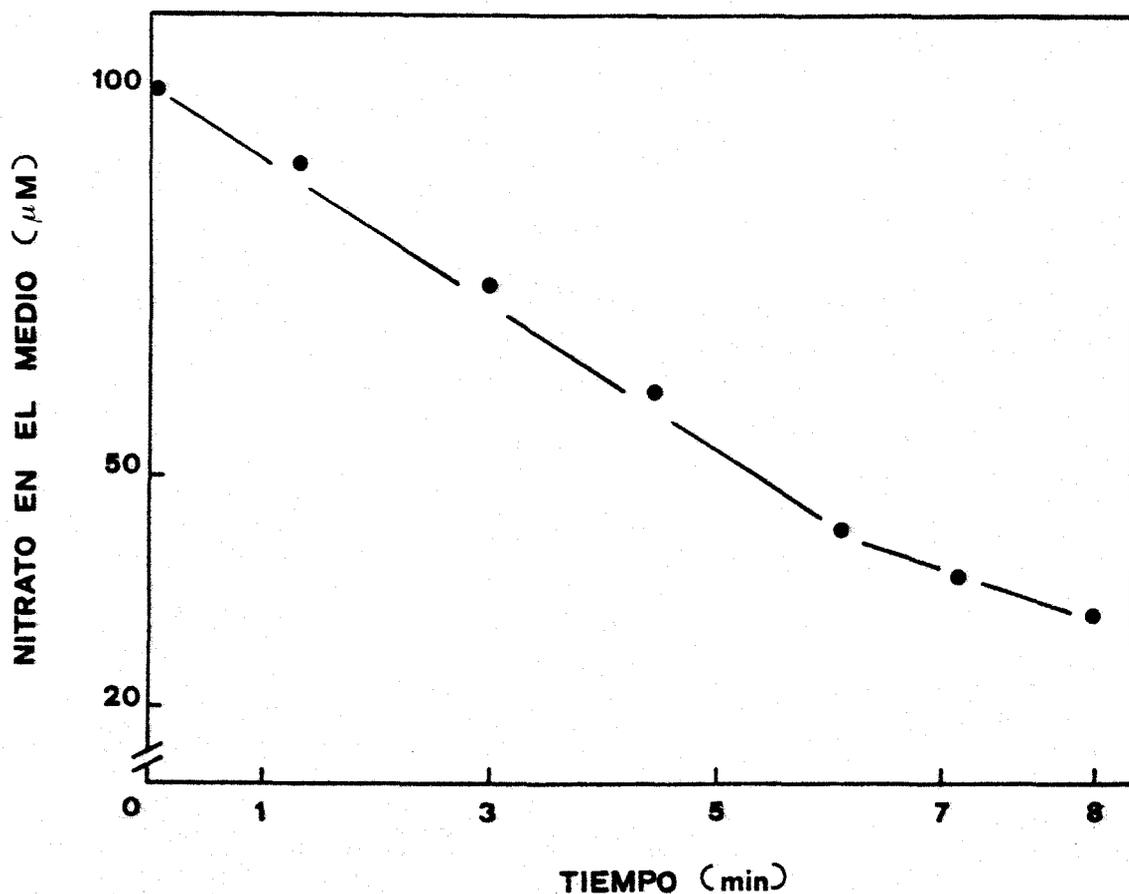


Fig.3.- *Cinética de consumo de nitrato por A. chroococcum.* Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig.1, excepto que la concentración inicial de nitrato era de 0,1 mM. La concentración de proteína en la suspensión era de 0,4 mg de proteína por ml de tampón de ensayo.

dad de consumo de nitrato se satura a una concentración igual ó inferior a 42  $\mu\text{M}$ , parece señalar que la permeasa que participa en la asimilación de nitrato es una molécula con mayor afinidad por el nitrato que la nitrato reductasa.

III.A.2.2.- Requerimiento de una fuente de carbono y aerobiosis para la utilización de nitrato por *A. chroococcum*.

Para estudiar si el transporte de nitrato en *A. chroococcum* era dependiente de energía metabólica, medimos el consumo de nitrato en suspensiones celulares en las condiciones de ensayo estándar para el consumo de nitrato, excepto que no se añadió manitol. La Fig.4 muestra que, en ausencia de la fuente de carbono, las células no consumen nitrato. En la Fig.5 observamos que tampoco hay consumo de nitrato cuando el ensayo se lleva a cabo en presencia de una fuente de carbono y en condiciones anaeróbicas. Esto sugiere que para que las células puedan asimilar nitrato, deben disponer de una fuente de carbono y poder utilizarla para obtener energía metabólica.

De acuerdo con la conclusión que se acaba de deducir, la Tabla V demuestra que las células de *A. chroococcum* cultivadas en una fuente de carbono determinada, consumen nitrato más eficientemente cuando la fuente de carbono presente en el ensayo de consumo de nitrato es la misma que

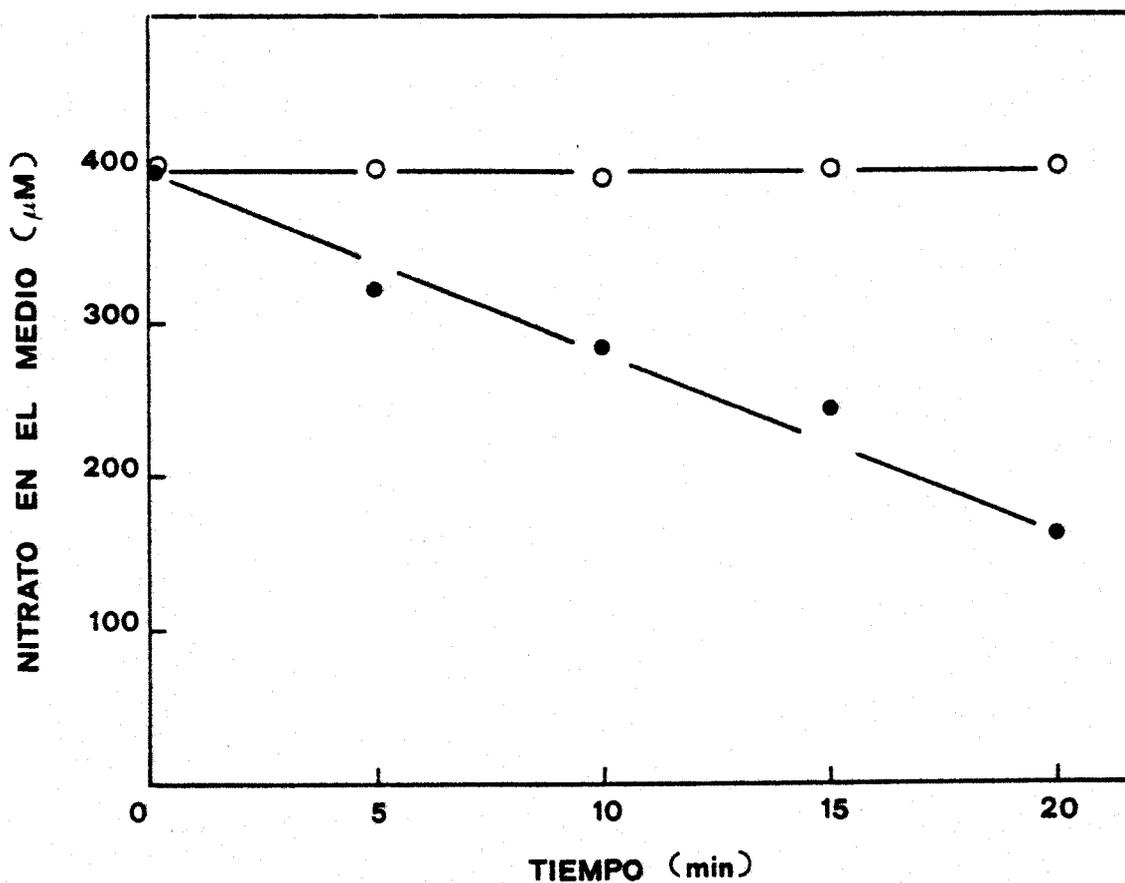


Fig.4.- Efecto de la fuente de carbono sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Una suspensión celular de *A. chroococcum*, conteniendo 0,4 mg de proteína por ml, se incubó en presencia (●-●) y en ausencia (O-O) de manitol en las condiciones estándar del sistema de ensayo de consumo de nitrato. A los tiempos indicados se analizó el nitrato del medio como se indica en Materiales y Métodos.

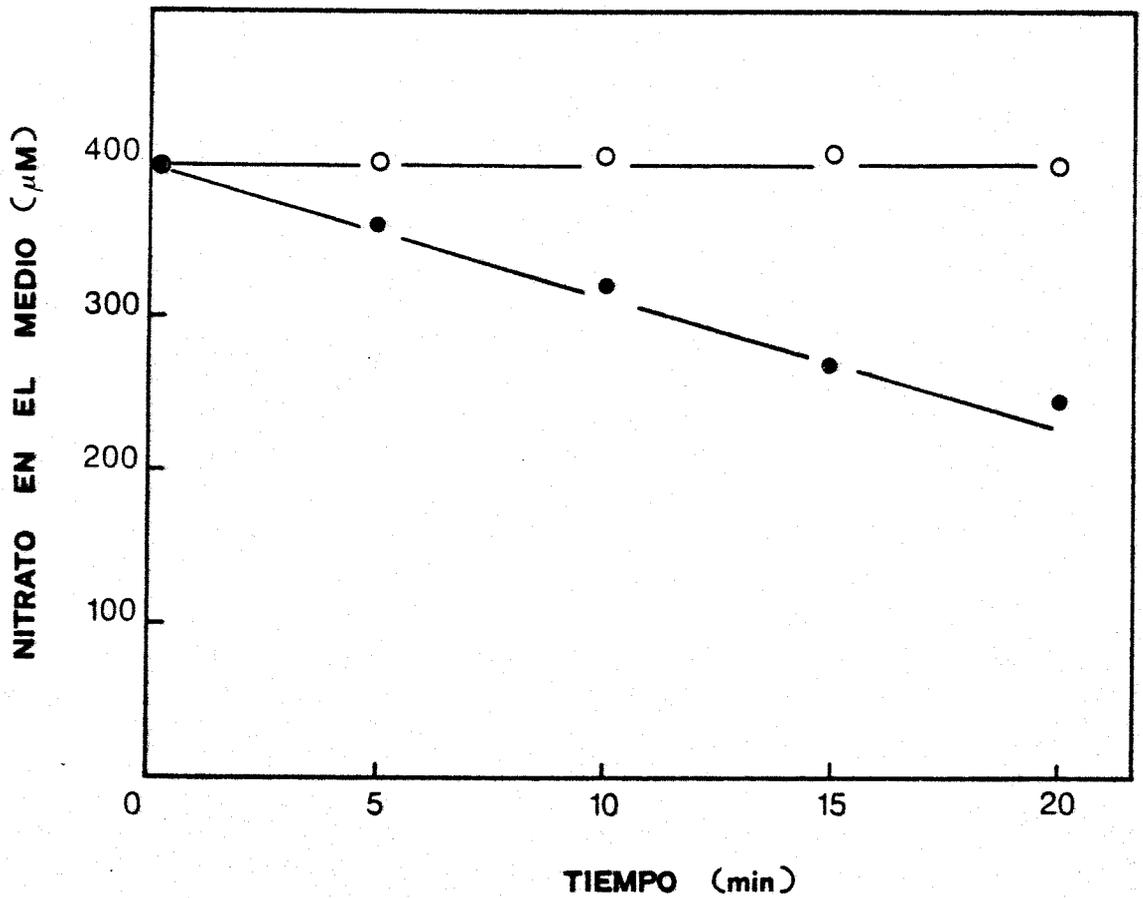


Fig.5.- Efecto de la anaerobiosis sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Se midió el consumo de nitrato en suspensiones celulares conteniendo 0,3 mg de proteína por ml de tampón de ensayo: en aire (●-●) y en anaerobiosis (○-○).

Tabla V. Efecto de la fuente de carbono utilizada durante el crecimiento sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

Fuente de carbono en el ensayo	Fuente de carbono en el medio de cultivo					
	Manitol	Glucosa	Succinato	Piruvato	Etanol	Acetato
	( % de velocidad de consumo de nitrato )					
Manitol	100	—	—	—	—	—
Glucosa	182	278	—	—	—	—
Succinato	0	—	77	—	—	—
Piruvato	18	—	—	42	—	—
Etanol	0	—	—	—	53	—
Acetato	0	—	—	—	—	50

Las suspensiones celulares fueron inoculadas en medios conteniendo las fuentes de carbono que se indican a las siguientes concentraciones: manitol, 5 g/l; glucosa, 5 g/l; succinato, 5 g/l; piruvato, 10 g/l; etanol, 10 g/l y acetato, 10 g/l. Cuando las densidades celulares ( $A_{560\text{nm}}$ ) eran de aproximadamente 0,5, las células se recogieron por centrifugación y lavaron en las condiciones descritas para el estudio del consumo de nitrato. Se resuspendieron a continuación en MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5 en presencia de la fuente de carbono indicada en cada caso a una concentración igual a 1/5 de la utilizada en el cultivo celular. Las células se incubaron durante 10 min antes de añadir nitrato. El 100% de la velocidad corresponde a una utilización de nitrato de 29 nmoles  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Las rayas ( — ) indican que no se midió el consumo de nitrato en esas condiciones.

la utilizada para su crecimiento. En esta tabla se puede observar que la glucosa superaba con creces a los restantes compuestos, siendo particularmente alto el consumo de nitrato cuando las células fueron cultivadas y ensayadas en su presencia. Puesto que está descrito que *A. chroococcum* no utiliza arabitol como fuente de carbono (Thompson y Skerman, 1.979), cuando se crecieron las células en manitol y se resuspendieron con arabitol como fuente de carbono en el tampón de ensayo, no se observó consumo de nitrato por dichas células (dato no presentado).

Al medir los niveles de actividad nitrato reductasa en aquellas células que fueron crecidas en medio con manitol y que se resuspendieron en tampón con otras fuentes de carbono en sustitución de manitol, no se observaron variaciones significativas en los niveles de actividad de la nitrato reductasa, como indica la Tabla VI. Este experimento muestra que el menor consumo de nitrato en estas células no era debido a un descenso en los niveles de actividad nitrato reductasa. Los niveles de actividad nitrito reductasa tampoco variaron significativamente (no mostrado). Los anteriores resultados sugieren que al ser transferidas las células de un medio con una fuente de carbono determinada a otro con una fuente de carbono distinta, las células no pueden utilizar este nuevo compuesto de manera inmediata, quizás porque necesiten inducir alguna permeasa que inter-

Tabla VI. Niveles de actividad nitrato reductasa en *A. chroococcum* en presencia de distintas fuentes de carbono

Fuente de carbono en el ensayo de consumo de nitrato	Actividad nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )
Manitol	36
Glucosa	29
Succinato	36
Piruvato	41
Etanol	28
Acetato	32

Las actividades nitrato reductasa se determinaron toluenizando alícuotas de las suspensiones celulares provenientes de un cultivo con manitol como fuente de carbono que se habían utilizado para el estudio de consumo de nitrato durante 15 min en presencia de las distintas fuentes de carbono indicadas, como se especifica en la Tabla V.

venga en el transporte de estos sustratos, ó alguna(s) enzima(s) requerida(s) para su metabolización. Al no poder utilizar dichos sustratos, no pueden obtener la energía metabólica requerida para el consumo de nitrato.

### III.A.2.3.- Requerimiento de energía metabólica para la utilización de nitrato por *A. chroococcum*.

Los resultados del apartado III.A.2.2., indican que el transporte de nitrato por *A. chroococcum*, es un sistema que requiere energía metabólica. Para caracterizar esta dependencia de energía metabólica, hemos utilizado diversos inhibidores metabólicos como FCCP y DNP que actúan como agentes desacoplantes (Padan et al., 1.976) y DCCD, que es un inhibidor irreversible de ATPasas (Harold et al., 1.969). La Fig.6 presenta el efecto de estos inhibidores sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum* y podemos observar que, tanto el FCCP como el DNP, ejercen una inhibición inmediata y total sobre el consumo de nitrato, mientras que el DCCD solo produce un ligero descenso en la velocidad de consumo de nitrato. Para determinar si el efecto del FCCP y del DNP sobre el consumo se debía a una disminución de la capacidad reductora de nitrato, ya que el método utilizado, que mide la desaparición del ión del medio, no permite distinguir entre la entrada de nitrato y su posterior reducción, se estudió el efecto de estos inhibidores sobre

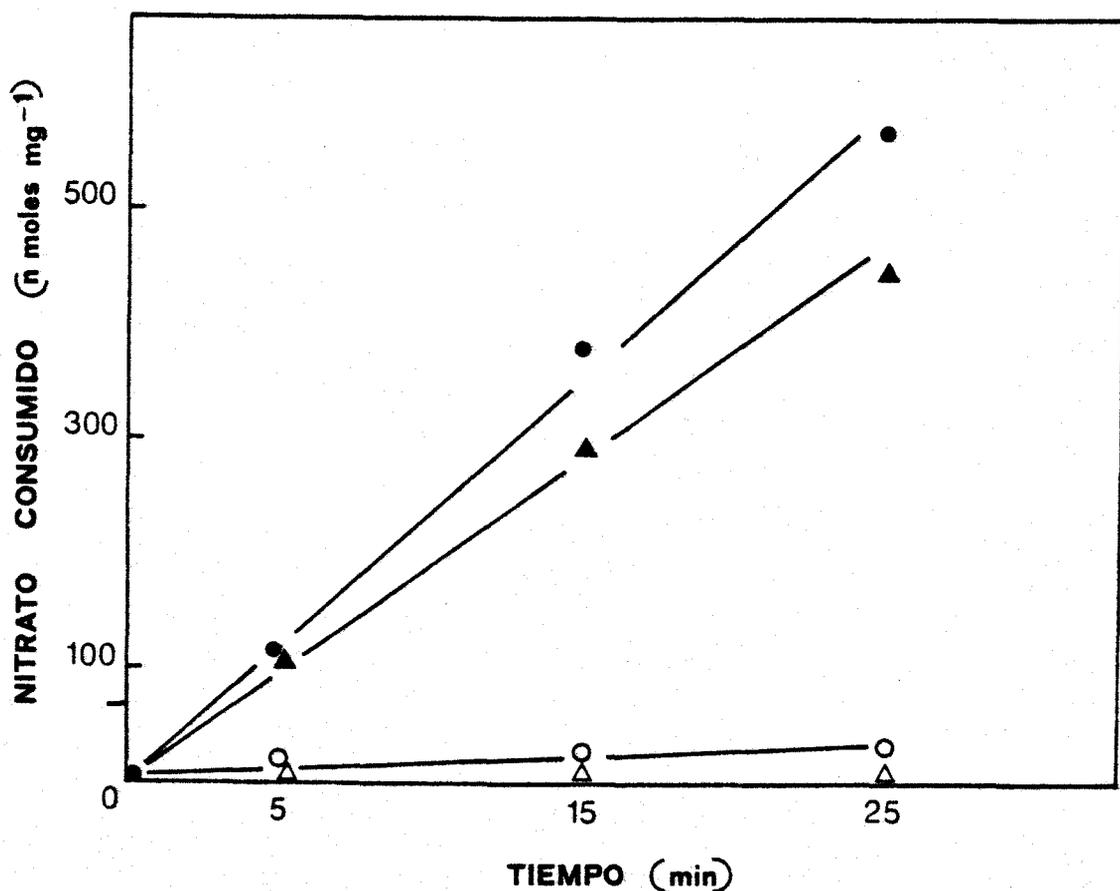


Fig.6.- Efecto de inhibidores de la transducción de energía sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig.1, excepto que, donde se indica se añadió: 25  $\mu$ M FCCP (○-○); 1 mM DNP ( $\Delta$ - $\Delta$ ) y 100  $\mu$ M DCCD ( $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ ), todos ellos disueltos en etanol; (●-●) fue suplementado con etanol en una proporción análoga a la utilizada en los ensayos con inhibidores. Antes de añadir el nitrato, las suspensiones celulares se incubaron durante 10 min en agitación a 27°C.

la actividad nitrato reductasa. Como se muestra en la Tabla VII, los niveles celulares de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa, determinados *in situ*, no son significativamente afectados por el FCCP y el DCCD. Estos resultados sugieren que el consumo de nitrato por *A. chroococcum* es un proceso relacionado con el metabolismo energético de las células, aunque no mediado necesariamente por ATP. La posible argumentación de que la falta de efecto inhibitor por parte del DCCD podría ser debido a que éste no pudiese unirse a la ATPasa para ejercer su efecto, se pudo descartar cuando se investigó el efecto del DCCD sobre la actividad nitrogenasa que, como es sabido, requiere ATP. El ensayo de la actividad nitrogenasa se realizó como se describe en Materiales y Métodos, excepto que, antes de añadir la fuente de carbono se incubó la preparación durante 10 min en presencia de 100  $\mu$ M de DCCD, para evitar la formación de ATP que podría ser utilizado posteriormente por la propia nitrogenasa (Mortenson, 1979). A continuación, se añadió manitol y se procedió a ensayar la actividad nitrogenasa. En la Fig. 7, se muestra que dicha actividad estaba inhibida en presencia de DCCD, esto indica que el DCCD se une a la ATPasa inhibiéndola, pero no afectando al consumo de nitrato.

Tabla VII. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en presencia de distintos inhibidores metabólicos en células de *A. chroococcum*

Adición	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )		Nitrito reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	
	0 min	25 min	0 min	25 min
Ninguna	33	32	51	44
FCCP	28	31	61	40
DCCD	40	50	60	44

Las actividades específicas indicadas, se determinaron en las mismas suspensiones celulares empleadas en el experimento recogido en la Fig. 6, a los tiempos inicial y tras 25 min de incubación en presencia de los inhibidores a las concentraciones que se especifican en la leyenda de la citada figura. Las células se recogieron, lavaron y permeabilizaron con tolueno como se describe en Materiales y Métodos.

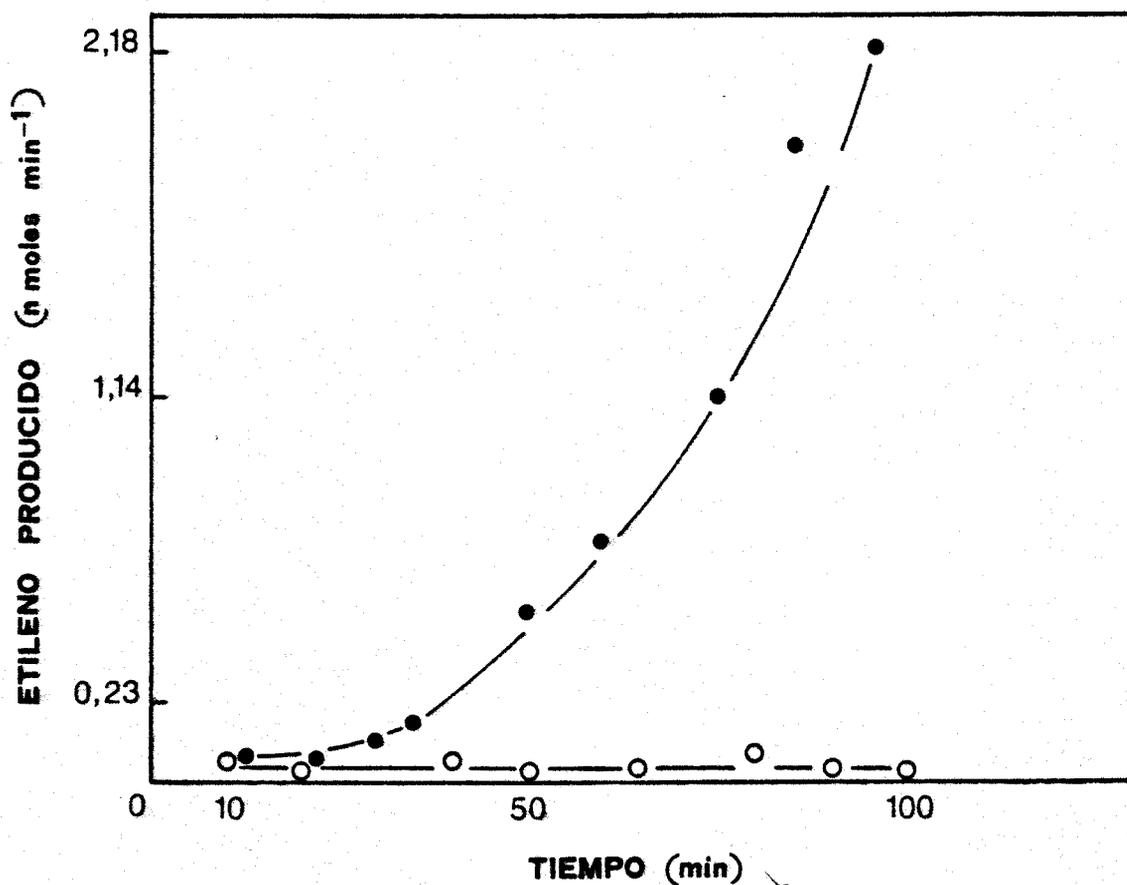


Fig.7.- Efecto del DCCD sobre la actividad nitrogenasa ( reducción de acetileno ) en *A. chroococcum*. Una suspensión celular de *A. chroococcum* proveniente de un cultivo con aire como única fuente de nitrógeno, preparada como se señala en el apartado II.B. de Materiales y Métodos, fue incubada en ausencia (O-O) y presencia (●-●) de 100  $\mu$ M de DCCD durante 10 min antes de añadir la fuente de carbono al tampón de ensayo. La actividad nitrogenasa se midió como se indica en el apartado II.D.4. de Materiales y Métodos.

III.A.2.4.- Efecto de un sistema donador artificial de electrones sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

Estudiamos el consumo de nitrato en suspensiones celulares de *A. chroococcum* carentes de fuente de carbono pero a los que se añadía un par donador artificial de electrones capaz de ceder estos a la cadena respiratoria permitiendo que haya consumo de oxígeno (respiración). Utilizando como sistema donador artificial el par ascorbato/PMS cuya capacidad para ceder electrones a la cadena respiratoria y crear un estado energizado de la membrana citoplásmica de *Escherichia coli* era conocida (Wilson, 1.974), comprobamos, que en presencia del citado par y ausencia de fuente de carbono, las células de *A. chroococcum* podían consumir oxígeno como se muestra en la Tabla VIII. A la vista de ello, estudiamos a continuación el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* con el par ascorbato/PMS como única fuente de energía. La Fig.8 demuestra que suspensiones celulares de *A. chroococcum*, con capacidad para ello, pueden consumir nitrato utilizando como única fuente de energía la generada en la cadena respiratoria por el par ascorbato/PMS. Aunque no se presenta en la Fig.8, el consumo de nitrato era estrictamente dependiente de la presencia de la suspensión celular. Para la realización de este experimento, es imprescindible tener en cuenta la in-

Tabla VIII. Consumo de oxígeno por células de *A. chroococum*.

Fuente de energía	Consumo de oxígeno (nmoles ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Ninguna	0
Manitol	336
Ascorbato	0
PMS	0
Ascorbato/PMS	168
Ascorbato/PMS en ausencia de células	88

El consumo de oxígeno se midió mediante un electrodo de oxígeno como se describe en Materiales y Métodos, en suspensiones celulares en las condiciones del sistema de ensayo de consumo de nitrato; las suspensiones contenían 0,3 mg de proteína celular por ml de tampón y fueron incubadas en agitación y oscuridad durante 10 min; donde se indica, se añadió: 1 g/l de manitol; 10 mM de ascorbato y 25  $\mu$ M de PMS.

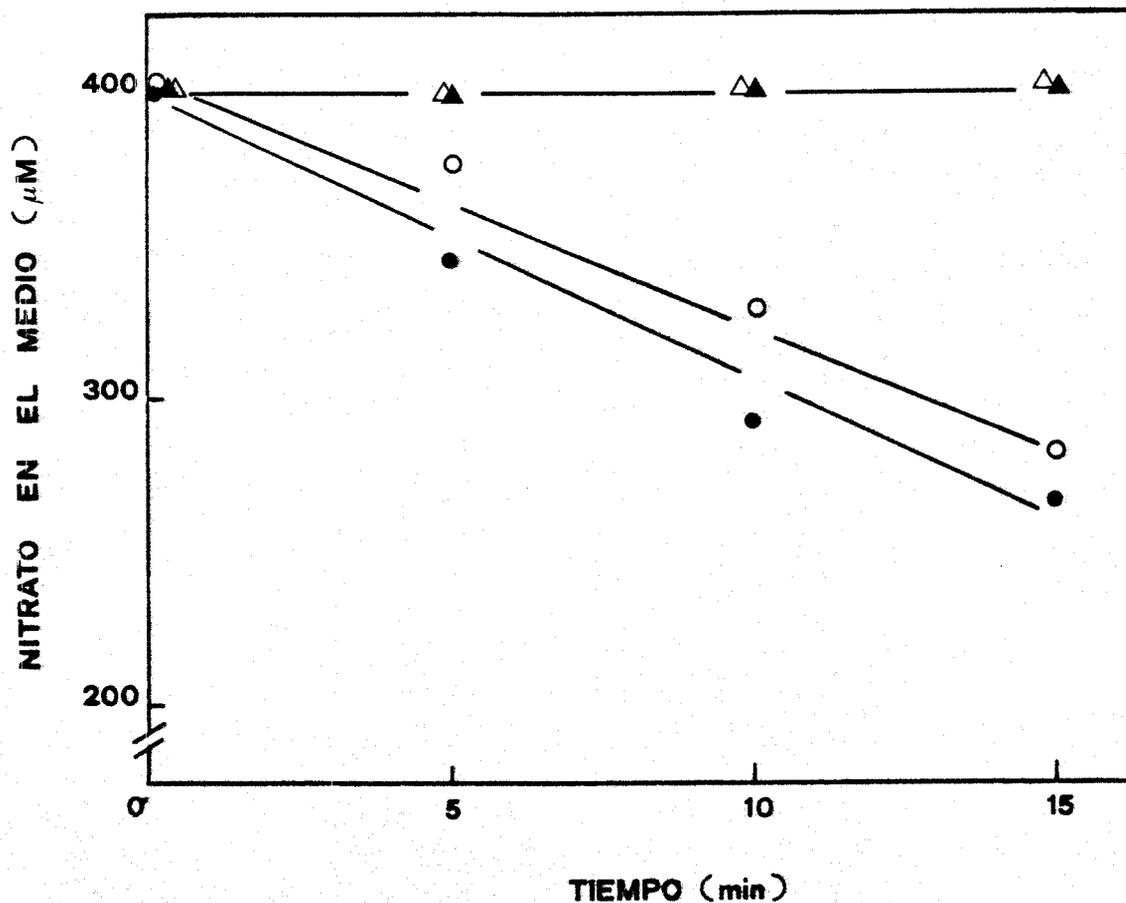


Fig.8.- Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en presencia del par donador ascorbato/PMS. Una suspensión celular de *A. chroococcum* proveniente de un cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno fue recogida, lavada y re-suspendida en las condiciones del sistema estandar de consumo de nitrato; dicha suspensión, contenía 0,4 mg de proteína por ml de tampón. Donde se indica se añadió 1 g/l de manitol (●—●); 10 mM de ascorbato (Δ—Δ); 25 µM de PMS (▲—▲) ascorbato/PMS a las concentraciones señaladas (O—O).

terferencia del ascorbato en la medida de la desaparición de nitrato, que se eliminó como se describe en Materiales y Métodos. Para confirmar que el consumo de nitrato observado en presencia del par ascorbato/PMS era posible gracias a la energía originada por dicho par, se estudió el consumo de nitrato con el par donador artificial en presencia del desacoplante FCCP, en otro caso, sometiendo la suspensión de ensayo a anaerobiosis. En ninguno de los dos experimentos pudimos observar consumo de nitrato (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que basta con la creación de una fuerza proton motriz generada en este caso de forma artificial con el par ascorbato/PMS, para que tenga lugar el consumo de nitrato, no requiriéndose en estas condiciones la presencia de esqueletos carbonados en el medio, al menos en los tiempos ensayados por nosotros.

#### II.A.2.5.- Efecto del pH sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

En la Fig.9, se presenta el efecto del pH del tampón de ensayo sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Como se observa en la figura citada, el proceso tiene un pH óptimo a pH 6,5. Las células de *A. chroococcum* se cultivaron en medio de cultivo a pH 7,5, que es el pH óptimo de crecimiento para dichas células. A pesar de ser 6,5 el pH óptimo para el consumo de nitrato, utilizamos para el

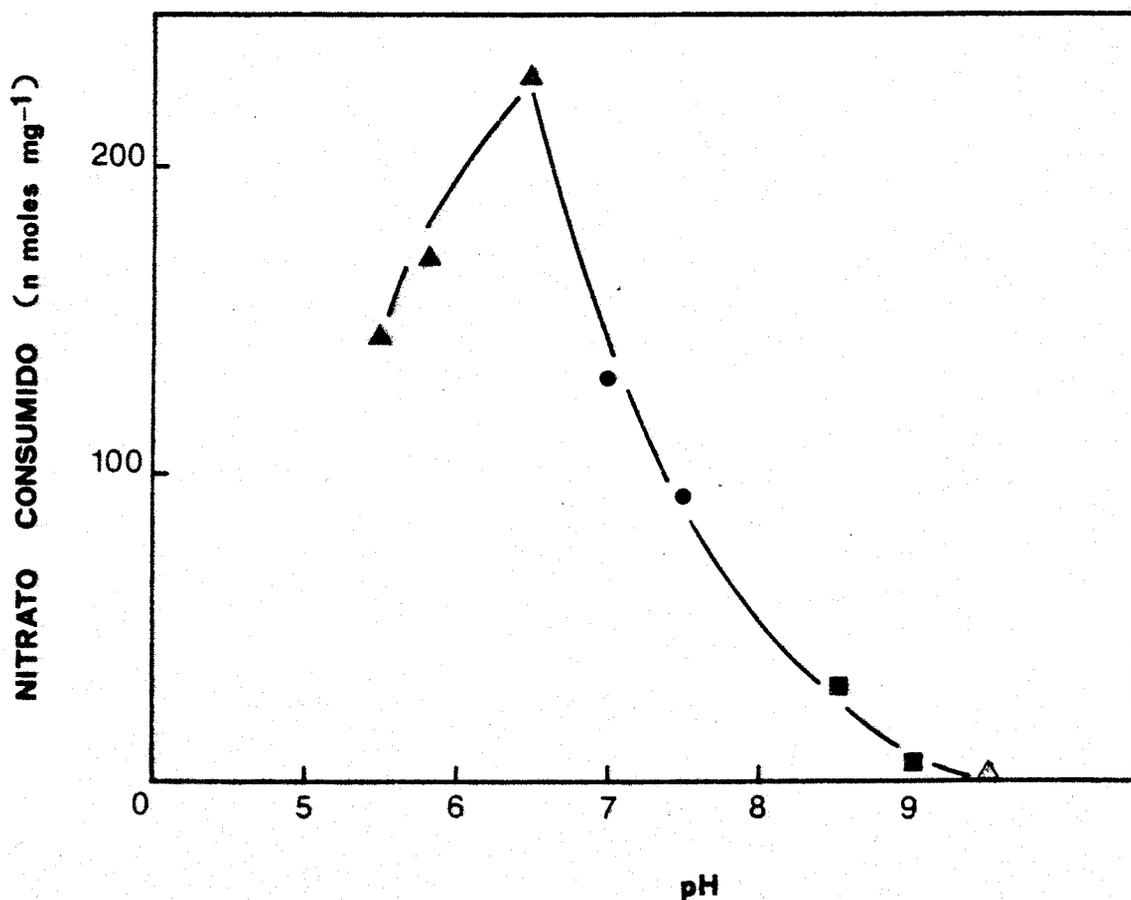


Fig.9.- Efecto del pH del tampón de ensayo sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo estándar a pH 7,5, con nitrato como fuente de nitrógeno y tras su recogida y lavado se resuspendieron en solución 50 mM de tampón MES (▲-▲); MOPS (●-●); Tricina (■-■) y  $\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_3^{-}$  (△-△), ajustados a los pH indicados con NaOH, excepto en el caso del  $\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_3^{-}$ . Las suspensiones celulares contenían 0,3 mg de proteína por ml. La determinación de nitrato se realizó a los 10 min de ensayo.

ensayo estándar de consumo de dicho ión tampón a pH 7,5, con objeto de mantener, en lo posible, las condiciones de cultivo.

### III.B.- REGULACION DE LA UTILIZACION DE NITRATO POR

#### *A. chroococcum.*

En este apartado hemos estudiado el efecto del ión amonio y de diversos inhibidores de su asimilación sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Por otra parte, también hemos estudiado el consumo de nitrato en presencia de diversos análogos de nitrato y de otras fuentes fijadas de nitrógeno.

#### III.B.1.- Efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*

La presencia de amonio en el sistema de ensayo de consumo de nitrato impide que el proceso pueda tener lugar, como muestra la Fig.10. En conexión con ello, la adición de amonio a una suspensión de células de *A. chroococcum* consumiendo nitrato, provoca una drástica inhibición del consumo de éste, como se observa en la Fig.11. Por otro lado, en esta misma figura se presenta que la inhibición es reversible ya que el consumo de nitrato se restablece cuando no queda amonio en el medio en cantidad detectable. Cuando se midieron los niveles de actividad enzimática del sistema reductor de nitrato para determinar si eran afectadas por el amonio, se pudo observar que este catión no afectaba significativamente los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa, al menos en los tiempos in-

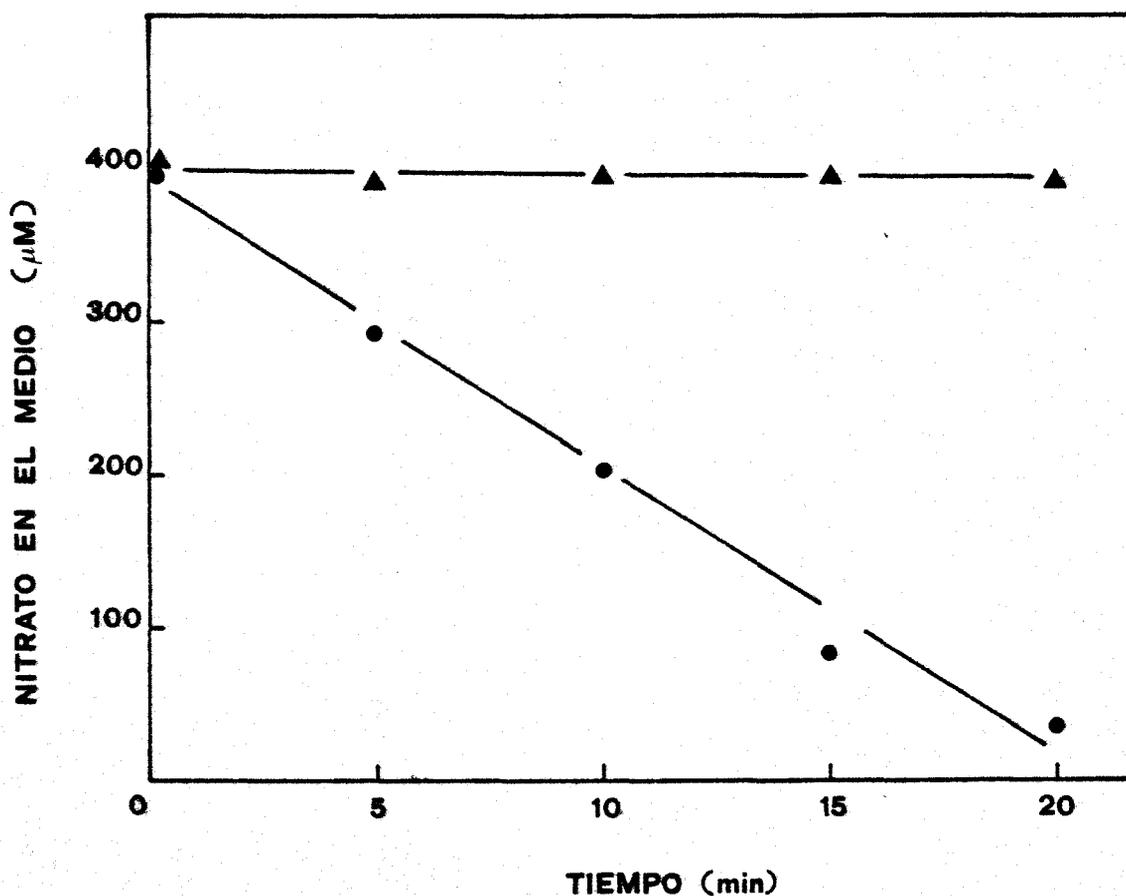


Fig.10.- *Inhibición del consumo de nitrato por el ión amonio.* Las condiciones experimentales fueron las descritas para el sistema estándar de consumo de nitrato, excepto que, donde se indica, se añadió 0,5 mM de NH<sub>4</sub>Cl (▲-▲). Las suspensiones contenían 0,3 mg de proteína celular por ml de tampón de ensayo. Los círculos negros representan al control en ausencia de amonio.

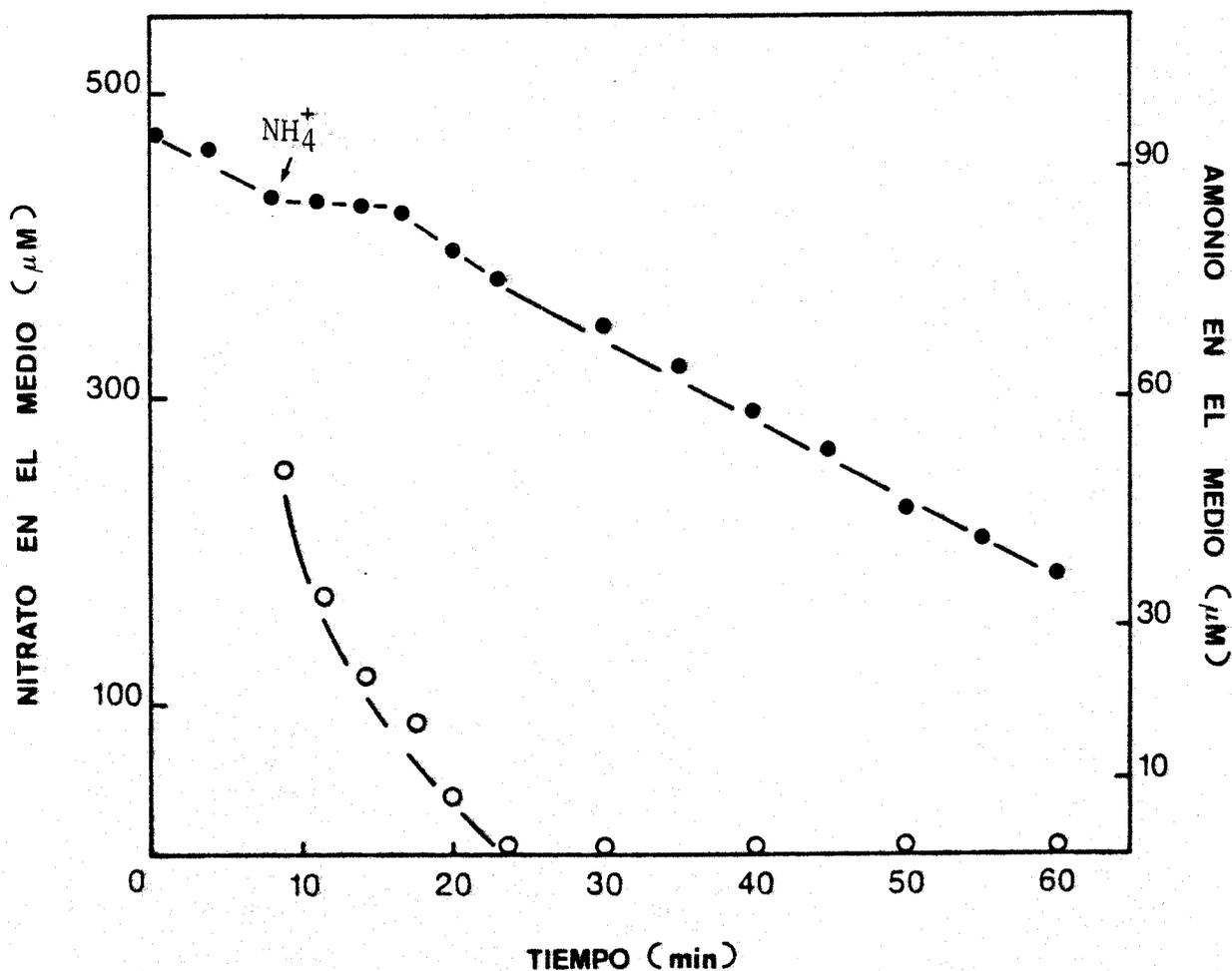


Fig.11.- Reversibilidad de la inhibición por amonio del consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*. El experimento se realizó con una suspensión celular conteniendo 0,3 mg de proteína por ml de tampón de ensayo y se inició por adición de  $\text{KNO}_3$ . En el momento señalado por la flecha se añadió  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  siguiéndose la desaparición de nitrato (●-●) y amonio (O-O), como se describe en Materiales y Métodos.

dicados, como se muestra en la Tabla IX.

III.B.2.- Efecto de inhibidores de la asimilación de amonio sobre el consumo de nitrato y sobre su inhibición por amonio

Era sabido que en *A. chroococcum*, la única vía de asimilación de amonio es a través de la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Bárcena, 1.980). Para dilucidar si el efecto inhibitor del amonio sobre el consumo de nitrato descrito en el apartado anterior era producido por el propio amonio o era debido a algún producto de su asimilación, se ha estudiado el efecto de varios inhibidores de las enzimas de la ruta GS/GOGAT sobre el consumo de nitrato y sobre su inhibición por amonio.

Uno de los inhibidores utilizados fué la metionina-sulfoximina (MSX), que es un inhibidor de la glutamina sintetasa de diversos organismos (Gordon y Brill, 1.974; Prusiner y Stadtman, 1.973; Kleiner y Castorph, 1.982). Suspensiones celulares de *A. chroococcum* tratadas con MSX, presentan, como se muestra en la Fig.12, una velocidad de consumo de nitrato superior a la velocidad de consumo de las células sin tratar. Por otra parte, como se recoge en la Tabla X, las células tratadas con MSX no experimentan inhibición del consumo de nitrato en presencia de amonio. En la Fig.13, se muestra que el consumo de nitrato por cé-

Tabla IX. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en presencia de amonio.

Adición	Nitrato reductasa		Nitrito reductasa	
	( mU mg <sup>-1</sup> )		( mU mg <sup>-1</sup> )	
	Inicial	20 min	Inicial	20 min
Ninguna	45	60	105	103
NH <sub>4</sub> Cl	50	55	120	98

Las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa se determinaron a los tiempos inicial y después de 20 min de ensayo de consumo de nitrato, permeabilizando con detergente, como se describe en Materiales y Métodos, alícuotas tomadas de la suspensión celular utilizada para el experimento registrado en la Fig.10.

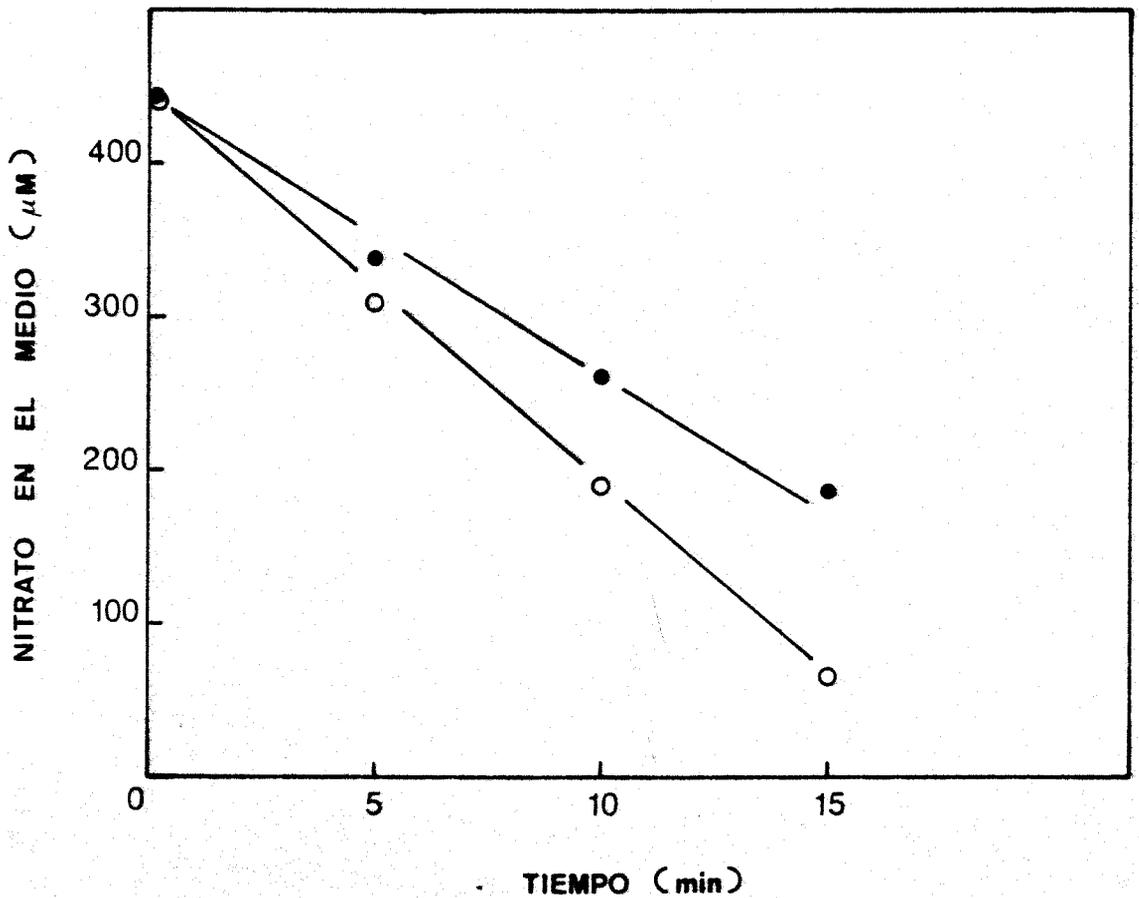


Fig.12.- *Cinética de consumo de nitrato por A. chroococcum en presencia de MSX.* El experimento se llevó a cabo con suspensiones celulares, en condiciones estandar, conteniendo 0,3 mg de proteína por ml de tampón de ensayo. La utilización de nitrato se midió en presencia (○-○) y ausencia (●-●) de 5 mM de MSX. Antes de añadir  $\text{KNO}_3$ , las células se preincubaron durante 15 min en agitación y a  $27^\circ\text{C}$  en presencia del inhibidor.

Tabla X. Prevención por MSX de la inhibición del consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en presencia de amonio.

Adición	Nitrato consumido (%)
Ninguna	100
NH <sub>4</sub> Cl	9,7
MSX	108
NH <sub>4</sub> Cl + MSX	99

Las condiciones experimentales fueron las descritas para el sistema de ensayo estándar de consumo de nitrato, excepto que, donde se indica, se añadió: 0,5 mM de NH<sub>4</sub>Cl; y/o 5 mM de MSX. Las suspensiones celulares se preincubaron durante 15 min en presencia de inhibidor ( donde se indica ) antes de añadir el KNO<sub>3</sub> y el NH<sub>4</sub>Cl. El 100 % de velocidad de consumo de nitrato corresponde a una utilización de éste de 545 nmoles mg<sup>-1</sup> en 20 min de ensayo.

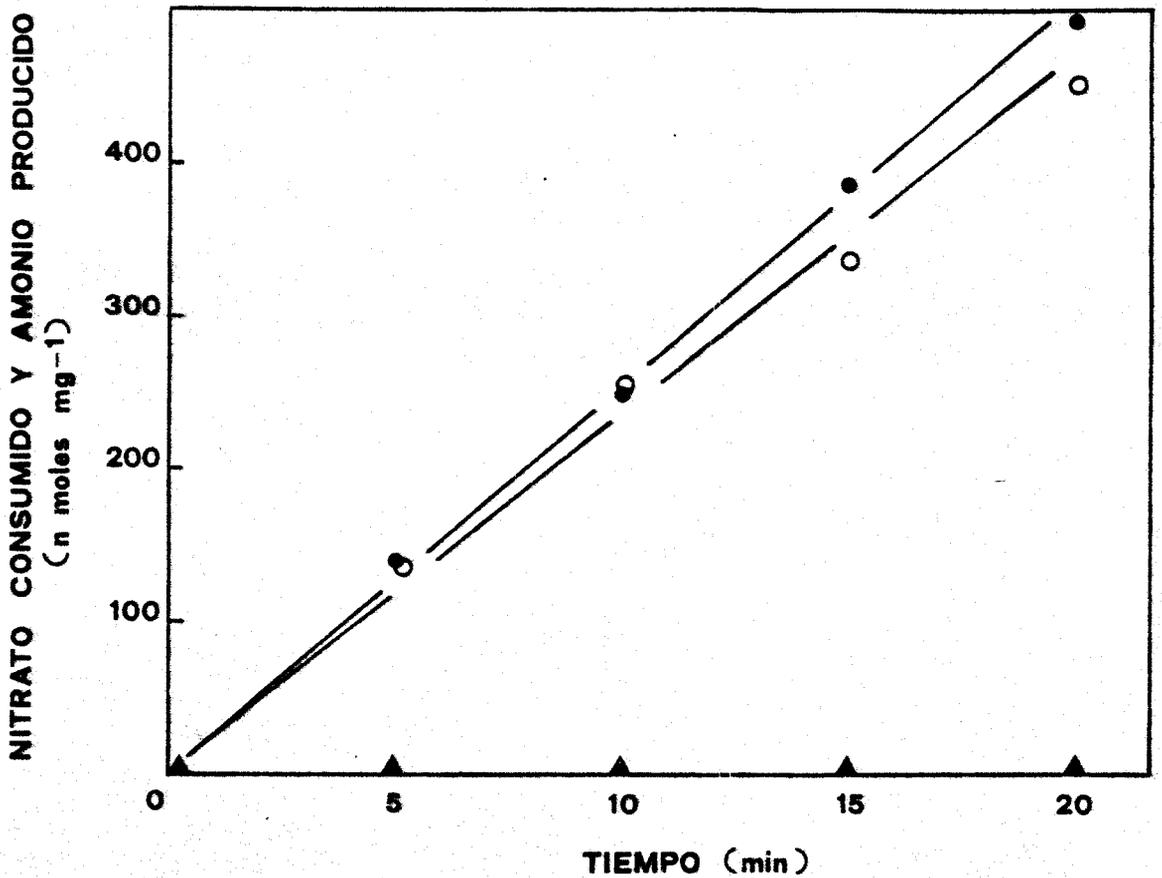


Fig.13.- Producción estequiométrica de amonio durante el consumo de nitrato por *A. chroococcum* en presencia de MSX. Las condiciones experimentales fueron las recogidas en la Fig.12, midiéndose el consumo de nitrato (O-O) y la liberación de amonio al medio en presencia (●-●) y ausencia (▲-▲) de MSX.

lulas de *A. chroococcum* tratadas con MSX va acompañado de una liberación estequiométrica de amonio al medio. En la Tabla XI se presenta el efecto de la adición de MSX sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa y glutamina sintetasa; podemos observar que el MSX no ejerce ningún efecto significativo sobre la actividad nitrato reductasa. El hecho de que en presencia de MSX no tenga lugar una inhibición del consumo de nitrato por amonio en células de *A. chroococcum* y que, por otro lado, la actividad glutamina sintetasa esté inhibida, sugiere que el amonio, por sí mismo, no es el responsable de la inhibición del consumo de nitrato, sino que debe ser asimilado para que ejerza su papel inhibitor. Por otra parte, hemos observado que cuando se añade MSX a una suspensión celular de *A. chroococcum* carente de una fuente de carbono, sólo observamos alrededor de un 10% de inhibición de la glutamina sintetasa, para unas concentraciones y condiciones similares a las utilizadas en el experimento recogido en la Tabla XI. Esto parece indicar que el MSX entra en la célula a través de un transporte que requiere energía. Los niveles de actividad nitrato reductasa en estas condiciones no se vieron afectados (datos no presentados).

La fosfinotricina (PPT), es un inhibidor de la glutamina sintetasa (Bayer et al., 1.972; Lea et al., en prensa). En *A. chroococcum*, este inhibidor previene sólo parcialmen-

Tabla XI. Efecto del MSX sobre los niveles de actividad nitrato reductasa y glutamina sintetasa de *A. chroococcum*.

Adición	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	Glutamina sintetasa (mU mg <sup>-1</sup> )
Ninguna	46	112
MSX	45	0
NH <sub>4</sub> Cl	39	396
MSX + NH <sub>4</sub> Cl	49	0

Las actividades enzimáticas se determinaron toluenizando como se indica en Materiales y Métodos alícuotas de las suspensiones celulares del experimento recogido en la Tabla X, sometidas a los tratamientos que en cada caso se especifica.

te de la inhibición del consumo de nitrato en presencia de amonio, como se muestra en la Tabla XII. Por otro lado, en la Tabla XIII, se presenta que la fosfinotricina sólo inhibe parcialmente a la glutamina sintetasa, por lo que permite cierta asimilación de amonio.

En la Fig.14 podemos observar que el consumo de nitrato en presencia del inhibidor es ligeramente inferior que en ausencia de éste. Concentraciones inferiores a las utilizadas en los experimentos recogidos en las Tablas XII y XIII y en la Fig.14, producían una menor inhibición de la actividad glutamina sintetasa y prevenían también en menor proporción de la inhibición del consumo de nitrato por amonio.

Hemos estudiado a continuación, el efecto sobre el consumo de nitrato de algunos inhibidores de la segunda reacción de la ruta asimilatoria de amonio (GS/GOGAT), la catalizada por la enzima glutamato sintasa, mediante la cual el grupo amido de la glutamina es transferido al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato. Esta reacción es inhibida por la azaserina, que actúa como inhibidor general de las glutamina-amido transferasas, (Prusiner y Stadtman, 1.973). Células de *A. chroococcum* tratadas con azaserina, presentan una velocidad de consumo de nitrato superior a la de las células no tratadas, como puede verse en la Tabla XIV.

Tabla XII. Prevención por fosfinotricina de la inhibición del consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en presencia de de amonio.

Adición	Nitrato consumido (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Amonio producido (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Ninguna	59,7	0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	3,6	N.D.*
PPT	33,7	20,8
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{PPT}$	14,7	N.D.

Las condiciones experimentales fueron las descritas para el sistema de ensayo de consumo de nitrato, excepto que, donde se indica, se añadió: 10 mM de PPT y/o 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Las suspensiones celulares se preincubaron durante 15 min en agitación y a 27°C en presencia del inhibidor, antes de añadir el nitrato y el amonio.

\*N.D. = No determinado

Tabla XIII. Efecto de la fosfinotricina sobre las actividades nitrato reductasa y glutamina sintetasa de *A. chroococcum*.

Adición	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	Glutamina sintetasa (mU mg <sup>-1</sup> )
Ninguna	40	936
NH <sub>4</sub> Cl	32	1.352
PPT	39	64
NH <sub>4</sub> Cl + PPT	46	239

Las actividades enzimáticas se determinaron toluenizando, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, alícuotas de células provenientes del experimento recogido en la Tabla XII, sometidas a los tratamientos que en cada caso se indican. Las actividades se determinaron a los 20 min de ensayo de consumo.

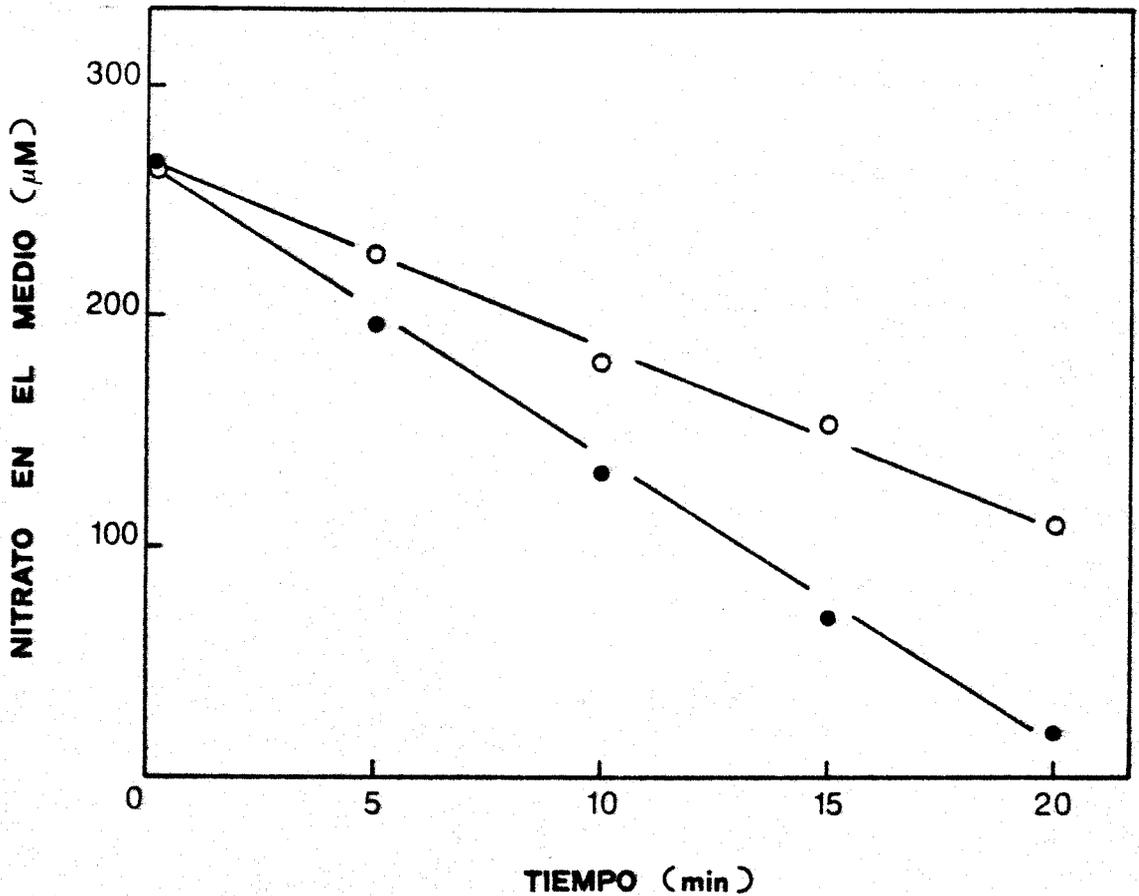


Fig.14.- *Cinética de consumo de nitrato por A. chroococcum en presencia de fosfinotricina.* El consumo de nitrato se siguió en suspensiones celulares obtenidas en las condiciones experimentales descritas en Materiales y Métodos, en presencia (O-O) y ausencia (●-●) de 10 mM de fosfinotricina. Antes de añadir el nitrato con que se iniciaba el experimento, las células se preincubaron en agitación y en presencia del inhibidor durante 15 min. La suspensión celular contenía 0,4 mg de proteína por ml de tampón.

Por otra parte, en la Tabla XIV, también se muestra que la azaserina previene de la inhibición del consumo de nitrato en presencia de amonio. El consumo de nitrato en presencia de azaserina, va acompañado de una liberación de amonio al medio al igual que ocurre en presencia de MSX. La actividad nitrato reductasa no es afectada significativamente por este inhibidor.

En último lugar, utilizamos como inhibidor de la asimilación de amonio la metionina-sulfona (MSF), que está descrita como inhibidor de las enzimas que catalizan la asimilación de amonio; es decir, glutamina sintetasa y glutamato sintasa, (Kleiner y Castorph, 1.982). Como con los inhibidores anteriormente descritos en este apartado, se siguió el consumo de nitrato en presencia de MSF, y observamos, como se muestra en la Fig.15, que el consumo de nitrato es superior en presencia del inhibidor que en ausencia de éste y que la utilización de nitrato en estas condiciones va acompañada de liberación de amonio al medio. En la Tabla XV, se expone que la MSF previene de la inhibición del consumo de nitrato en presencia de amonio; también podemos observar que la actividad glutamina sintetasa está parcialmente inhibida, mientras que, como ocurría en presencia de los inhibidores anteriormente estudiados, la actividad nitrato reductasa no se ve afectada.

Tabla XIV. Prevención por azaserina de la inhibición del consumo de nitrato por *A. chroococcum* en presencia de amonio.

Adición	Nitrato consumido (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Amonio liberado (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Ninguna	47	0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	3	N.D.
Azaserina	56	40
$\text{NH}_4\text{Cl}$ + azaserina	57	N.D.

Las condiciones experimentales fueron las descritas para el sistema estandar de ensayo de consumo de nitrato, excepto que, donde se indica se añadió : 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 5 mM de azaserina. Las suspensiones celulares se preincubaron durante 15 min en agitación a 27°C en presencia del inhibidor, antes de añadir el amonio y el nitrato.

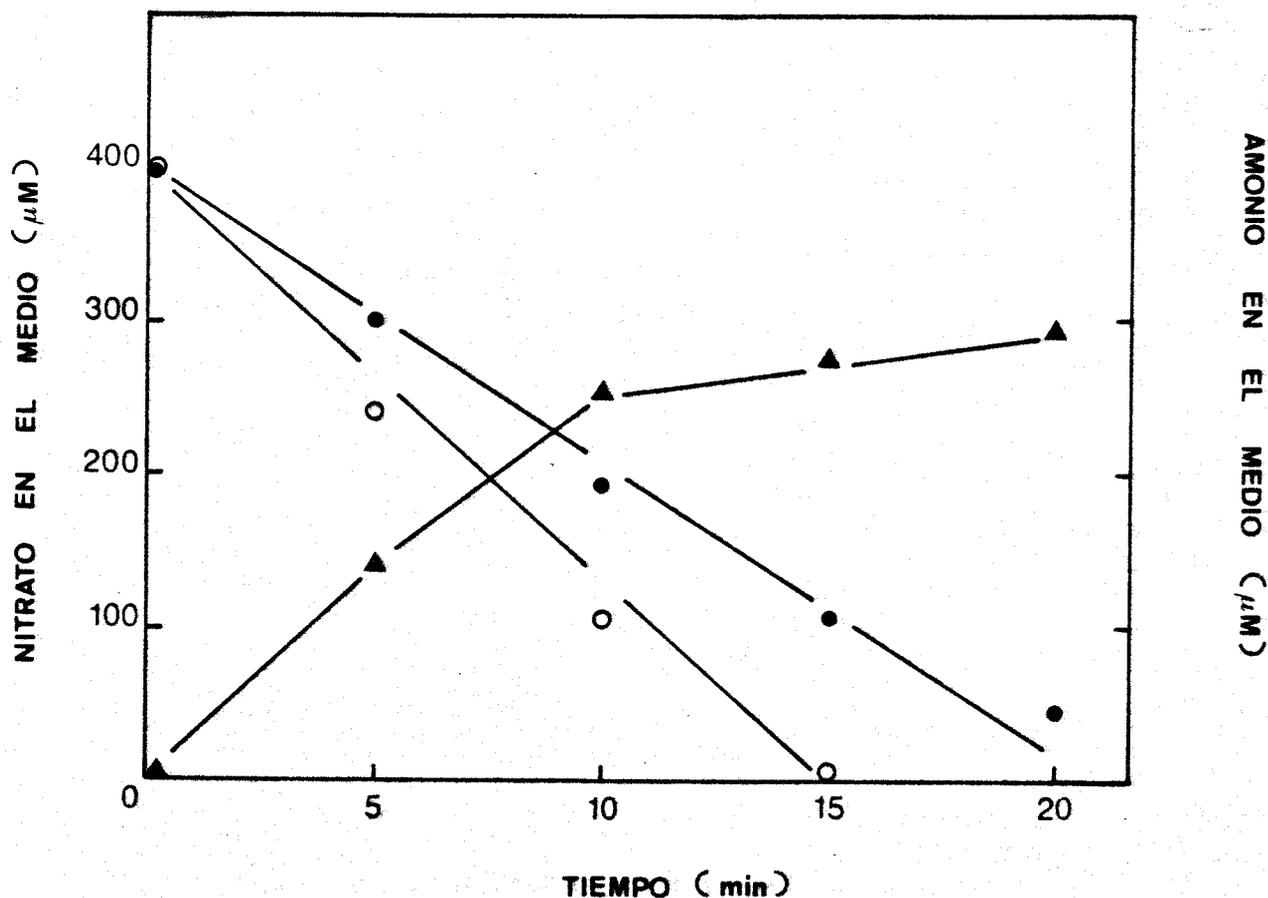


Fig.15.- *Cinética de utilización de nitrato y liberación de amonio durante la utilización de nitrato por células de A. chroococcum en presencia de MSF.* Las condiciones experimentales fueron las descritas para el experimento recogido en la Tabla XV, midiéndose el consumo de nitrato en presencia (○—○) y ausencia (●—●) del inhibidor. La liberación de amonio al medio se midió en presencia (▲—▲) de MSF a los tiempos indicados. La suspensión celular contenía 0,4 mg de proteína por ml de tampón.

Tabla XV. Prevención por MSF de la inhibición del consumo de nitrato por *A. chroococcum* en presencia de amonio y niveles de actividad nitrato reductasa y glutamina sintetasa en presencia y ausencia de MSF.

Adición	Nitrato consumido (nmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	Glutamina sintetasa (mU mg <sup>-1</sup> )
Ninguna	54	19	1.082
NH <sub>4</sub> Cl	4	19	1.221
MSF	66	20	305
NH <sub>4</sub> Cl + MSF	69	16	384

Las condiciones experimentales fueron las descritas para el sistema de ensayo estándar de consumo de nitrato, excepto que, donde se indica, se añadió: 10 mM de MSF y 0,5 mM de NH<sub>4</sub>Cl. Las suspensiones celulares se preincubaron 5 min en agitación a 27°C, antes de añadir el amonio y el nitrato. Las actividades enzimáticas se midieron toluenizando alícuotas de estas suspensiones, como se describe en Materiales y Métodos, después de 20 min de ensayo de

Los resultados expuestos en este apartado sugieren que no es el amonio *per se* el agente implicado en la regulación del consumo de nitrato, y que la inhibición que observamos en presencia de amonio debe ser producida por algún(os) metabolito(s) resultante(s) de su asimilación.

III.B.2.1.- Efecto del par ascorbato/PMS sobre la asimilación de amonio por *A. chroococcum*. Inactivación de la glutamina sintetasa.

El amonio asimilado en *A. chroococcum* vía GS/GOGAT se incorpora en esqueletos carbonados dando lugar a diversos metabolitos. Los resultados descritos en el apartado anterior sugerían que uno de estos metabolitos era el responsable de la inhibición del consumo de nitrato por amonio. En este apartado hemos estudiado el efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*, en ausencia de fuente de carbono y utilizando como única fuente de energía al par ascorbato/PMS. En la Tabla XVI se muestra que el ión amonio no inhibe el consumo de nitrato en estas condiciones. Está descrito que la glutamina sintetasa *in vitro* es inactivada por radicales de oxígeno (Levine et al., 1.981; Paneque et al., 1.982; Llobell, 1.982); con estos antecedentes y teniendo en cuenta que el PMS reducido origina radicales de oxígeno (Nishikimi et al., 1.972), medimos la actividad glutamina sintetasa en presencia del par ascorbato/PMS. En la Tabla XVII se muestra que aquella

Tabla XVI. Efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en presencia del par donador de electrones ascorbato/PMS como fuente de energía.

Fuente de energía	Adición	Nitrato consumido (nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Manitol	Ninguna	33,1
Manitol	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1
Ascorbato/ PMS	Ninguna	16,5
Ascorbato/ PMS	$\text{NH}_4\text{Cl}$	18,8

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la Fig.8, excepto que, donde se indica se añadió 0,5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Tabla XVII. Efecto del par donador de electrones ascorbato/PMS sobre las actividades glutamina sintetasa y nitrato reductasa de *A. chroococcum*.

Sistema de energía	Glutamina sintetasa (mU mg <sup>-1</sup> )	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )
Manitol	432	29
PMS	805	N.D.*
Ascorbato	718	N.D.
Ascorbato/PMS	22	28

Las condiciones experimentales eran las mismas que las recogidas en la Fig.8. Las actividades enzimáticas se determinaron a los 15 min de ensayo de utilización de nitrato toluenizando alícuotas de las mezclas de reacción del sistema estándar de consumo de nitrato. Durante este tiempo, la suspensión celular utilizada había consumido 34,5 nmoles de nitrato por mg de proteína y por min en presencia del par ascorbato/PMS.

\*N.D.= no determinado.

actividad desciende a un 95% del valor original. Se comprobó también que para que tuviese lugar la inactivación de la glutamina sintetasa en presencia del par ascorbato/PMS, se requería que la suspensión estuviese en agitación. Esto parece apoyar que dicha inactivación sea debida a los radicales de oxígeno. Observamos también en la Tabla XVII que, en presencia de PMS o de ascorbato, los niveles de actividad glutamina sintetasa son más elevados que en el control con manitol. Este hecho es debido a que en ausencia de fuente de carbono la actividad glutamina sintetasa, medida como actividad transferasa, es mayor que en presencia de una fuente de carbono, (Revilla y Cejudo: en preparación). La actividad nitrato reductasa no era afectada en estas condiciones, lo que concuerda con otros resultados de este grupo de trabajo (Llobell et al., en prensa) que han puesto de manifiesto que las especies activas de oxígeno no tienen efecto inactivador alguno sobre la nitrato reductasa de *A. chroococcum in vivo*.

Se probaron distintas concentraciones de ascorbato y de PMS, así como otros pares donadores artificiales como son el par ascorbato/DPIP y ascorbato/TMPD, tratando de obtener una menor inactivación de la glutamina sintetasa que permitiese la asimilación de amonio, pero bajo estas condiciones experimentales obtuvimos menores consumos de oxígeno y de nitrato.

### III.B.3.- Efecto de análogos del nitrato sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*

El cianato es un análogo del nitrato que está descrito como inhibidor competitivo de la nitrato reductasa de eucariotas (Vennesland y Guerrero, 1.979). En la Fig.16 se presenta que el cianato inhibe la entrada de nitrato, mientras que, como se muestra en la Fig.17, la actividad nitrato reductasa se mantiene elevada. Cuando se examinó el consumo de nitrato frente a distintas concentraciones de cianato, se pudo observar que al aumentar la concentración de cianato, crecía la inhibición sobre el consumo de nitrato (Fig.18).

A continuación, estudiamos el efecto del nitrito sobre el consumo del nitrato por células de *A. chroococcum*. En la Fig.19, se muestra que el nitrito ejerce una fuerte inhibición sobre el consumo de nitrato por suspensiones celulares de este organismo. Aunque no se muestra en la citada figura pudimos comprobar que la inhibición por nitrito del consumo de nitrato aumentaba con la concentración de nitrito. Hay que destacar que simultáneamente con el descenso del consumo de nitrato, tenía lugar una asimilación de nitrito, pudiéndose poner de manifiesto que la cantidad total de nitrógeno inorgánico consumido era prácticamente la misma con nitrato y nitrito que con nitrato sólo. Así, la suspensión celular de *A. chroococcum* con-

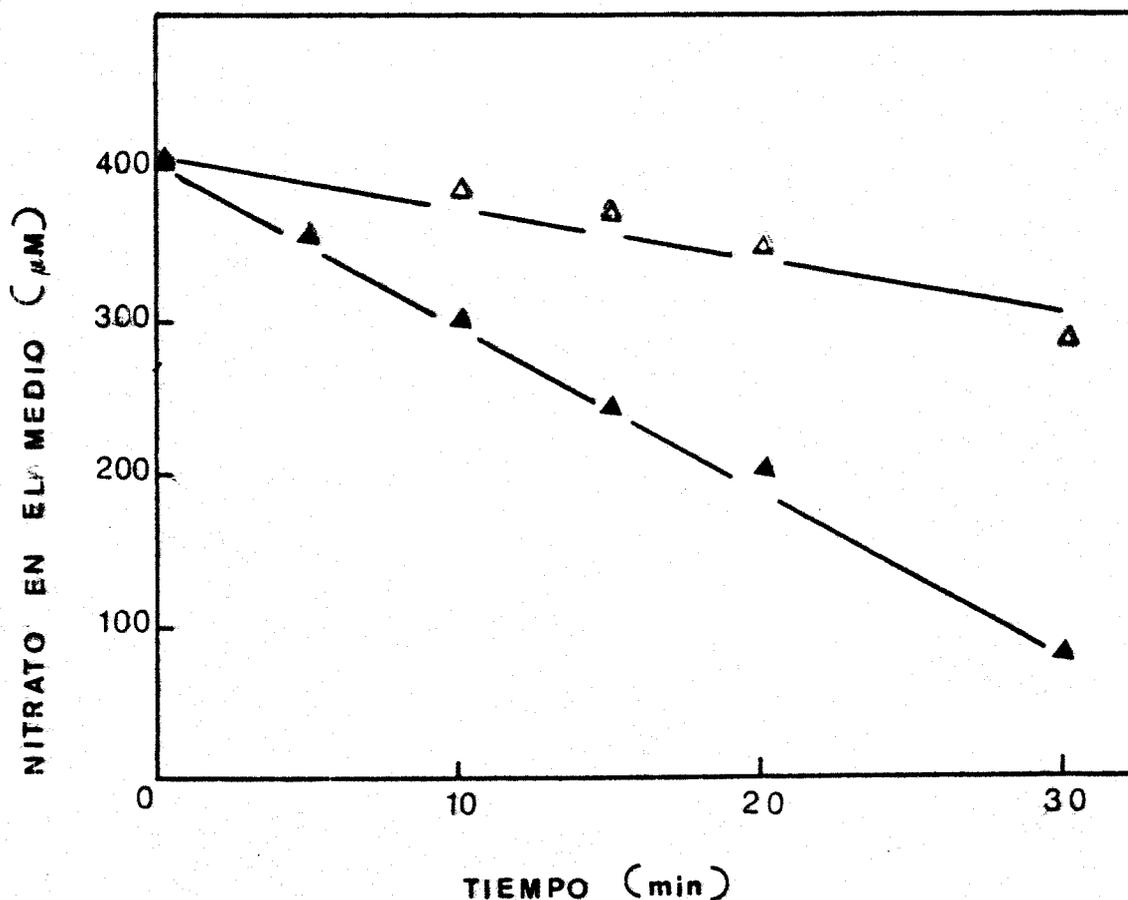


Fig. 16.- Efecto del cianato sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos para el sistema estandar de ensayo de consumo de nitrato por *A. chroococcum*. (▲-▲) utilización de nitrato en ausencia de cianato; (Δ-Δ), utilización de nitrato en presencia de 0,5 mM de cianato. Las suspensiones celulares contenían 0,3 mg de proteína por ml. El ensayo se inició añadiendo 0,4 mM de  $\text{KNO}_3$ .

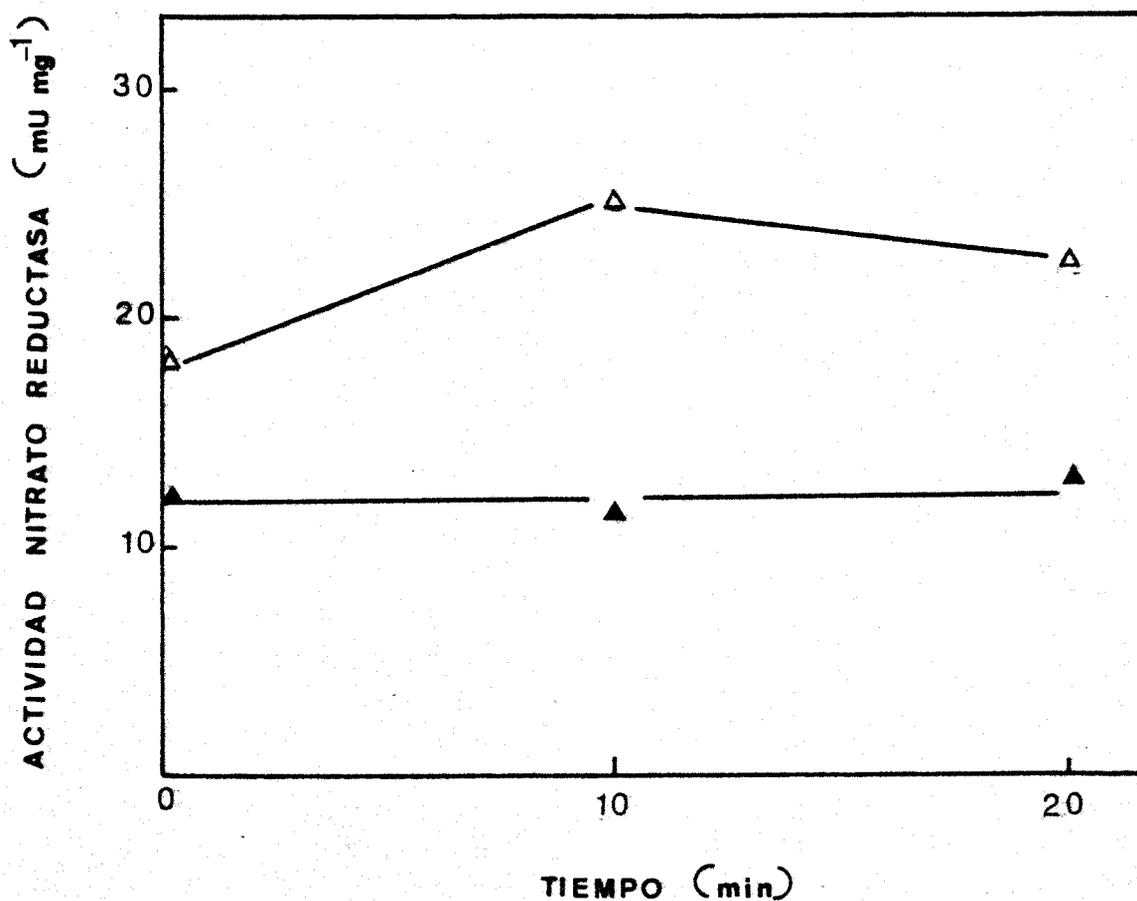


Fig. 17.- Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa de *A. chroococcum*. Los niveles de actividad se determinaron toluenizando a los tiempos indicados, alícuotas tomadas de las suspensiones celulares utilizadas en el experimento recogido en la Fig.16, como se describe en Materiales y Métodos: actividad nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* consumiendo nitrato en ausencia (▲-▲) y presencia (Δ-Δ) de 0,5 mM de cianato.

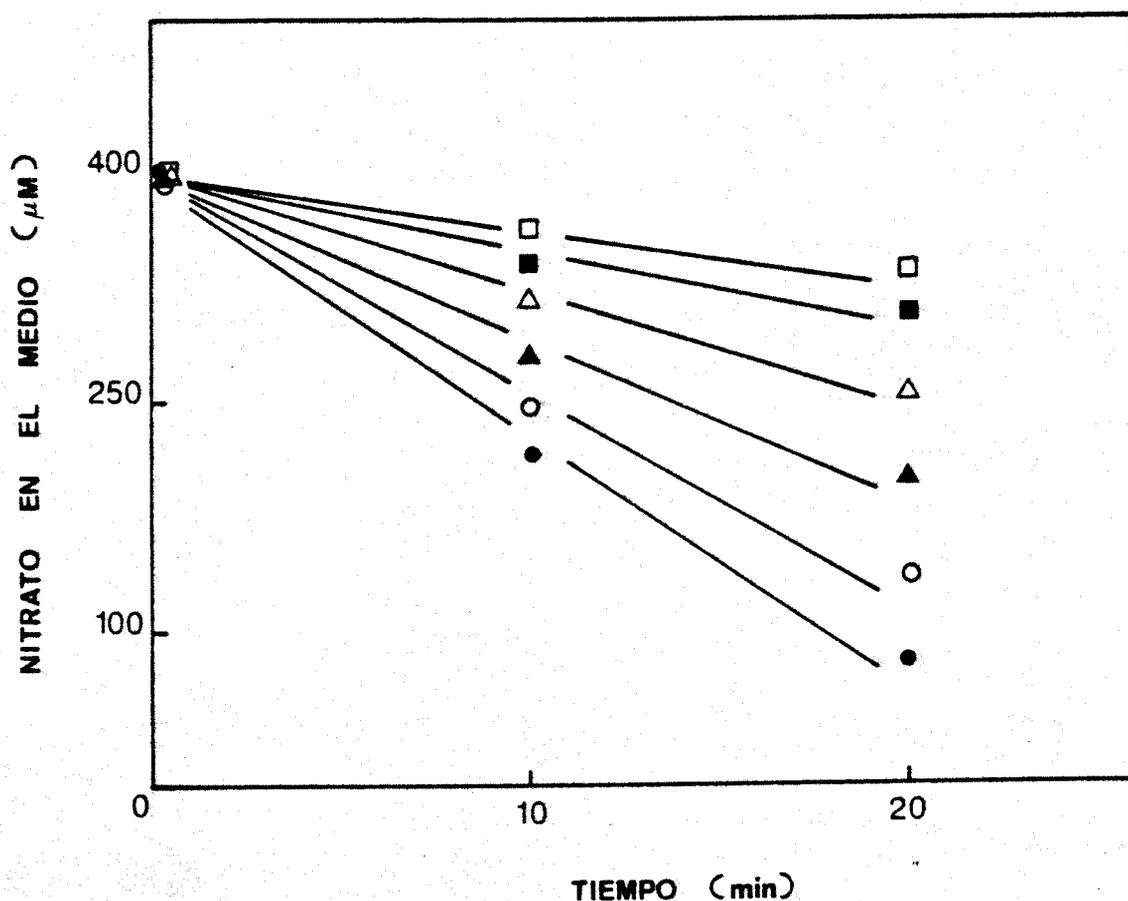


Fig.18.- Efecto de la concentración de cianato sobre el consumo de nitrato. Las condiciones experimentales fueron las descritas para la Fig.16, excepto que, donde se indica, se añadieron las siguientes concentraciones de cianato: (●-●) 0 mM; (○-○) 0,1 mM; (▲-▲) 0,3 mM; (△-△) 0,6 mM; (■-■) 1,2 mM; (□-□) 2 mM. Las suspensiones celulares contenían 0,4 mg de proteína por ml de tampón.

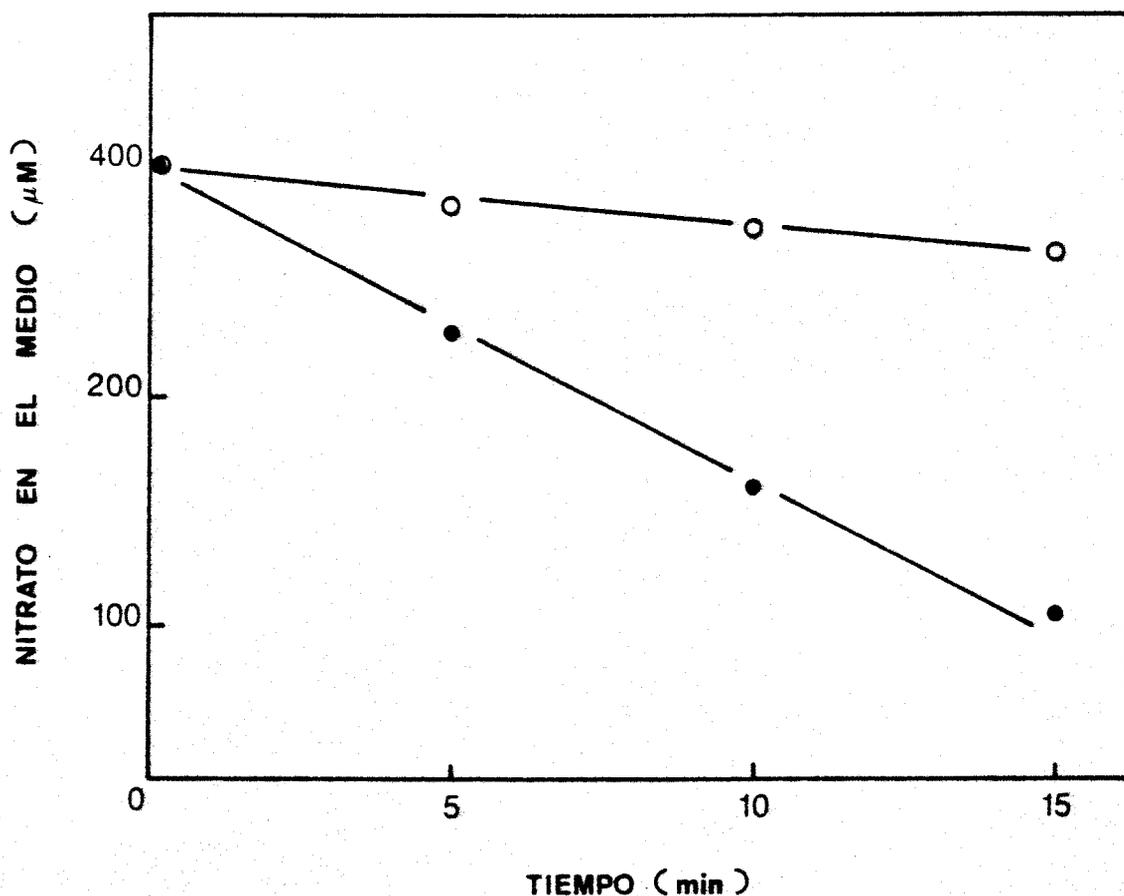


Fig. 19.- Efecto del ión nitrito sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Las condiciones experimentales fueron las habituales para el ensayo de desaparición de nitrato, excepto que la desaparición de nitrato se siguió en presencia (O-O) y ausencia (●-●) de 0,3 mM de nitrito. Las suspensiones celulares contenían 0,4 mg de proteína por ml.

sumiendo nitrato en ausencia de nitrito, a los 15 min de comenzar el ensayo, había consumido 290 nmoles de nitrato; por otro lado, la suspensión que contenía nitrato y nitrito había consumido 204 nmoles de nitrito y 53 nmoles de nitrato, que suman un total de 257 nmoles de nitrógeno inorgánico. Por el contrario, como ya se ha descrito con anterioridad, todo el consumo de nitrógeno en presencia de amonio corresponde a consumo de este ión, sin que tenga lugar desaparición alguna de nitrato en este caso. Es interesante resaltar que la inhibición del consumo de nitrato por nitrito no era prevenida en presencia de MSX (datos no presentados).

#### III.B.4.- Efecto de azida y cianuro sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum*.

El cianuro está descrito como un potente inhibidor *in vitro* de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* mientras que la azida no ejerce efecto inhibitor sobre dicha enzima de *A. chroococcum* (Guerrero et al., 1.973). En la Tabla XVIII se presenta que el consumo de nitrato está completamente inhibido en presencia de azida o cianuro y que la actividad nitrato reductasa *in situ*, no se ve afectada por la azida, mientras que en presencia de cianuro dicha actividad es prácticamente nula. La inhibición del consumo de nitrato por cianuro puede ser debida bien a su efecto sobre el sistema reductor o bien por su papel de inhibidor

Tabla XVIII. Efecto de la azida y el cianuro sobre el consumo de nitrato por *A. chroococcum* y sobre los niveles de actividad nitrato reductasa.

Adición	Nitrato reductasa (mU mg <sup>-1</sup> )	Nitrato consumido (nmoles mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
Ninguna	42	20
Azida	50	0
Cianuro	3	0

Las suspensiones celulares se prepararon como se describe en Materiales y Métodos para el sistema estándar de ensayo de consumo de nitrato por *A. chroococcum*, excepto que, donde se indica se añadió 1 mM de azida y 1 mM de cianuro. Las actividades enzimáticas se midieron toluenizando alícuotas tomadas a los 20 min de ensayo de consumo de nitrato por dichas suspensiones.

del transporte electrónico a nivel de la cadena respiratoria; en el caso de la azida, podría explicarse su acción inhibidora sobre el consumo de nitrato como resultado de su papel de desacoplante.

### III.B.5.- Efecto de diversos aminoácidos sobre el consumo de nitrato

En la Tabla XIX se presenta que la presencia de glutámico, aspártico e isoleucina, no ejerce inhibición alguna sobre el consumo de nitrato, mientras que cuando glutamina, arginina o asparragina están presentes en el ensayo de consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* dichos aminoácidos inhiben parcialmente este consumo. Para comprobar si los aminoácidos citados en último lugar eran capaces de ejercer esta inhibición en condiciones en las que no se puede asimilar el amonio, se estudió el efecto de dichos aminoácidos en presencia de MSX. En la Tabla XIX se presenta que en estas condiciones desaparece totalmente el efecto de la asparragina y parcialmente la acción de la glutamina y de la arginina. Estudiamos a continuación la liberación de amonio y pudimos observar que la producción de amonio en las suspensiones suplementadas con glutamina, arginina y asparragina, era superior al nitrato consumido por dichas suspensiones, especialmente en el caso de la asparragina (datos no presentados). Estos resultados pueden interpretarse en términos de que la inhibición observa-

Tabla XIX. Efecto de distintos aminoácidos sobre el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en presencia y ausencia de MSX.

Adición	Consumo de nitrato ( % del control )	
	- MSX	+ MSX
Ninguna	100	100
Glutamato	119	120
Glutamina	51	77
Arginina	75	88
Aspártico	122	124
Isoleucina	105	83
Asparragina	61	109

El experimento se llevó a cabo en suspensiones celulares conteniendo 0,3 mg de proteína por ml de tampón de ensayo de consumo de nitrato. Donde se indica, se añadió 7 mM del aminoácido señalado en cada caso. El  $\text{KNO}_3$  se añadió tras incubación durante 5 min en agitación a  $27^\circ\text{C}$  en presencia del aminoácido utilizado en cada caso. El 100 % de la actividad de consumo de nitrato corresponde a  $21 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  en ausencia de MSX y de  $25 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  en presencia de MSX.

da en las suspensiones celulares en ausencia de MSX, era en parte (Gln y Arg) y casi totalmente (Asn) debida al amonio producido a partir de los aminoácidos.

### III.C.- INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LOS NIVELES CELULARES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN

*A. chroococcum.*

En ensayos previos, realizados en extractos crudos (Guerrero et al., 1.973), se había demostrado que los niveles de nitrato reductasa eran elevados en células cultivadas en nitrato o nitrito, mientras que en células cultivadas en amonio ó dinitrógeno como únicas fuentes de nitrógeno, los niveles de actividad nitrato reductasa encontrados no eran apreciables. Por otro lado, células cultivadas en nitrato amónico presentaban un nivel apreciable de actividad nitrato reductasa. Esto podría señalar al ión nitrato como posible inductor de la nitrato reductasa en *A. chroococcum.*

En los estudios realizados por nosotros, la determinación de la actividad nitrato reductasa se llevó a cabo *in situ*, y pudimos comprobar, como se presenta en la Tabla III del apartado III.A.1., que los niveles de actividad nitrato reductasa están fuertemente influídos por la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo; así, sólo encontramos actividad nitrato reductasa cuando hay nitrato en el medio, pero no cuando coexisten nitrato y amonio.

Como hemos señalado anteriormente, el método de determinación de nitrato utilizado por nosotros para la rea-

lización de este trabajo, no nos permite separar los pasos de entrada de nitrato al interior celular y de su posterior reducción. Así, debido a lo estrechamente unidos que se encuentran estos dos pasos de la asimilación de nitrato, al estudiar el carácter inducible o represible de la entrada de nitrato a la célula, hemos seguido también el desarrollo de la actividad nitrato reductasa.

### III.C.1.- Regulación de la síntesis de nitrato reductasa

Se ha estudiado en este apartado la inducción de la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato y de cianato, análogo de aquel, así como el desarrollo de la capacidad de consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* en las mencionadas condiciones.

#### III.C.1.1.- Evolución de la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato

Hemos de dilucidar si el nitrato actúa induciendo la actividad nitrato reductasa, o bien, el amonio actúa reprimiendo dicha actividad.

En la Fig.20, se presenta que células procedentes de un medio sin fuente de nitrógeno, carentes por tanto de actividad nitrato reductasa detectable como hemos señalado anteriormente, desarrollan dicha actividad en presencia de nitrato, apareciendo niveles de actividad apreciables a

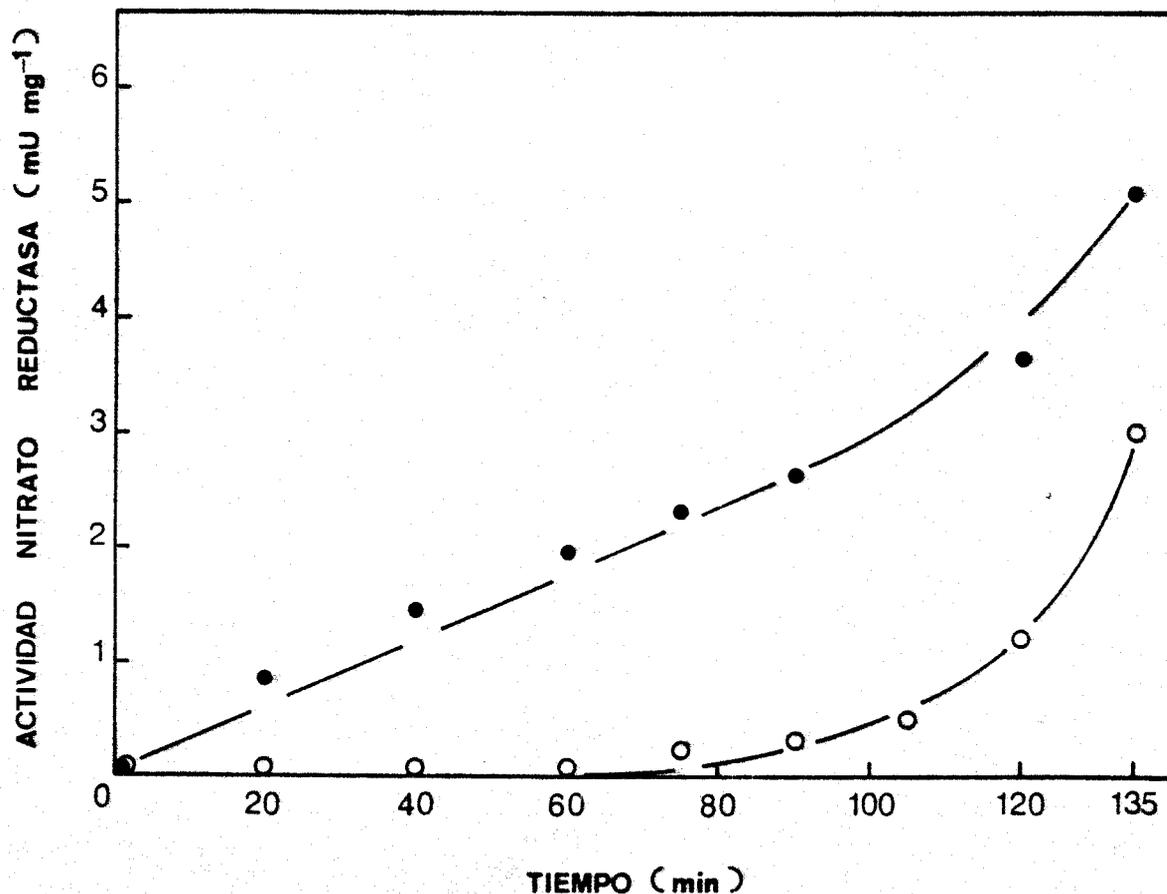


Fig. 20.- Cambios iniciales de la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato potásico y nitrato amónico en células de *A. chroococcum*. El experimento se llevó a cabo a partir de suspensiones de células crecidas en aire como única fuente de nitrógeno; estas células se recogieron y lavaron como se describe en Materiales y Métodos, se resuspendieron en tampón MOPS-KOH, 50 mM, pH 7,5 más 1 g/l de manitol, al que se añadió: 0,6 mM de  $\text{KNO}_3$  (●-●) y 0,6 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (○-○). A los tiempos indicados se tomaban alícuotas que eran lavadas y toluenizadas como se indica en Materiales y Métodos, donde se determinaba la actividad nitrato reductasa.

partir de 20 min de incubación en presencia de nitrato; por otro lado, se muestra en la citada figura, que cuando se añade nitrato amónico en lugar de nitrato, la actividad nitrato reductasa no se hace detectable hasta transcurridos 95-100 min aproximadamente. Cuando medimos el amonio presente en el medio, observamos que el amonio había sido consumido aproximadamente a los 90 min de comenzar el ensayo, (datos que recoge la Fig.21). Estos resultados indican que la actividad nitrato reductasa no se desarrolla incluso en presencia de nitrato mientras haya amonio en el medio.

Por otro lado, en la Fig.22, se presenta que en la suspensión celular donde se encuentra presente el nitrato amónico, el comienzo del consumo de nitrato está muy retardado respecto a aquella suspensión donde no está presente el ión amonio, coincidiendo la iniciación de dicho consumo con la aparición de la actividad nitrato reductasa.

Se estudió a continuación si el efecto del amonio sobre el desarrollo de la actividad nitrato reductasa era provocado por el propio amonio o si, por el contrario, era consecuencia de la acción de algún(os) metabolito(s) resultante(s) de su asimilación. Para ello, tratamos las células con MSX. En la Fig.23 se muestra que en presencia de MSX, la actividad nitrato reductasa se desarrolla de manera paralela en las suspensiones que contienen nitrato sólo y nitrato amónico.

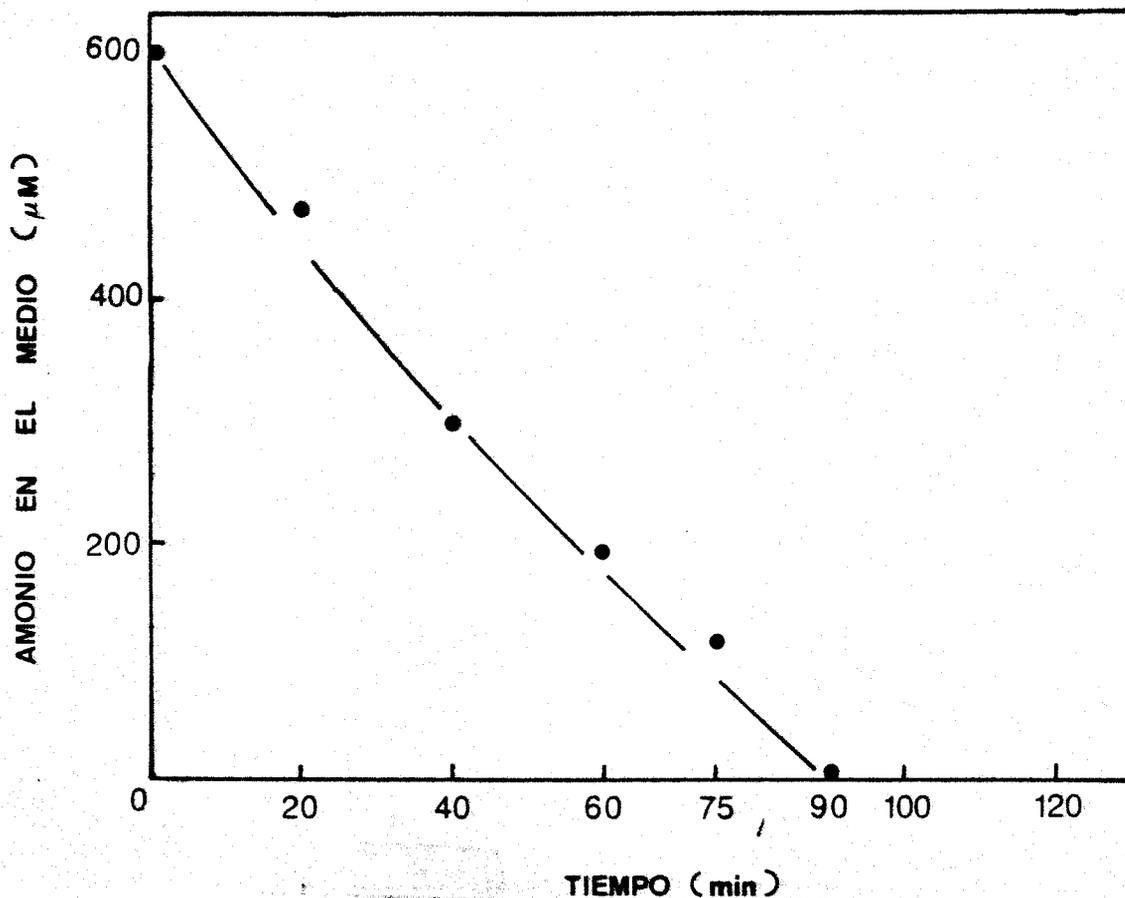


Fig.21.- Consumo de amonio por células de *A. chroococcum*. La desaparición de amonio se determinó en las suspensiones celulares conteniendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  registradas en la Fig.20. Las medidas de amonio en el medio se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

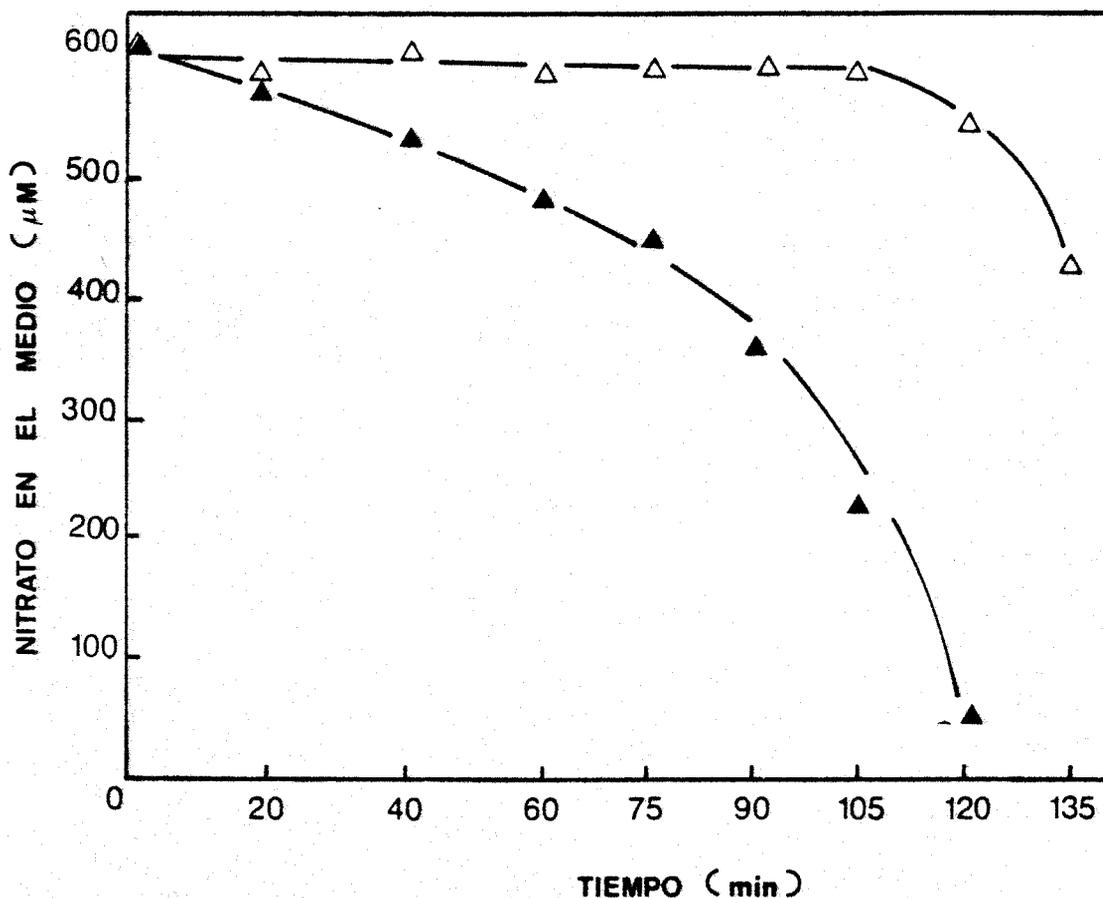


Fig. 22.- Efecto de ión amonio sobre el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*. El consumo de nitrato se siguió en las suspensiones celulares utilizadas en el experimento recogido en la Fig. 20, después de filtrar las alícuotas tomadas a los tiempos señalados en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las suspensiones contenían 0,3 mg de proteína celular por ml de tampón de ensayo. (▲-▲) 0,6 mM de KNO<sub>3</sub>; y (△-△) 0,6 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

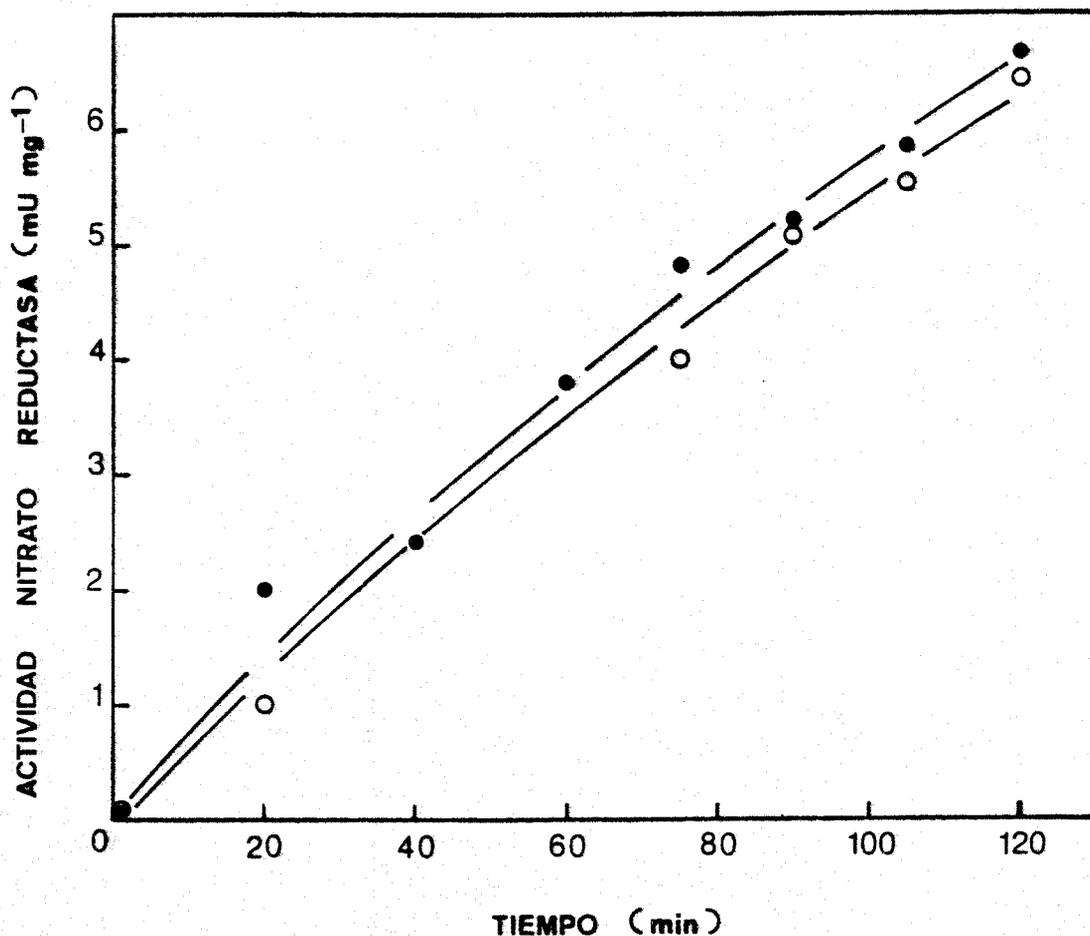


Fig.23.- Cambios iniciales de la actividad nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* tratadas con MSX en presencia de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . El experimento se llevó a cabo en las condiciones descritas en la Fig.20, excepto que, antes de añadir  $\text{KNO}_3$  (●-●) y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (○-○), se preincubaron las células durante 10 min en agitación a  $27^\circ\text{C}$  en presencia de 5 mM de MSX.

Al determinar el consumo de nitrato en las condiciones experimentales descritas anteriormente, no se observó inhibición de dicho consumo en presencia de amonio; siendo la cinética de consumo en presencia de nitrato amónico y MSX, paralela a la que presentaba la suspensión celular en presencia de MSX pero en ausencia de amonio, (datos no presentados), lo que está de acuerdo con los datos recogidos en la Tabla X.

Cuando a suspensiones celulares procedentes de un cultivo con aire como única fuente de nitrógeno se las re-suspende en tampón de ensayo en las condiciones recogidas en Materiales y Métodos, pero sin añadir nitrato, se puede observar que la actividad nitrato reductasa no se desarrolla. Lo mismo ocurre cuando en lugar de nitrato añadimos amonio. Puesto que se obtienen estos mismos resultados si se realiza el experimento en presencia de MSX, se puede concluir que la presencia de nitrato es indispensable para que se desarrolle la actividad nitrato reductasa (Fig.24). Aunque no se muestra, se pudo averiguar que concentraciones de nitrato comprendidas en un margen de 10-500  $\mu\text{M}$  conseguían un desarrollo de actividad nitrato reductasa de 10  $\text{mU mg}^{-1}$  tras 180 min de incubación. Cuando se sometieron las células a condiciones de deficiencia de nitrógeno, *A. chroococcum* era incapaz de desarrollar actividad nitrato reductasa, como se recoge en la Tabla XX.

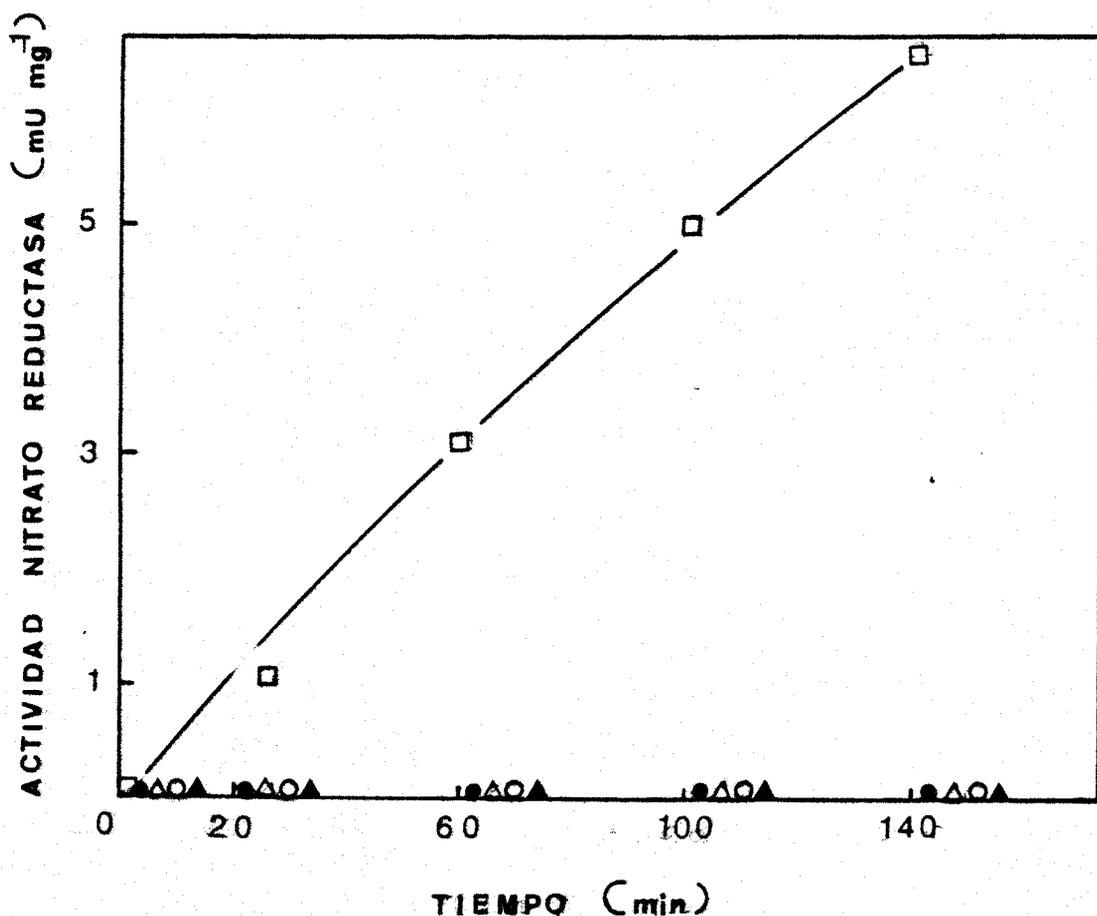


Fig.24.- *Requerimiento de nitrato para la inducción de la nitrato reductasa de A. chroococcum en presencia y ausencia de MSX.* El experimento se llevó a cabo con suspensiones celulares crecidas en aire como única fuente de nitrógeno y recogidas y lavadas como se describe en materiales y Métodos, resuspendiéndose en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5 más manitol 1 g/l. A continuación, las células se incubaron 10 min en presencia de MSX 5 mM {añadiéndose entonces (●-●) amonio 0,5 mM; (○-○) nada} y en ausencia de MSX {adicionando a la suspensión (□-□) nitrato potásico 0,5 mM; (△△) amonio 0,5 mM y (▲-▲) nada.}

Tabla XX. Niveles de actividad nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* sometidas a hambre de nitrógeno.

---

Adición	Actividad nitrato reductasa ( mU mg <sup>-1</sup> )
Ninguna	0
KNO <sub>3</sub>	5

---

Dos cultivos celulares de *A. chroococcum* en un medio sin nitrógeno combinado, crecidos hasta una  $A_{560\text{nm}}$  de 0,4, fueron borboteados con argon conteniendo 20 % de oxígeno, añadiéndose donde se indica 5 mM de KNO<sub>3</sub>. Después de 5 h en estas condiciones, se midió la actividad nitrato reductasa tomando una alícuota del cultivo y toluenizando como se describe en Materiales y Métodos.

Por otro lado, cuando las células proceden de un cultivo con amonio como única fuente de nitrógeno, se lavan, asegurándose de que no queda amonio en el medio y resuspenden en tampón de ensayo sólo aparece actividad nitrato reductasa cuando se añade nitrato al tampón como se enseña en la Fig.25. La Fig.26 muestra el consumo de nitrato por una suspensión celular de *A. chroococcum* procedente de un medio con amonio y que había sido resuspendida en la solución estándar para ensayo de utilización de nitrato. Como se puede apreciar, la velocidad de consumo de nitrato alcanzaba un valor constante a los 30 min, aproximadamente, de iniciado el experimento, que debe reflejar el desarrollo de un nivel adecuado de actividad del sistema reductor de nitrato.

#### II.C.2.- Evolución de la actividad nitrato reductasa en presencia de cianato

Se ha estudiado en este apartado el efecto inductor del cianato que, como se ha señalado anteriormente, es un análogo del nitrato que inhibe la entrada de éste al interior celular. En la Fig.27 se presenta que suspensiones celulares incubadas en ausencia de nitrato y otras fuentes de nitrógeno fijado, pero en presencia de cianato, son capaces de desarrollar unos niveles de actividad nitrato reductasa similares a los alcanzados en presencia de nitrato

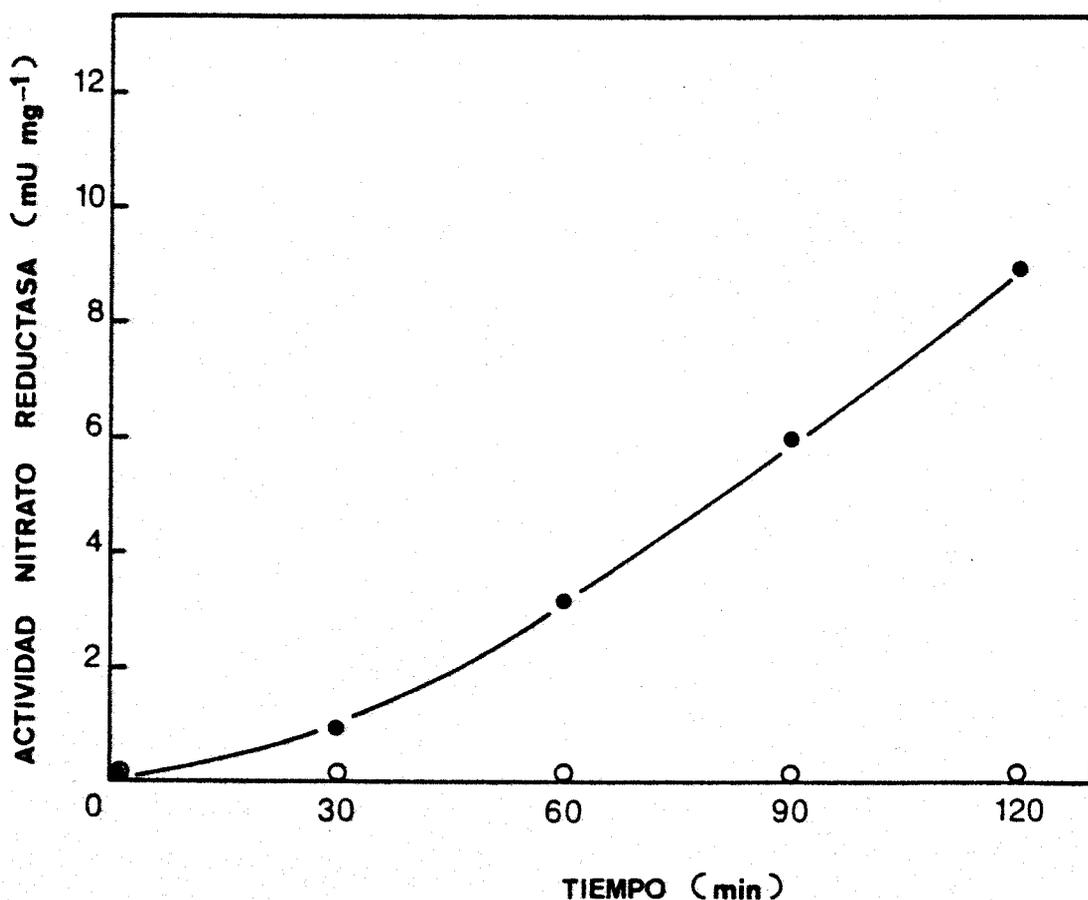


Fig.25.- Cambios iniciales de la actividad nitrato reductasa en presencia de nitrato en células de *A. chroococcum* cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno. Células crecidas en medio con amonio, se recogieron y lavaron como se describe en Materiales y Métodos y se resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5, suplementado con manitol 1 g/l, en presencia (●-●) y ausencia (O-O) de 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$ . La actividad nitrato reductasa se midió, a los tiempos indicados, en alícuotas de la mezcla de ensayo después de tolue-nizar como se indica en Materiales y Métodos.

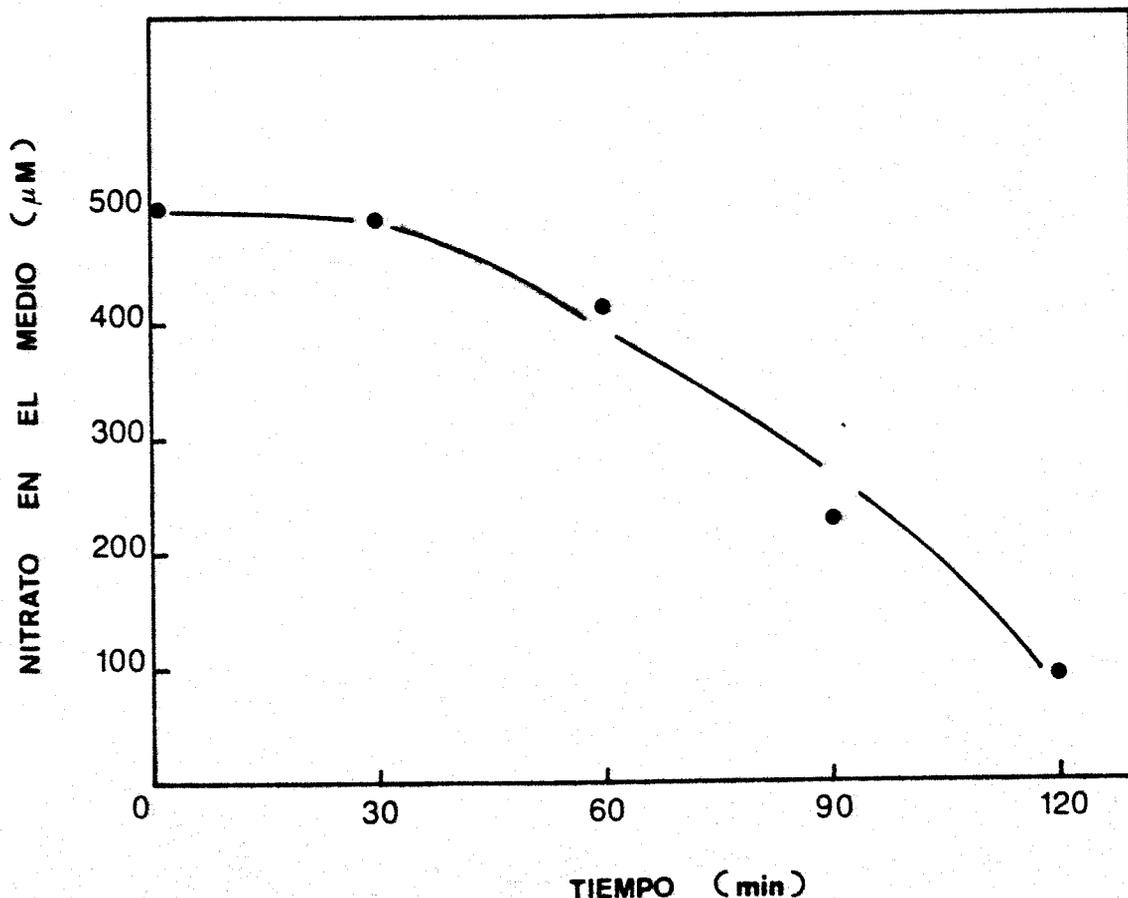


Fig.26.- Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* procedentes de un medio con amonio. Las células crecidas en medio con amonio, fueron recogidas y lavadas como se describe en Materiales y Métodos y se resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5 suplementado con manitol 1 g/l y  $\text{KNO}_3$  0,5 mM. A los tiempos señalados se tomaron alícuotas en donde, después de filtrarlas como se indica en Materiales y Métodos, se determinó el nitrato.

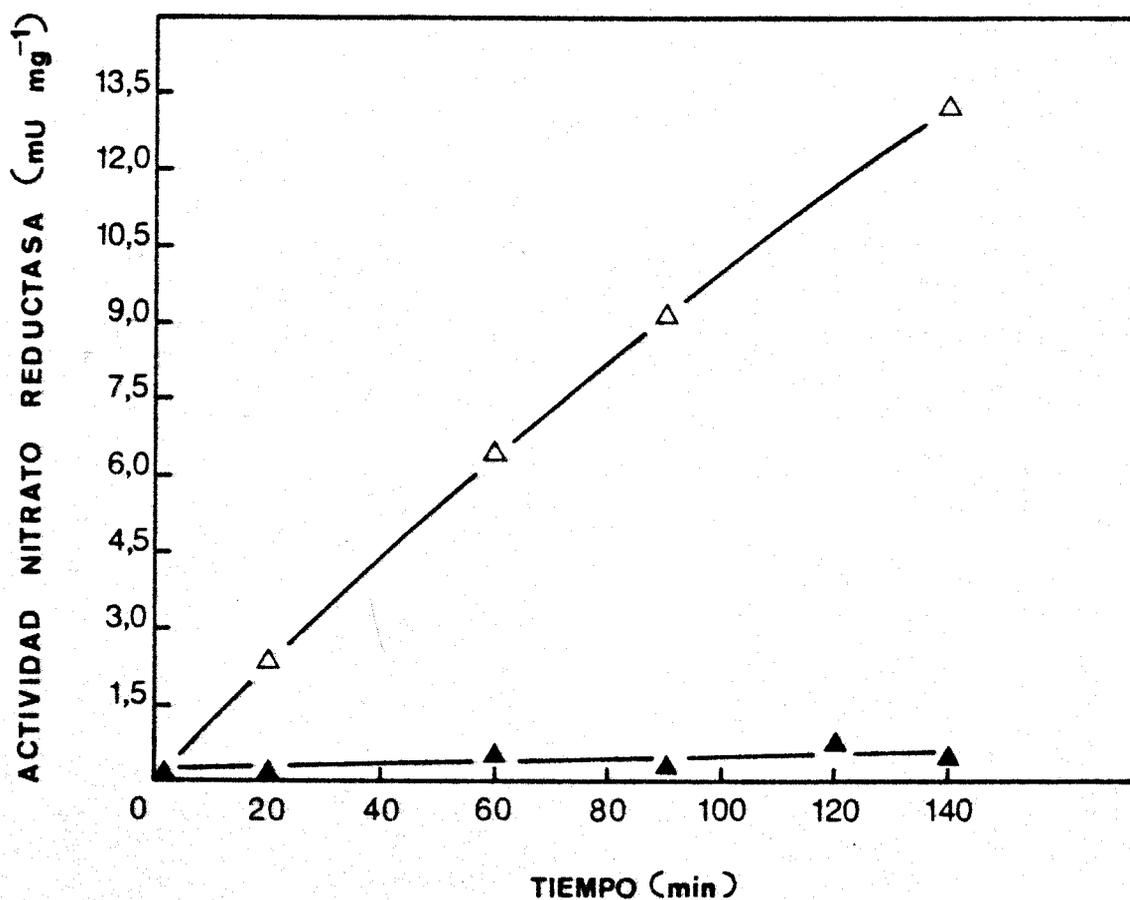


Fig. 27.- Cambios iniciales en los niveles de actividad de la nitrato reductasa en células de *A. chroococcum* provenientes de un medio con dinitrógeno como única fuente de nitrógeno y tratadas con cianato. El experimento se llevó a cabo recogiendo células procedentes de un medio con aire como única fuente de nitrógeno. Las células se lavaron como se indica en Materiales y Métodos y se resuspendieron en tampón de ensayo, al que se añadió manitol 2 g/l. Esta suspensión se dividió en dos matraces y a uno de ellos se le añadió 0,5 mM de KCNO ( $\Delta$ - $\Delta$ ), en tanto que, a la otra mitad no se le hizo adición alguna ( $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ ). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5 ml que se lavaron y toluenizaron, midiéndose a continuación la actividad nitrato reductasa. Las suspensiones contenían 0,42 mg de proteína por ml de tampón.

a los mismos tiempos. Era interesante comprobar que no había cianato en el ensayo de actividad nitrato reductasa, pues, como está descrito (Guerrero et al., 1.973), el cianato *in vitro* estimula la actividad nitrato reductasa. También en este último trabajo se ha descrito que la presencia de cianato en el ensayo *in vitro* de la actividad nitrato reductasa, protege de la inactivación por ditionito que se produce después de 3 min de ensayo. Para estos fines, se ha podido evidenciar que, *in situ*, la presencia de cianato también protege de esta inactivación. Por el contrario, en los ensayos de actividad del experimento recogido en la Fig.27, la actividad nitrato reductasa no era lineal después de transcurridos los 3 min iniciales de reacción, a no ser que se añadiera cianato exógenamente, lo que indica, que no lo había en el ensayo.

A continuación, se estudió el efecto del ión amonio sobre la inducción de la nitrato reductasa por cianato en células de *A. chroococcum*. En la Fig.28, se muestra que en presencia de amonio, la inducción de la actividad nitrato reductasa no tiene lugar hasta que desaparece el amonio del medio, cosa que ocurría a los 60 min aproximadamente de comenzar el ensayo. La Fig.29, por otro lado, muestra que cuando células procedentes de un medio de cultivo con amonio como fuente de nitrógeno, son lavadas y transferidas a un medio sin fuente de nitrógeno, pero suplementado con

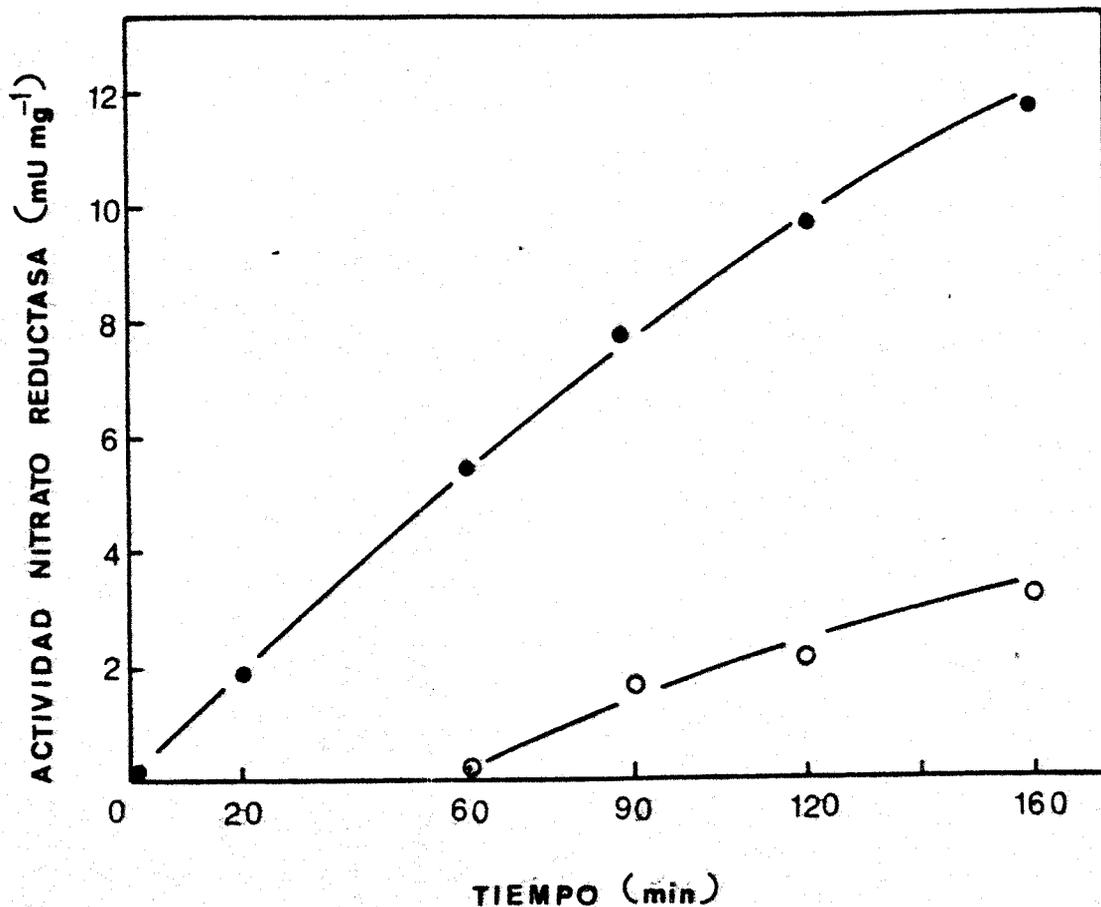


Fig. 28.- Efecto del ión amonio sobre la inducción de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* por cianato. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig. 27, excepto que, donde se indica, se añadió; 0,5 mM de KCNO (●-●) y 0,5 mM de KCNO más 0,4 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (○-○). Las suspensiones celulares contenían 0,4 mg de proteína por ml de tampón.

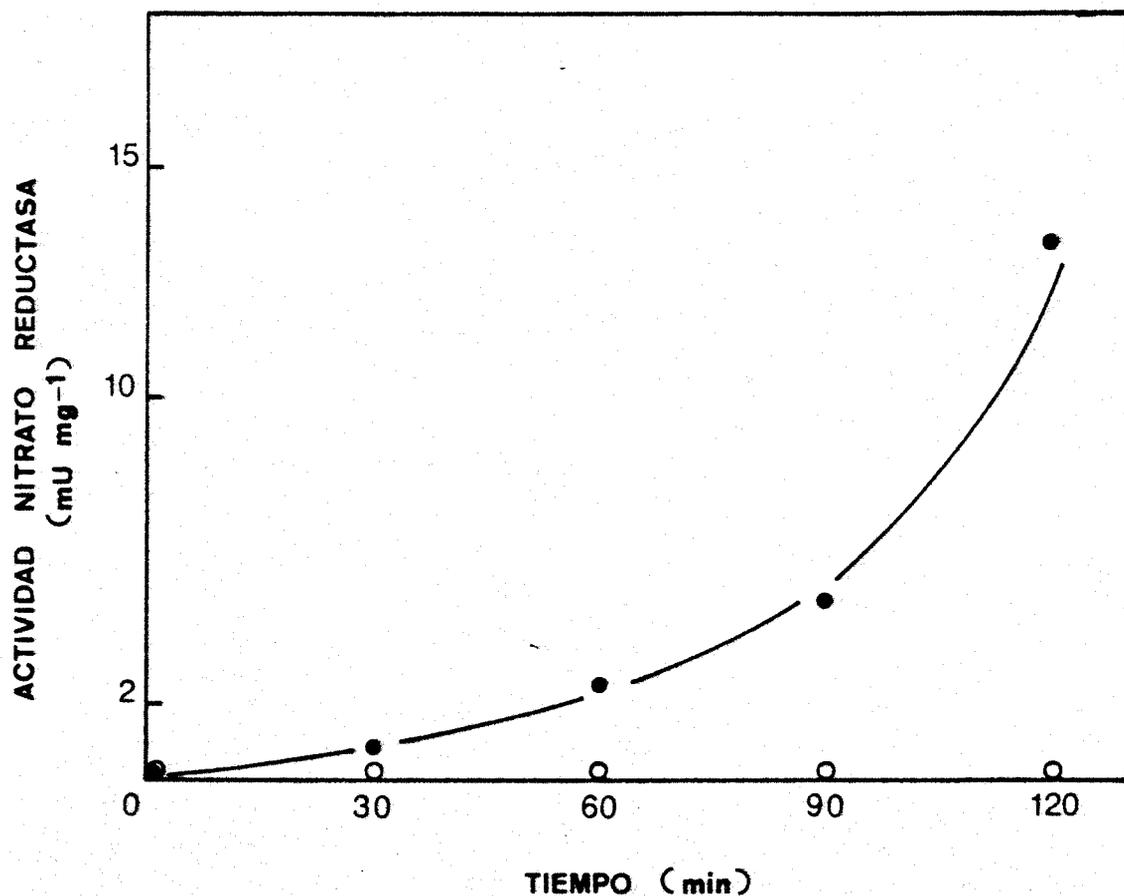


Fig.29.- Cambios iniciales de la actividad nitrato reductasa en presencia de cianato, en células de *A. chroococcum* cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig.25, excepto que, donde se indica se añadió: 0,5 mM de cianato (●—●) en lugar de  $\text{KNO}_3$ . Los círculos abiertos (○-○) representan a las células sin tratar con cianato.

cianato, desarrollan actividad nitrato reductasa como respuesta a la adición de cianato al medio de suspensión.

### III.C.3.- Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* con el sistema asimilador de nitrato inducido por cianato

Se ha estudiado el consumo de nitrato en células de *A. chroococcum* incubadas durante 4 h en presencia de cianato y nitrato respectivamente. En la Fig.30, se presenta que el consumo de nitrato en células con el sistema reductor inducido en presencia de cianato, presenta una velocidad de consumo similar a la alcanzada por células cuya nitrato reductasa es inducida en presencia de nitrato. Por otro lado, en la Tabla XXI, se presentan los niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa de las suspensiones celulares del experimento recogido en la Fig. 30. Además de las actividades del sistema reductor de nitrato, también se determinaron en este experimento los niveles de actividad glutamina sintetasa en presencia y ausencia de  $Mg^{++}$ . Ambas actividades eran mayores en las células provenientes de un medio con cianato que en aquellas procedentes de medio con nitrato (datos no presentados).

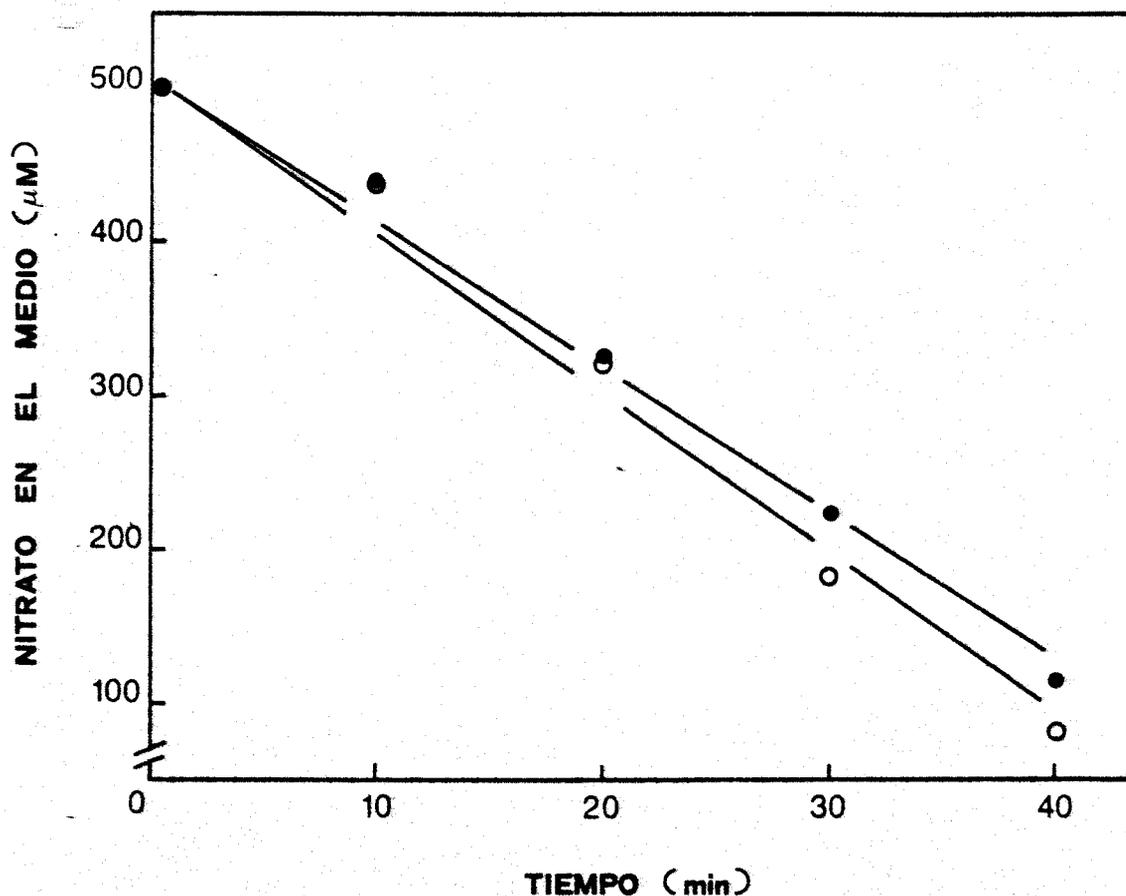


Fig. 30.- Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* con el sistema asimilador de nitrato inducido por cianato o nitrato en el medio de cultivo. Las células se crecieron en medio de cultivo sin fuente de nitrógeno combinado, cuando alcanzaron un estado de crecimiento correspondiente a una  $A_{560 \text{ nm}}$  de 0,46, se dividió dicho cultivo en dos mitades, a una de ellas se le añadió 5 mM de  $\text{KNO}_3$  (●-●) y a la otra mitad, 1 mM de  $\text{KCNO}$  (○-○). Se incubaron en agitación a  $27^\circ\text{C}$  durante 4 h, transcurridas éstas, se recogieron, lavaron y resuspendieron en tampón de ensayo suplementado con 1 g/l de manitol; a continuación, se añadió a ambas mitades 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$  y se determinó su desaparición del medio a los tiempos indicados. Las suspensiones celulares contenían 0,35 mg de proteína por ml.

Tabla XXI. Niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa en *A. chroocoeum* incubado en presencia de cianato y nitrato.

Inductor	Nitrato reductasa ( mU mg <sup>-1</sup> )	Nitrito reductasa ( mU mg <sup>-1</sup> )
Ninguno	0	0,2
Nitrato	17	21
Cianato	19	40

Las actividades enzimáticas se determinaron tolue-  
nizando una alícuota de las suspensiones celulares utili-  
zadas en el experimento recogido en la Fig.35; al inicio  
del ensayo de consumo de nitrato. Las suspensiones celula-  
res contenían 0,342 y 0,308 mg de proteína por ml de tampón  
con nitrato y cianato, respectivamente.

III.C.4.- Efecto del cloranfenicol sobre la inducción de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* en presencia de nitrato o cianato

Se ha descrito en apartados anteriores, que cuando células de *A. chroococcum* cultivadas en medios carentes de fuente de nitrógeno combinado o en medios con amonio -que no presentan, por tanto, actividad nitrato reductasa- son transferidos a medios conteniendo nitrato o cianato, se registraba un desarrollo de la actividad nitrato reductasa. En la Fig.31, se muestra que en presencia de cloranfenicol, que es un inhibidor de la síntesis de proteínas en organismos procariotas, no tiene lugar aquella inducción. Estos resultados ponen de manifiesto que el desarrollo de la actividad nitrato reductasa observado en células de *A. chroococcum* al ser transferidas de un medio sin nitrógeno combinado a un medio con cianato o nitrato, requiere la síntesis de nuevas moléculas de proteína, y no una reactivación de moléculas preexistentes.

III.C.5.- Efecto de la fuente de carbono sobre la inducción de la actividad nitrato reductasa y sobre el consumo de nitrato en células de *A. chroococcum* cultivadas en un medio sin fuente de nitrógeno combinado y transferidas a un medio con cianato o nitrato

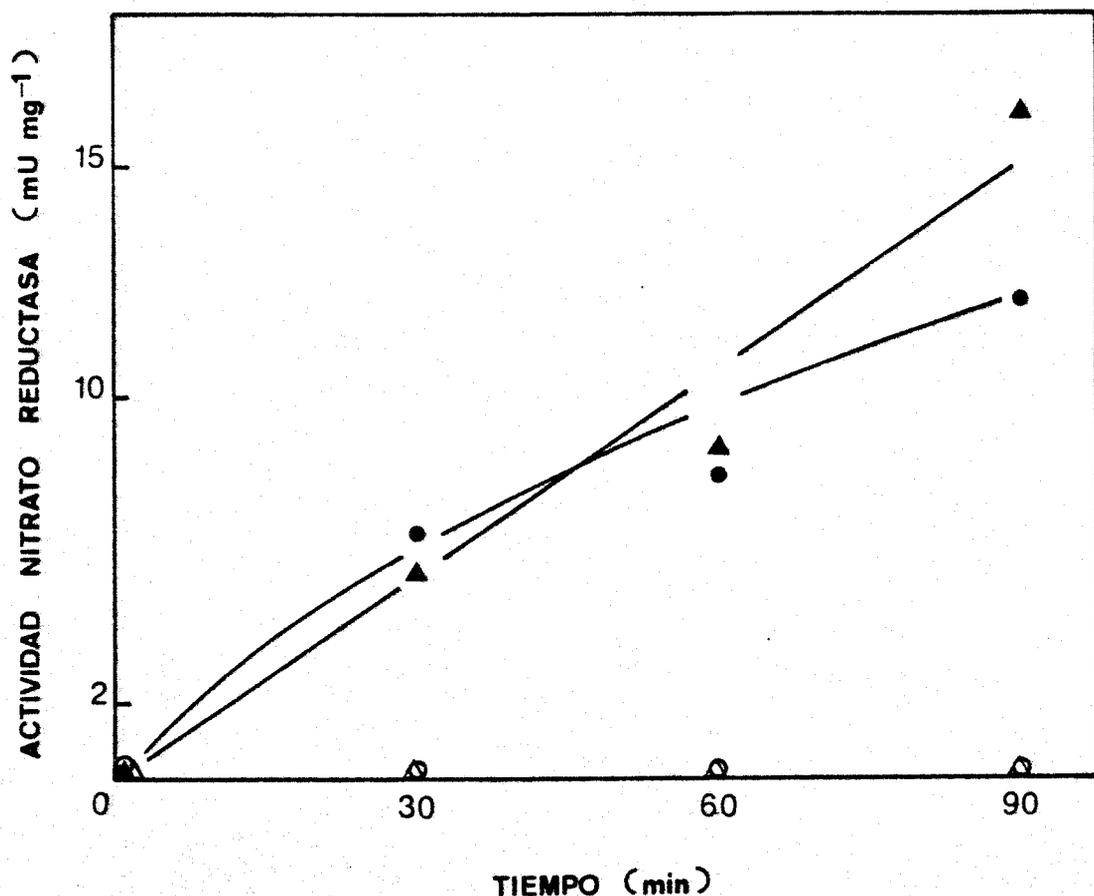


Fig.31.- Efecto del cloranfenicol sobre la inducción de la actividad nitrato reductasa de *A. chroococcum* por cianato o por nitrato. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig.27 excepto que, donde se indica, se añadió: 0,5 mM de KNO<sub>3</sub> (●-●); 0,5 mM de KNO<sub>3</sub> más 0,5 mM de cloranfenicol (Δ-Δ); 0,5 mM de KCNO (▲-▲) y 0,5 mM de KCNO y 0,5 mM de cloranfenicol (○-○). Las suspensiones celulares contenían 0,36 mg de proteína por ml de tampón .

En la Tabla XXII, se muestra que para que tenga lugar una inducción de la actividad nitrato reductasa en células provenientes de un medio sin nitrógeno fijado al transferirlas a un medio con cianato o nitrato, es necesario que haya una fuente de carbono disponible por las células. Por otra parte, se ha estudiado si el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* cuya nitrato reductasa ha sido inducida por cianato, requiere una fuente de carbono, como es el caso de aquellas células cuya nitrato reductasa se ha desarrollado en presencia de nitrato (apartado III.A.2.2.). En la Fig.32, se pone de manifiesto que para que tenga lugar consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* transferidas a un medio con cianato, es imprescindible que esté presente una fuente de carbono; esto demuestra que en estas condiciones también se requiere energía metabólica para poder consumir nitrato.

III.C.6.- Efecto de ión amonio sobre el consumo de nitrato en células de *A. chroococcum* cultivadas en un medio sin fuente de nitrógeno combinado y transferidas a un medio con cianato

Hemos estudiado en este apartado, el efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato en células donde la actividad nitrato reductasa ha sido desarrollada en presencia de cianato; en la Fig.33, se presenta que el ión amonio

Tabla XXII. Efecto de la fuente de carbono sobre la inducción de la actividad nitrato reductasa por cianato y nitrato en células de *A. chroococcum*.

Inductor	Adición	Actividad nitrato reductasa ( mU mg <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	Ninguna	< 1
KNO <sub>3</sub>	Manitol	10
KCNO	Ninguna	< 1
KCNO	Manitol	12

Las suspensiones celulares provenían de un medio sin fuente de nitrógeno. Se recogieron y lavaron como se describe en Materiales y Métodos, resuspendiéndose a continuación en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5. Se dividió la suspensión en dos mitades añadiéndose a una de ellas 1 mM de KNO<sub>3</sub> y 0,5 mM de KCNO a la otra mitad. Donde se indica se añadió manitol 1 g/l, incubándose dichas suspensiones en agitación a 27°C durante 80 min, transcurrido éstos, se tomaba una alícuota y se determinaba la actividad nitrato reductasa como se indica en Materiales y Métodos.

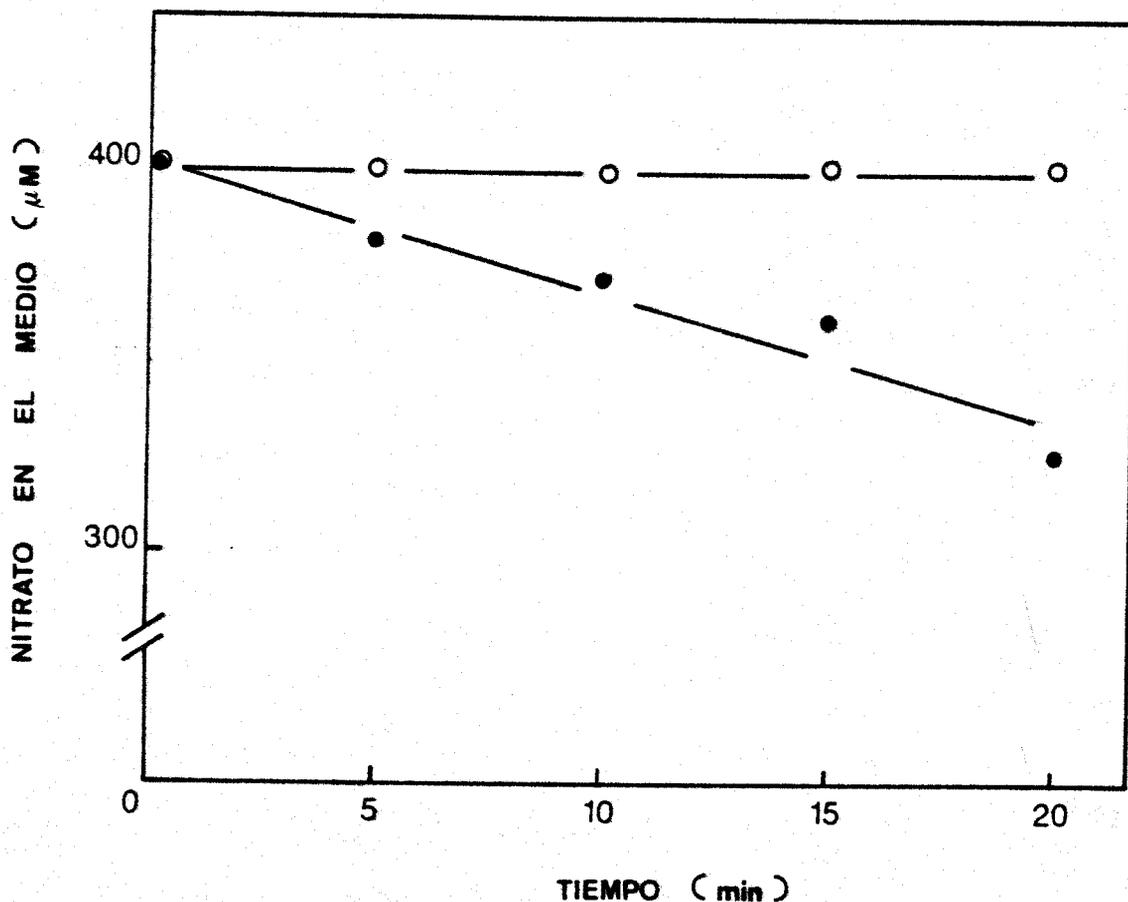


Fig.32.- Consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* cultivadas en medio sin fuente de nitrógeno combinado y transferidas a un medio con cianato, en presencia y ausencia de fuente de carbono. A células creciendo con aire como única fuente de nitrógeno se añadió, en esterilidad, 0,5 mM de KCNO y se incubaron en agitación durante 2 h a 27°C; a continuación, se recogieron, lavaron y resuspendieron en tampón MOPS-KOH 50 mM, pH 7,5. El consumo de nitrato se determinó en ausencia (O-O) y presencia (●-●) de 1 g/l de manitol. Las suspensiones celulares contenían 0,44 mg de proteína por ml la actividad nitrato reductasa era de 6,8 y 8 mU mg<sup>-1</sup> en las suspensiones sin y con manitol respectivamente.

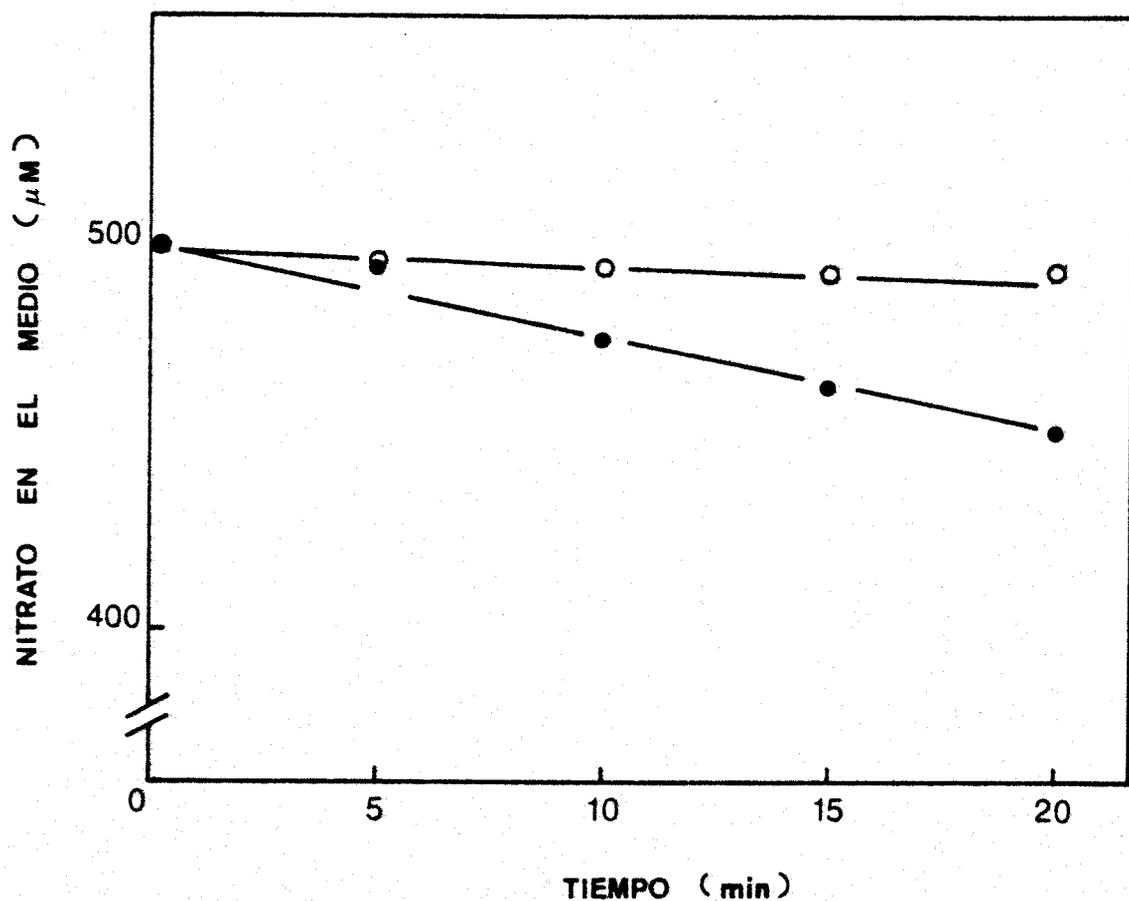


Fig.33.- Efecto del ión amonio sobre el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum*, pretratadas con cianato. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig.32 para el sistema de ensayo de consumo de nitrato en presencia de manitol excepto que, donde se indica, se añadió 0,5 mM de amonio más 0,5 mM de nitrato (O-O) y 0,5 mM de nitrato (●-●). Las suspensiones celulares contenían 0,39 mg de proteína por ml de tampón y la actividad nitrato reductasa era de 4 y 3,3 mU mg<sup>-1</sup>, respectivamente. El tiempo de incubación en presencia de cianato fue de 1 h aproximadamente.

inhibe el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* pretratadas con cianato.

Estos resultados parecen indicar que el sistema de transporte inducido en presencia de cianato es similar al inducido por nitrato.

### III.C.7.- Evolución de las actividades nitrogenasa y nitrato reductasa en presencia de cianato y nitrato

Como hemos podido comprobar en los apartados anteriores, parece ser que los sistemas de transporte que se desarrollan en presencia de cianato y nitrato presentan las mismas características. En este apartado hemos estudiado comparativamente las cinéticas de inducción de la nitrato reductasa por nitrato y cianato siguiendo la evolución de la actividad en períodos de tiempo superiores a los estudiados en los apartados anteriores. En la Fig.34 podemos comprobar que mientras que las células que son transferidas desde un medio sin fuente de nitrógeno fijado, a un medio con nitrato siguen desarrollando actividad nitrato reductasa al cabo de 7 h, las células transferidas a un medio con cianato, presentan un máximo de actividad a las 4 h de incubación, tras las cuales permanece constante. Como se observa en esta figura, los niveles de actividad alcanzados a las 4 h son similares para nitrato y cianato. En conexión con este experimento, es necesario subrayar que

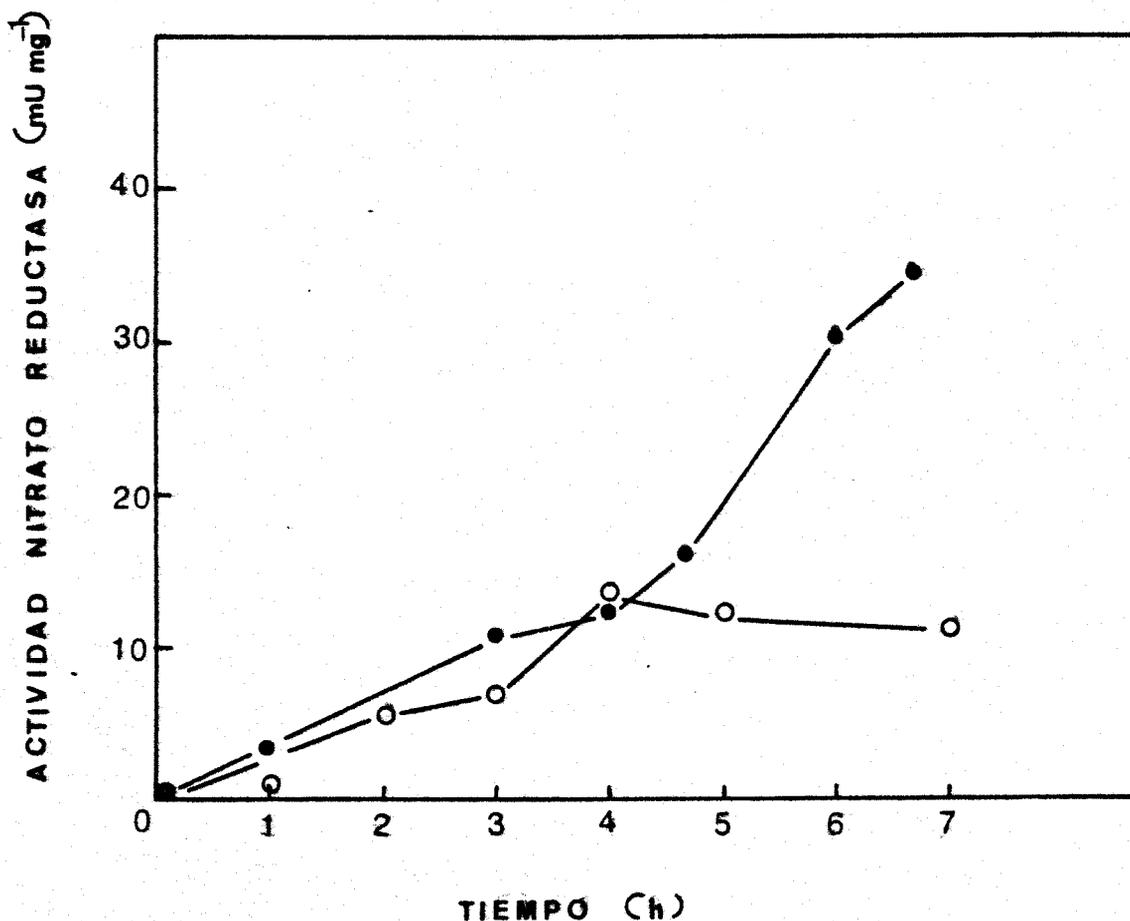


Fig.34.- *Cinética del desarrollo de la actividad nitrato reductasa de A. chroococcum en presencia de nitrato y cianato.* El experimento se llevó a cabo a partir de células crecidas en medio sin fuente de nitrógeno fijado hasta una  $A_{560\text{nm}}$  de 0,3; el cultivo se dividió en dos mitades añadiéndose a una de ellas 8 mM de  $\text{KNO}_3$  (●-●) y a la otra 1 mM de  $\text{KCNO}$  (○-○). A los tiempos que se indican, se tomaron alícuotas que se lavaron y toluenizaron como se señala en Materiales y Métodos y se determinaron las actividades nitrato reductasa.

mientras las células con nitrato habían experimentado un aumento en el crecimiento desde una  $A_{560 \text{ nm}} = 0,3$  hasta otra de  $A_{560 \text{ nm}} = 1,95$ , durante las 7 horas de duración del mismo, la suspensión que contenía cianato sólo cambió desde 0,3 hasta 0,5, lo que demuestra que éste último compuesto no es fácilmente metabolizable por *A. chroococcum* para actuar como fuente de nitrógeno. Como veremos a continuación, el cianato, por sí mismo, inhibía la actividad nitrogenasa de la suspensión celular que lo recibía; este dato corrobora la detención del crecimiento de *A. chroococcum*, como acabamos de discutir, en presencia de cianato bajo condiciones de fijación de dinitrógeno. Los resultados pertinentes están recogidos en la Tabla XIII, donde se muestra que la actividad nitrogenasa descendía hasta un 40% del valor original tras un período de incubación de 2 horas en presencia de cianato. También el nitrato originaba un decremento de la actividad nitrogenasa, bajando a un valor de 68% del inicial en el mismo período de 2 horas. Por el contrario, en ausencia de estos inhibidores, la capacidad de reducir acetileno experimentaba un aumento del 40% en relación con la actividad nitrogenasa a tiempo cero, aumento que es normal en un cultivo en fase exponencial de crecimiento.

Tabla XXIII. Inhibición de la actividad nitrogenasa de *A. chroococcum* en presencia de nitrato y cianato.

Adición	Actividad nitrogenasa a los tiempos	
	0	2 h
	( $\mu\text{moles etileno mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	
Ninguna	7,2	10,4
$\text{KNO}_3$	8,2	5,6
KCNO	6,0	2,4

Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la Fig.35, excepto que donde se indica, una suspensión celular equivalente a las tratadas con  $\text{KNO}_3$  o KCNO, no sufría adición alguna. La actividad nitrogenasa de media en alícuotas de 2 ml de los respectivos cultivos, como se especifica en Materiales y Métodos.

#### IV. DISCUSSION

En el trabajo que aquí se presenta, hemos estudiado la asimilación de nitrato por la bacteria aerobia estricta *Azotobacter chroococcum*. En la primera parte de esta memoria, hemos puesto a punto el método de ensayo de la asimilación de nitrato por esta bacteria, que está basado en el estudio de la desaparición de nitrato del medio. Este método de valoración presenta el inconveniente de que no nos permite distinguir las etapas de entrada y de reducción de nitrato, como hemos señalado en Introducción. La dificultad para separar estas dos etapas del proceso de asimilación de nitrato, se presenta en todos aquellos organismos que no pueden acumular nitrato en su interior, como es el caso de los organismos unicelulares carentes de vacuolas de almacenamiento. Por ello, los datos de que se disponen sobre la entrada de nitrato al interior celular son escasos en bacterias, salvo en aquellas donde para su estudio se han utilizado isótopos radioactivos, lo que permite demostrar la acumulación de nitrato en el interior celular. Así, los trabajos realizados en *Klebsiella pneumoniae* (Thayer y Huffaker, 1.982) y en *Pseudomonas capsulata* (Betlach et al., 1.981), han puesto de manifiesto que dichas bacterias pueden acumular nitrato a una concentración del orden de 7-10 veces mayor en el interior celular que en el exterior, lo que ha llevado a dichos autores a sugerir que, en estos organismos, las etapas de entrada y re-

ducción de nitrato están separadas y que el transporte de nitrato es un proceso acumulativo.

El estudio de la asimilación de nitrato en *A. chroococcum*, realizado en este trabajo, pone de manifiesto que es un proceso saturable por el sustrato y que presenta una afinidad por el nitrato mayor que la que presenta la nitrato reductasa, primera enzima del sistema reductor de nitrato. Estos datos apoyan la hipótesis de que el transporte de nitrato en este organismo no tiene lugar mediante simple difusión, sino que está facilitado por una permeasa, como ha sido postulado por diversos autores que ocurre en otros organismos, (Thayer y Huffaker, 1.982; Betlach et al., 1.981; Schloemer y Garrett, 1.974; Flores, 1.982). Sin embargo, aunque la  $K_m$  de la nitrato reductasa de *A. chroococcum* (Guerrero et al., 1.973), sea mayor (0,25 mM) que la  $K_m$  del sistema asimilador de nitrato determinada por nosotros (<42  $\mu$ M), hay que tener en cuenta que dicho parámetro ha sido determinado *in vitro* y utilizando donadores artificiales de electrones, no pudiendo descartarse, por tanto, la posibilidad de que la enzima posea una mayor afinidad por el nitrato *in vivo*. Por otro lado, el hecho de que la reducción de nitrato es también un proceso saturable, hace aventurado concluir que el transporte de nitrato en *A. chroococcum* está mediado por una permeasa. Sin embargo, la observación de que análogos del nitrato, tales como nitrito

y cianato, actúen como inhibidores del consumo de nitrato, como se muestra en las Figuras 16, 17, 18 y 19, sin afectar al sistema reductor del mismo, apoya la hipótesis de la existencia de un transporte facilitado por una permeasa.

La acción inhibidora del nitrito sobre el consumo de nitrato parece razonable localizarla a nivel de transporte de este ión más que sobre su sistema reductor, ya que el nitrito es un inductor de este sistema (Guerrero et al., 1.973). En relación con estos resultados, es importante hacer mención a los estudios realizados en *Anacystis nidulans* (Flores et al., 1.982), que han puesto de manifiesto la existencia de cierto grado de competición entre la utilización de nitrato y nitrito tanto en células tratadas con MSX, como en células sin tratar y, por otro lado, a los trabajos llevados a cabo en *Neurospora crassa* (Schloemer y Garrett, 1.974), que señalan al nitrato como un inhibidor no competitivo respecto al nitrato del sistema de entrada al interior celular. Por el contrario, los estudios realizados en algas verdes (Ullrich, 1.983; Syrett, 1.981; Florencio y Vega, 1.983), han llevado a la conclusión de que el nitrito es un inhibidor competitivo del consumo de nitrato.

En lo que respecta al cianato, en este trabajo se ha podido demostrar que es un inhibidor del consumo de nitrato en *A. chroococcum*. Se había descrito (Guerrero et al.,

1.973) que el cianato protege a la nitrato reductasa de *A. chroococcum* de la inactivación por ditionito y que en su presencia se estimula la actividad nitrato reductasa. Por otro lado, era también conocido que el cianato es un inhibidor competitivo respecto al nitrato de la nitrato reductasa de *Chlorella*, (Morris y Syrett, 1.963) y que protege a ésta de la inactivación por NADH y cianuro (Vega et al., 1.972). En esta misma línea, los estudios realizados en *Chlamydomonas reinhardtii* (Florencio y Vega, 1.981), señalan que el cianato inhibe el consumo de nitrato. Estos mismos autores, pudieron comprobar también que el cianato protege *in vivo* a la nitrato reductasa de la inactivación que sufre en ausencia de nitrato.

Los antecedentes bibliográficos junto con los datos obtenidos en nuestro trabajo, nos permiten proponer que tanto el nitrito como el cianato pueden actuar en *A. chroococcum* como inhibidores competitivos del sistema de transporte de nitrato. Las características que presenta el consumo de nitrato en este organismo, como son su carácter saturable por la concentración extracelular de nitrato; el ser inhibido por análogos estructurales de éste y la gran afinidad por el sustrato, parecen sugerir que el transporte de nitrato en *A. chroococcum* es un proceso mediado por una permeasa.

A continuación, estudiamos si este transporte mediado era de carácter activo. En el presente trabajo, hemos puesto de manifiesto que el consumo de nitrato por *A. chroococcum* es un proceso que requiere la presencia de una fuente de carbono metabolizable por este organismo y de aerobiosis, lo que señala un requerimiento de energía. El requerimiento de una fuente de carbono puede tener dos vertientes, una como fuente de energía y otra como fuente de esqueletos carbonados. Nosotros hemos podido comprobar que en ausencia de una fuente de carbono, pero en presencia de una fuente de energía artificial, *A. chroococcum* es capaz de consumir nitrato. Como fuente artificial de energía utilizamos el par donador de electrones ascorbato/PMS, del que se conocía que, en *Escherichia coli* (Wilson, 1.974), actúa cediendo electrones a la cadena respiratoria permitiendo la entrada de galactosa en ausencia de otra fuente de energía. Nuestros resultados (Tabla VIII, Fig.8) muestran que en presencia del par ascorbato/PMS y en ausencia de fuente de carbono, las células consumen oxígeno, es decir, tiene lugar un transporte de electrones a través de la cadena respiratoria que debe originar un gradiente electroquímico (Bhattacharyya et al., 1.977). El hecho de que en estas condiciones las células consuman nitrato, sugiere la dependencia del sistema de un estado energizado de la membrana. Hemos podido observar (ver Fig.8) que la

velocidad de consumo de nitrato con el par donador es menor que en presencia de una fuente de carbono. La explicación para esta diferencia podría radicar en la menor eficiencia respiratoria que presentan las células en presencia del par artificial, como puede observarse en la Tabla VIII. Es muy posible, por tanto, la existencia de un transporte activo para el nitrato como primer paso de la asimilación de este ión, aunque nuestros datos no pueden dilucidar qué componente del gradiente electroquímico interviene en el proceso.

En nuestro intento de caracterizar el tipo de energía que se requiere para que tenga lugar consumo de nitrato por *A. chroococcum*, se han utilizado diversos inhibidores metabólicos. Los resultados de los estudios encaminados a este propósito señalan, como puede observarse en la Fig.6, que en presencia de los desacoplantes FCCP y DNP se interrumpe rápida y drásticamente el consumo de nitrato, mientras que en presencia de DCCD, que es un inhibidor de ATPasas, no se afecta significativamente dicho consumo. Por otro lado, en la Tabla VII se ha presentado el efecto del FCCP y del DCCD sobre el sistema reductor de nitrato, que como allí puede observarse, no se ve afectado en presencia de estos inhibidores lo que parece indicar que ambos actúan a nivel de la entrada de nitrato y no a nivel de su reducción. Estos resultados sugieren que el transporte de nitra-

to por *A. chroococcum* es un sistema mediado por una permeasa y que depende del gradiente electroquímico de la membrada, pero que no está necesariamente mediado por ATP. A conclusiones similares llevaron los resultados obtenidos de los estudios realizados en *Rhodopseudomonas capsulata* (Jackson et al., 1.981). Sin embargo, un requerimiento absoluto de ATP para la entrada de nitrato al interior celular ha sido descrito en la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Flores et al., 1.982) y en la diatomea *Phaeodactylum tri-cornutum* (Cresswell y Syrett, 1.981). Menos precisos, por el contrario, son los resultados obtenidos por Schloemer y Garrett (1.974), quienes han descrito que la entrada de nitrato en *Neurospora crassa* no tiene lugar en presencia de cianuro o DNP, atribuyendo el efecto inhibitor de estos compuestos a su caracter de inhibidores metabólicos. Puesto que no tomaron en consideración el efecto del cianuro sobre la nitrato reductasa, a la que bloquea drásticamente, sus resultados no parecen concluyentes. Por otra parte, los estudios realizados en células de *Azotobacter vinelandii* (Barnes y Zimniak, 1.981), concernientes al transporte de amonio y metilamonio han mostrado que dicho transporte es inhibido drásticamente por los desacoplantes FCCP, como en el caso del nitrato por nosotros estudiado, y gramicidina D, en tanto que el DCCD y el arseniato, que bloquean la fosforilación, no afectan el transporte de amonio y metilamo-

nio, como hemos observado nosotros que ocurre con el transporte de nitrato. Los citados autores, encontraron también que el ionóforo valinomicina estimula la entrada de metilamonio en ausencia de  $K^+$  añadido mientras que la bloquea en presencia de  $K^+$ . Estos resultados son consistentes con un efecto hiperpolarizante sobre la membrana al salir  $K^+$  y con una acción despolarizante al entrar este ión. Dado que los estudios llevados a cabo con nigericina y monensina, que destruyen el gradiente de protones, sólo afectan ligeramente el transporte de amonio, se ha sugerido por los citados autores que el transporte de metilamonio y amonio es dependiente del componente eléctrico del gradiente electroquímico. De hecho, Barnes y Zimniak (1.981) encontraron que las células de *A. vinelandii* desarrollan un potencial eléctrico transmembrana de 170 a 180 mV, lo que indica la existencia de una fuerza impulsora utilizable para un transporte electrogénico del amonio.

Los resultados obtenidos por nosotros en este trabajo, parecen indicar que el sistema de transporte de nitrato en *A. chroococcum* es dependiente del gradiente electroquímico de la membrana. Sin embargo, nuestros datos no permiten determinar como está acoplado dicho transporte con el gradiente electroquímico. Las investigaciones realizadas en *Rhodospseudomonas capsulata* (Jackson et al., 1.981) señalan que en esta bacteria el nitrato entra en la célula

mediante un cotransporte con uno o más aniones, los que no necesariamente han de ser protones. En *Neurospora crassa* (Schloemer y Garrett, 1.974), se ha propuesto que el nitrato entra en la célula mediante un cotransporte anión-protón. Los trabajos realizados en este Departamento con la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Flores, 1.982), ponen de manifiesto que un mecanismo de acoplamiento mediante cotransporte nitrato-protón no parece probable, ya que el consumo de nitrato en este organismo se encuentra favorecido a valores altos de pH, es decir, cuando la concentración de protones en el medio es menor. Este mismo autor tampoco encontró un requerimiento específico por  $K^+$  ó  $Na^+$  para dicho transporte. En el caso de *A. chroococcum* se ha observado (Fig.9) que el consumo de nitrato presenta un pH óptimo a 6,5 y que la velocidad de consumo disminuye al aumentar el pH externo; esto podría apoyar la hipótesis de un cotransporte nitrato-protón, ya que al aumentar el pH disminuye el gradiente de protones de la membrana, lo que dificultaría la entrada de nitrato. Sin embargo, observamos también que a pH inferiores a 6,5 la velocidad de consumo de nitrato disminuye, aún cuando en estas condiciones debe aumentar el gradiente químico de la membrana. Se puede argüir, no obstante, que la permeasa es afectada de forma negativa a pH bajos, pudiéndose llegar a un compromiso entre un pH donde la permeasa no esté significativamente

afectada y un pH al que se favorezca la formación de un gradiente químico que impulse la entrada de nitrato.

Los estudios realizados en presencia de azida y cianuro, han mostrado que el consumo de nitrato por células de *A. chroococcum* se inhibe totalmente por tales inhibidores, pero mientras que el cianuro bloquea drásticamente a la actividad nitrato reductasa y, por tanto, al consumo de nitrato, la azida sólo afecta a la desaparición de nitrato, sin influir sobre aquella actividad enzimática. Estos resultados apoyan tanto el carácter activo del transporte de nitrato como la separación entre las etapas de entrada y reducción del mismo.

En el apartado III.B., hemos estudiado la regulación de la utilización de nitrato por *A. chroococcum*. Así, hemos observado que el consumo de nitrato por células cultivadas en medio con nitrato como fuente de nitrógeno, por lo que están en condiciones óptimas de un activo consumo de nitrato, presentan una drástica y rápida inhibición de dicho consumo en presencia de amonio. Esta prevención de la utilización de nitrato en presencia de amonio ha sido estudiada en una gran variedad de organismos: hongos (Morton, 1.956; Ullrich, 1.983; Schloemer y Garrett, 1.974); células de tabaco (Heimer y Filner, 1.971); diatomeas (Cresswell y Syrett, 1.979); algas verdes (Cramer y Myers,

1.949; Pistorius et al., 1.978); cianobacterias (Flores et al., 1.982; Ohmori et al., 1.977); bacterias (Jackson et al., 1.981; Betlach et al., 1.981; Thayer y Huffaker, 1.982). Los resultados presentados en este trabajo, señalan que esta inhibición por amonio del consumo de nitrato en *A. chroococcum* es de carácter reversible, desapareciendo una vez que el amonio se consume (Fig.11). En la mayoría de los organismos estudiados se observa igualmente, que en una solución conteniendo nitrato y amonio, el nitrato empieza a ser consumido cuando el amonio ha desaparecido del medio (Bailey et al., 1.972; Ferguson y Bollard, 1.969; Morton, 1.956; Syrett y Morris, 1.963; Flores et al., 1.982). Algunos autores han sugerido que la inhibición observada podría ejercerse sobre la actividad nitrato reductasa (Ferguson, 1.969; Morton, 1.956; Syrett y Morris, 1.963), pero esta teoría ha sido últimamente rechazada ya que se ha podido determinar, tanto en procariotas como en eucariotas, que la adición de amonio a células consumiendo nitrato activamente, produce una rápida interrupción del consumo de nitrato sin provocar, en cambio, alteraciones en los niveles de actividad nitrato reductasa (Flores et al., 1.982; Ohmori et al., 1.977; Pistorius et al., 1.978; Syrett y Leftley, 1.976; Tishner y Lorenzen, 1.979). Estudios realizados en la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*, (Cresswell y Syrett, 1.979), señalan que el amonio produce

una rápida y reversible inhibición de la acumulación de nitrato en el interior celular. Los resultados presentados en esta Memoria son concordantes con los anteriormente citados, puesto que al determinar las actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato en *A. chroococcum* después de añadir amonio a suspensiones celulares consumiendo nitrato, se producía una rápida interrupción del consumo de nitrato, pero la actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa no eran afectadas, al menos en los tiempos empleados por nosotros. Esto sugiere que el amonio actúa a nivel de entrada del nitrato y no sobre el sistema reductor de éste, al menos a corto plazo. Todavía no se conoce el mecanismo por el cual el amonio interfiere con el transporte de nitrato y las propuestas formuladas difieren ampliamente entre sí. Por ejemplo, en *Neurospora crassa* (Schloemer y Garrett, 1.974), el amonio ha sido descrito como un inhibidor del transporte de nitrato; en *Penicillium*, ha podido observarse que la entrada de nitrato es inhibida por amonio, pero esta inhibición es prevenida parcialmente en presencia de cicloheximida, lo que sugiere que el amonio induce la síntesis de una proteína que inhibe la entrada de nitrato (Goldsmith et al., 1.973).

Guardando cierta relación con estos resultados, se ha propuesto que, en *A. vinelandii*, el efecto inhibidor del amonio sobre la fijación de nitrógeno está causada, en úl-

tima instancia, por una modificación del estado de energía de la membrana causada por el transporte de amonio (Laane et al., 1.980). Sin embargo, en otros estudios realizados en *A. vinelandii* (Barnes y Zimniak, 1.981) sobre el transporte de amonio, no se pudo confirmar la despolarización de la membrana, debida al transporte de amonio, descrita por los autores anteriormente citados. Estos autores sugieren que puede haber un transporte de iones que compense la despolarización producida por un transporte electrogénico de amonio.

Volviendo de nuevo al mecanismo de acción del amonio sobre el transporte de nitrato, se ha avanzado que podría deberse a una interferencia de los procesos de transporte de amonio y nitrato, que podrían competir por algún elemento común a ambos sistemas de transporte o por una fuente de energía cuya disponibilidad fuese 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., 1.977). Por otra parte, el efecto inhibitor del amonio sobre la entrada de nitrato en algas, parece obedecer más a producto(s) de su asimilación que al propio amonio. Así, observaciones preliminares de Morton (1.956) y Syrett y Morris (1.963), habían puesto de manifiesto que el amonio no presenta efecto inhibitor sobre el consumo de nitrato en células sometidas a hambre de car-

bono, las cuales carecen de esqueletos carbonados donde pueda incorporarse el amonio para dar lugar al producto(s) inhibidor(es). Experimentos más recientes realizados en cianobacterias (Flores et al., 1.982), han revelado que en presencia de inhibidores específicos de la asimilación de amonio (MSX, azaserina), este ión no presenta efecto inhibidor sobre el consumo de nitrato. Estos resultados indican que se requiere que el amonio se incorpore en esqueletos carbonados para que tenga lugar la interrupción del consumo de nitrato en presencia de amonio.

La utilización de inhibidores de la ruta asimilatoria de amonio en los estudios por nosotros realizados en *A. chroococcum*, ha revelado que no es el propio amonio el responsable de la inhibición del consumo de nitrato por dichas células. Así, hemos podido comprobar que la adición de MSX, que es un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa de *Azotobacter* (Gordon y Brill, 1.974), a una suspensión celular consumiendo nitrato, provoca un aumento de la velocidad de consumo de dicho ión a la vez que una liberación de amonio, precisamente equimolecular con el nitrato consumido. Esto apoya la hipótesis aportada por Bárcena, (1.980) de que la única vía de asimilación de amonio por *A. chroococcum* es la ruta GS/GOGAT. De acuerdo con ello, se ha podido observar que la presencia de MSX evita que el consumo de nitrato sea inhibido por amonio,

ya que al estar bloqueada la glutamina sintetasa en estas condiciones, el amonio no puede incorporarse en esqueletos carbonados y dar origen al (los) metabolito(s) inhibidor(es). Por otro lado, el tratamiento de las células con fosfinotricina, que está descrito también como inhibidor de la glutamina sintetasa (Leason et al., 1.981; Lea et al. en prensa), protege sólo parcialmente de la inhibición por amonio del consumo de nitrato. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta (Tabla XIII) que la glutamina sintetasa está sólo parcialmente inhibida en estas condiciones, por lo que parte del amonio añadido se está asimilando. Estos resultados apuntan a que el control ejercido sobre el consumo de nitrato por metabolito(s) resultante(s) de la asimilación de amonio, es un proceso gradual, es decir, no es un sistema de control de todo o nada, sino que depende del grado de formación de dicho(s) metabolito(s), lo que permite una modulación muy fina del consumo de nitrato. El hecho de que la velocidad de consumo de nitrato en células tratadas con PPT sea inferior a la velocidad presentada por el control de células sin tratar, podría ser debido a algún efecto de la propia fosfinotricina sobre el sistema de transporte, ya que, por otro lado, los niveles de actividad del sistema reductor de nitrato no se ven afectados por el inhibidor.

El tratamiento de las células con azaserina, que es un inhibidor de glutamina amidotransferasas, por lo que inhibe a la GOGAT, segunda enzima de la ruta asimilatoria de amonio en *A. chroococcum*, así como el tratamiento con MSF--que es un inhibidor de la glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa- provoca, en ambos casos, un aumento de la velocidad de consumo de nitrato y la protección del mismo contra la inhibición por amonio.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el consumo de nitrato por *A. chroococcum* está regulado por producto(s) de la asimilación del propio nitrato, ya que células tratadas con MSX, azaserina y MSF, consumen dicho ión con mayor velocidad que células sin tratar, lo que sugiere que el nitrato una vez que entra en la célula y es asimilado, produce algún producto(s) que actúa controlando su entrada; al impedir la asimilación de amonio, se impide la formación de dicho(s) producto(s). Lógicamente, para la formación del (los) metabolito(s) regulador(es) del consumo de nitrato, es necesario que estén activas tanto la glutamina sintetasa como la glutamato sintasa. Conviene, por otro lado, resaltar que la azaserina es un inhibidor de glutamina amidotransferasas en general, por lo que no sólo inhibe a la GOGAT, sino también a otras vías posibles de formación del (de los) metabolito(s) inhibidor(es) mediada por la transferencia del grupo amido de la glutamina. La

naturaleza del (de los) metabolito(s) nos es, hasta ahora, desconocida.

Los estudios realizados en algas (Syrett, 1.981; Florencio y Vega, 1.981) y en cianobacterias (Flores, 1.982), señalan la necesidad de la presencia de  $\text{CO}_2$  para que tenga lugar consumo de nitrato en dichos organismos. En *A. nidulans* (Flores, 1.982), se pudo observar que el tratamiento con MSX obviaba el requerimiento de  $\text{CO}_2$  para el consumo de nitrato, proponiéndose que el  $\text{CO}_2$  tiene un efecto positivo sobre el consumo de nitrato por aportar esqueletos carbonados para eliminar los productos de la asimilación de amonio que actúan como inhibidores. Las células tratadas con MSX no requieren los metabolitos formados en la fijación de  $\text{CO}_2$ , ya que el amonio no se incorpora y, consecuentemente, no se forma(n) el (los) inhibidor(es). Sin embargo, en el trabajo citado, tampoco se excluye la posibilidad de que algún producto de la asimilación de  $\text{CO}_2$  desempeñe un papel de efector positivo sobre el consumo de nitrato.

Sometiendo las células de *A. nidulans* a hambre de nitrógeno, se encontró (Flores, 1.982) que en presencia de nitrato y amonio estas células consumían ambos nutrientes durante un periodo de unos 30-40 min, tras el cual se detenía el consumo de nitrato. Estas células también eran capa-

ces de consumir nitrato en ausencia de  $\text{CO}_2$ . La velocidad de consumo de nitrato en estas condiciones, iba disminuyendo a medida que progresa la asimilación del propio nitrato. Otros estudios realizados en *Chlorella* (Syrett y Morris, 1.963), muestran, de la misma forma, la ausencia de efecto inhibidor del amonio sobre el consumo de nitrato en células que habían sido sometidas a hambre de carbono, las cuales carecen de esqueletos carbonados donde incorporar el amonio.

Estos resultados hablan en favor de la hipótesis de que la utilización de nitrato está sometida a regulación por metabolitos cuyo nivel celular depende de la interacción entre los metabolismos asimilatorios del carbono y del nitrógeno.

En nuestros estudios sobre la regulación del consumo de nitrato por *A. chroococcum*, hemos ensayado dicho consumo en ausencia de una fuente de carbono y suministrando energía mediante el par ascorbato/PMS, como hemos descrito anteriormente. Hemos podido comprobar que, en estas condiciones, el consumo de nitrato no se afecta por la presencia de amonio. El descubrimiento de que en presencia del donador artificial la actividad glutamina sintetasa ha descendido a un 5% de su valor inicial, lleva a concluir que la prevención del efecto inhibidor del amonio se debe a un

efecto similar al observado en presencia de MSX. Esta inactivación de la glutamina sintetasa en presencia del par ascorbato/PMS puede ser provocada por la formación de radicales de oxígeno. En efecto, los estudios realizados en nuestro laboratorio (Paneque et al., 1.982; Llobell, 1.982), señalan que la GS de *A. chroococcum* es muy sensible a la acción de especies activas de oxígeno. La inactivación es irreversible y tiene lugar en presencia de  $BV^{2+}$  y NADH, y protegiéndose por catalasa, EDTA e histidina. Dicha inactivación tiene lugar tanto *in vivo* como *in vitro*, y está provocada por radicales  $OH\cdot$ . Puesto que se conoce que el PMS reducido origina radicales de oxígeno (Nishikimi et al., 1.972), parece probable que la inactivación de la GS observada por nosotros en presencia del par ascorbato/PMS, sea provocada por tales especies de oxígeno.

Como puede observarse en la Tabla I, las células preincubadas en presencia de manitol y nitrato presentan una baja capacidad de consumo de nitrato respecto a las células dejadas estar en ausencia de los citados compuestos. Esto podría explicarse por la acumulación del (de los) presunto(s) metabolito(s) responsable(s) de la regulación de la asimilación de nitrato, que no se habría(n) formado en las células incubadas en tampón sin ninguna adición. Es tentador concluir a partir de los datos de esta misma tabla, que la formación de este(os) metabolito(s) regulador(es)

requiere(n) nitrógeno y esqueletos carbonados. Las diferencias observadas en la velocidad de consumo de nitrato entre las células incubadas en presencia de manitol solamente y en aquellas incubadas sólo en presencia de nitrato, podrían explicarse considerando la ausencia de reservas de nitrógeno reducido en las primeras, lo que implicaría una menor concentración del metabolito(s) regulador(es), resultante de la incorporación de amonio en esqueletos carbonados. Por el contrario, en las células que se incubaron en presencia de fuente de nitrógeno podría haber concentraciones más altas de dicho(s) metabolito(s) regulador(es) debido a la existencia de reservas de esqueletos carbonados, por ejemplo, de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Senior et al., 1.972). Estos razonamientos apoyan la hipótesis anteriormente discutida de una regulación gradual de la asimilación de amonio por producto(s) de la incorporación del mismo en esqueletos carbonados.

En general, se ha descrito que en los organismos capaces de asimilar nitrato, incluyendo *A. chroococcum* (Guerrero et al., 1.973), los niveles de actividad nitrato reductasa son elevados cuando crecen en un medio con nitrato como fuente de nitrógeno y bajos cuando son cultivados en medios con dinitrógeno ó amonio. La nitrito reductasa, segunda enzima del sistema reductor de nitrato, sigue un

comportamiento similar (Vega et al., 1.973).

En los estudios realizados por nosotros, hemos podido comprobar que células crecidas con amonio ó dinitrógeno como única fuente de nitrógeno, no presentan capacidad de consumo de nitrato, apareciendo ésta tras incubar durante unos 20 min en presencia de nitrato y ausencia de amonio, tiempo éste que se requiere, como pudimos comprobar, para que se desarrollen ciertos niveles de actividad nitrato reductasa y nitrito reductasa. Cuando células procedentes de un medio con dinitrógeno como única fuente de nitrógeno son transferidas a un medio que contiene nitrato amónico, no consumen nitrato, ni es detectable el nivel de actividad nitrato reductasa hasta que no se asimila el amonio del medio. Esto sugiere que el nitrato podría actuar como inductor del sistema asimilador de nitrato y que el amonio, o algún(os) metabolito(s) de su asimilación, actuaría como represor del desarrollo del sistema. En apoyo de ello está el hecho de que cuando las células se suplementan con MSX, el desarrollo del sistema asimilador tiene lugar en presencia de nitrato amónico. También se ha podido comprobar que, en estas últimas condiciones, el desarrollo del sistema reductor de nitrato y el del sistema de entrada de este ión es más rápido que en ausencia de MSX. Ello puede ser debido, verosimilmente, a que en pre-

sencia del inhibidor no se forma el o los metabolitos que reprimen la biosíntesis del sistema asimilador de nitrato.

Como se ha indicado oportunamente, el sistema de consumo de nitrato no se induce en células sometidas a hambre de nitrógeno, al contrario de lo que se ha observado en otros organismos, tales como en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Cresswell y Syrett, 1.981), donde en ausencia de amonio y de nitrato, se desarrolla el sistema asimilador de nitrato. Este desarrollo es prevenido por cicloheximida, lo que indica que es dependiente de síntesis de proteína. En nuestro trabajo, hemos podido comprobar que en *A. chroococcum*, el desarrollo del sistema asimilador de nitrato es dependiente también de nueva síntesis de proteína, ya que no tiene lugar en presencia de cloranfenicol.

También se ha presentado en este trabajo, que el sistema asimilador de nitrato en *A. chroococcum* puede ser inducido por un análogo del nitrato, como es el caso del cianato. En su presencia, se desarrollan tanto las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa, como el sistema de entrada de nitrato. Es de destacar, que dicha inducción no tiene lugar en presencia de amonio y que el MSX protege contra el efecto represor del amonio. Al igual que la inducción por nitrato, el cloranfenicol inhibe la bio-

síntesis del sistema asimilador de nitrato por cianato. En ambos casos, la presencia de una fuente de carbono para que tenga lugar la inducción del citado sistema es un requisito indispensable, como lo es también para el consumo de nitrato por dichas células.

En relación con la inhibición del consumo de nitrato en *A. chroococcum* por cianato (ver Fig.16), es importante resaltar que, en *Chlamydomonas reinhardtii* (Florencio y Vega, 1.983), se ha encontrado que el cianato inhibe también la asimilación de nitrato, como ya hemos mencionado más arriba. Sin embargo, estos mismos autores han evidenciado experimentalmente que, aún en presencia de cianato, el nitrato es un inductor de la síntesis de la nitrato reductasa. Puesto que ellos habían encontrado que concentraciones tan bajas como 1  $\mu\text{M}$  de nitrato eran suficientes para promover una síntesis significativa de la nitrato reductasa, parece razonable asumir que cierta proporción de nitrato debe entrar en el interior celular en presencia de cianato, aunque por el método utilizado para su ensayo no pudieran detectar su desaparición del medio extracelular. Al contrario de lo que ocurre en *Azotobacter*, el cianato, por sí mismo, no induce la síntesis de la nitrato reductasa en *Chlamydomonas* (Florencio y Vega, 1.983).

Finalmente, es interesante resaltar que si bien el caracter inducible del sistema asimilador de nitrato en *Azotobacter* parece haber quedado claro con los datos del presente trabajo, no se puede decir lo mismo de su caracter represible por amonio. No se puede descartar, en efecto, que el amonio actúe impidiendo la entrada del inductor más que reprimiendo la síntesis del sistema, como se ha argumentado que puede ocurrir con el sistema reductor de nitrato de cianobacterias fijadoras de dinitrógeno (Herrero et al., 1.981).

## V. CONCLUSIONES

- 1.- En *Azotobacter chroococcum*, el transporte de nitrato al interior celular no tiene lugar por simple difusión, sino que está mediado por una permeasa de gran afinidad por el sustrato.
- 2.- El transporte de nitrato en *A. chroococcum* es un sistema mediado de carácter activo. La energía metabólica requerida para que tenga lugar este proceso proviene del gradiente electroquímico de protones, aunque no necesariamente a través de ATP.
- 3.- De acuerdo con la conclusión anterior, la entrada de nitrato al interior celular no tiene lugar en ausencia de fuente de carbono. En estas condiciones, el par artificial donador de electrones ascorbato/PMS puede actuar como fuente de energía para el sistema de transporte de nitrato.
- 4.- El ión amonio inhibe el consumo de nitrato por *A. chroococcum*. Esta inhibición es de carácter reversible, puesto que desaparece cuando se agota el amonio del medio, y, aparentemente, no está causada por el propio catión, sino por productos de su asimilación.
- 5.- La entrada de nitrato al interior celular y su posterior reducción enzimática a ión amonio se inducen en presencia de nitrato.

- 6.- El cianato, un análogo del nitrato, inhibe el sistema de transporte de éste en *A. chroococcum*. Por otra parte, el cianato induce la utilización de nitrato por este microorganismo.
- 7.- La inducción del sistema de utilización de nitrato en *A. chroococcum* depende estrictamente de nueva síntesis de proteína.
- 8.- El amonio impide la inducción del sistema de consumo de nitrato en presencia de nitrato o cianato.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- ADACHI, K. y SUZUKI, I. (1.977). Purification and properties of glutamate synthase from *Thiobacillus thiparus*. J. Bacteriol. 129 1173-1182.
- ARNON, D.I., McSWAIN, B.D., TSUJIMOTO, H.Y. y KEISHIRO, W. (1.974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. Biochim. Biophys. Acta 357, 221-245.
- BAILEY, J.L. (1.967). Techniques in protein chemistry, 2nd ed. p. 340. Elsevier, Amsterdam.
- BARCENA, J.A. (1.980). Enzimas de la asimilación de amonio en la bacteria *A. chroococcum*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- BARNES, E.M. y ZIMNIAK, P. (1.981). Transport of ammonium and methylammonium ions by *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 146, 512-516.
- BAYER, E., GUGEL, K., HAGELE, H., HOGENMAJER, H., JESSIPOW, S., KONIG, W.A. y ZAHNER, H. (1.972). Helv. Chim. Acta 55, 224.
- BAYLEY, J.M., KING, -J. y CAMBORG, O.L. (1.972). The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. Planta 105, 15-24.

- BEEVERS, L., y HAGEMAN, R.H. (1.972). The role of light in nitrate metabolism in higher plants. En: Photophysiology (Giese, P.A., ed.), vol. 7, pp. 85-113. Academic Press, New York.
- BENDER, R.A., JANSSEN, J.A., RESNICK, A.D., BLUMENBERG, M., FOOR, F. y MAGASANIK, B. (1.977). Biochemical parameters of G.S. from *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol. 129, 1001-1009.
- BERGMEYER, H.U. (1.974). Methoden der enzymatischen analyse 2nd, ed. Verlag Chemic, Weinheim.
- BETLACH, M.R., TIEDJE, J.M. y FIRESTONE, R.B. (1.981). Assimilatory nitrate uptake in *Pseudomonas fluorescens* studied using nitrogen-13. Arch. Microbiol. 129, 135-140.
- BHATTACHARYYA, P., SHAPIRO, S.A. y BARNES, E.M. Jr. (1.977). Generation of a transmembrane electric potential during respiration by *Azotobacter vinelandii* membrane vesicles. J. Bacteriol. 129, 756-762.
- BOLAND, M.J. (1.979). Kinetic mechanism of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur. J. Biochem. 99, 531-539.
- BROWN, C.M., MAC-DONALD, D.S. y MEERS, J.L. (1.974). Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Advac. Microbiol. Physiol. 11, 1-45.

- BUTZ, R.G. y JACKSON, W.A. (1.977). A mechanism for nitrate transport and reduction. *Rev. Phytochem.* 16, 409-417.
- CAWSE, P.A. (1.967). The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92, 311.
- CRAMER, M. y MYERS, J. (1.949). Nitrate reduction and assimilation in *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.* 32, 93-102.
- CRESSWELL, R.C. y SYRETT, P.J. (1.979). Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Sci. Lett.* 14, 321-325.
- CRESSWELL, R.C. y SYRETT, P.J. (1.981). Uptake of nitrate by the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Exp. Bot.* 32, 19-25.
- CULLIMORE, J.V. y SIMS, A.P. (1.981). Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochem.* 20, 597-600.
- DODDEMA, H., HOFSTRA, J.J., FEENSTRA, W.J. (1.978). Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. *Physiol. Plant.* 43, 343. 350.
- EADY, R.R., y POSTGATE, J.R. (1.974). Nitrogenase. *Nature* 249, 805-810.

- EISELE, R., y ULLRICH, W.R. (1.977). Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH<sup>-</sup> flux in *Ankistrodesmus braunii*. *Plant. Physiol.* 59, 18-21.
- ELMERICH, G. y AUBERT, J.P. (1.971). Synthesis of glutamate by a glutamine: 2-oxoglutarate amidotransferase (NADP oxido reductase) in *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 371-376.
- FERGUSON, A.R. (1.969). The nitrogen metabolism of *Spirodella oligorrhiza*. II. Control of the enzymes of nitrate assimilation. *Planta* 88, 353-363.
- FERGUSON, A.R. y BOLLARD, E.G. (1.969). Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. I. Utilization of ammonium, nitrate and nitrite. *Planta* 88, 344-352.
- FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1.981). Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochem.* 6, 1195-1200.
- FLORENCIO, F.J. (1.983). Separation, purification and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* 38, 531-538.
- FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1.983). Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 158, 288-293.

- FLORENCIO, F.J. y VEGA, J.M. (1.983). Regulation of the synthesis of the NAD(P)H-nitrate reductase complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. Z. Pflanzenphysiol. 5, 223-232.
- FLORES, E., GUERRERO, M.G. y LOSADA, M. (1.980). Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. Arch. Microbiol. 128, 137-144.
- FLORES, E., HERRERO, A. y GUERRERO, M.G. (1.982). Production of ammonium dependent on basic L-amino acids by *Anacystis nidulans*. Arch. Microbiol. 131 91-94.
- FLORES, E. (1.982). Utilización de nitrato por la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Mecanismo y regulación. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- GARRETT, R.H. y AMY, N.K. (1.978). Nitrate assimilation in fungi. Ad. Microbiol. Physiol. 18, 1-65.
- GOLDSMITH, J.J., LIVONI, J.P., NORBERG, C.L. y SEGAL, I.H. (1.973). Regulation of nitrate uptake in *Penicillium chrysogenum* by ammonium ion. Plant Physiol. 52, 362-367.
- GORDON, J.K. y BRILL, W.J. (1.974). Derepression of nitrogenase synthesis in the presence of excess  $\text{NH}_4$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 967-971.

- GUERRERO, M.G. (1.982). Assimilatory nitrate reduction. En: Techniques in bioproductivity and photosynthesis (Coombs, J., Hall, D.O., eds.), pp. 124-130. Pergamon Press, Oxford.
- GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1.973). Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. Arch. Microbiol. 91, 287-304.
- GUERRERO, M.G., VEGA, J.M. y LOSADA, M. (1.981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 169-204.
- HAROLD, F.N., BAARDA, J.R., BARON, C. y ABRAMS, A. (1.969). Inhibition of membrane-bound ATP and of cation transport in *Streptococcus faecalis* by DCCD. J. Biol. Chem. 244, 2261-2268.
- HEIMER, Y.M. y FILNER, P. (1970). Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells. II. Properties of a variant cell line. Biochim. Biophys. Acta 215, 152-165.
- HEIMER, Y.M. y FILNER, P. (1971). Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. III. The nitrate uptake system. Biochim. Biophys. Acta 230, 362-372.

- HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M. (1.972). Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 996-1003.
- HERRERO, A., FLORES, E. y GUERRERO, M.G. (1.981). Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* sp., strain 7119 and *Nostoc* sp. strain 6719. J. Bacteriol. 145, 175-180.
- HEWITT, E.J. y NOTTON, B.A. (1.980). Nitrate reductase systems in eukaryotic and prokaryotic organisms. En: Molybdenum and molybdenum-containing enzymes (Coughlan, M., ed.), pp. 273-325. Oxford. Pergamon.
- HO, C.H., IKAWA, T. y NISIZAWA, K. (1.976). Purification and properties of a nitrite reductase from *Porphyra yezoensis*. Plant Cell Physiol. 17, 417-430.
- HUCKLESBY, D.P., JAMES, D.M., BANWELL, M.J. y HEWITT, E.J. (1.976). Properties of nitrite reductase from *Cucurbita pepo*. Phytochem. 16, 599-603.
- JACKSON, M.A., JACKSON, J.B. y FERGUSON, S.J. (1.981). Direct observation with an electrode of uncoupler-sensitive assimilatory nitrate uptake by *Rhodospseudomonas capsulata*. FEBS Letters 136, 275-278.

- JOHANSSON, B. y GEST, H. (1.976). Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 128, 683-688.
- KATOH, T. (1.963). Nitrate reductase in photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Adadative formation of nitrate reductase. Plant, Cell, Physiol. 4, 199-215.
- KLEINSCHMIDT, J. y KLEINER, D. (1.978). The GS from *Azotobacter vinelandii*. Purification, characterization, regulation and localization. Eur. J. Biochem. 89, 51-60.
- KLEINER, D. (1.975). Ammonium uptake by nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii*. Arch. Microbiol. 104, 163-169.
- KLEINER, D. y CASTORPH, H. (1.982). Inhibition of ammonium (methylammonium) transport in *Klebsiella pneumoniae* by glutamine and glutamine analogues. FEBS Letters, 146, 201-203.
- LAANE, C., KRONE, W., KONINGS, W., HAAKER, H. y VEEGER, C. (1.980). Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. Eur. J. Biochem. 103, 39-46.

- LEA, P.J., JOY, K.W., RAMOS, J.L. y GUERRERO, M.G. The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxoderivates on plant metabolism. *Phytochem.* (en prensa).
- LEASON, M., CUNLIFE, D., PARKIN, D., LEA, P. y MIFLIN, B. (1.981). Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulphoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues. *Phytochem.* 21, 855-857.
- LEVINE, R.L., OLIVER, C.N., FULKS, R.M. y STADTMAN, E.R. (1.981). Turnover of bacterial glutamine synthetase oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2120-2124.
- LOSADA, M., GUERRERO, M.G. y VEGA, J.M. (1.981). The assimilatory reduction of nitrate. En: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur* (Bothe, H., Tresbt, A., eds.), pp. 30-63. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- LOSADA, M. y GUERRERO, M.G. (1.979). The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. En: *Photosynthesis in relation to model systems* (Barber, J., ed.), pp. 365-408. Elsevier, Amsterdam.
- LOSADA, M. (1.976). Metalloenzymes of the nitrate-reducing system. *J. Mol. Catal.* 1, 245-264.

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1.951). Protein measurement with the folin phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LUDWIG, R.A. (1.978). Control of ammonium assimilation in *Rhizobium 32H1*. *J. Bacteriol.* 135, 114-123.
- LLOBELL, A., BARCENA, J.A., VILA, R. y PANEQUE, A. (1.980). Flavin-Mediated photoreduction of nitrate by nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 98, 271-276.
- LLOBELL, A., BARCENA, J.A., REVILLA, E. y PANEQUE, A. Inactivating effect of hydrogen peroxide on nitrate reductase from *A. chroococcum*. *Internat. Biochem.* (en prensa).
- LLOBELL, A. (1.982). Efecto de especies activas del oxígeno sobre el sistema asimilador del nitrato en *Azotobacter chroococcum*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- MAGASANIK, B. (1.977). Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. *Trends Biochem. Sci.* 2, 9-12.
- MAGASANIK, B., PRIVAL, M., BRENCHLEY, J., TYLER, B., DE LEO, A., STREICHER, S., BENDER, R. y PARIS, C. (1.974). Glutamine synthetase as a regulator of enzyme synthesis. En: *Current topics in cellular regulation* (Horecker, B., Stadtman, E.R., eds.), vol. 8, pp. 119-138. Academic Press, New York.

- MANTSALA, P. y ZALKIN, H. (1.976). Glutamate synthase. Properties of the glutamine dependent activity. J. Biol. Chem. 251, 3294-3299.
- MEEKS, J.C., WOLK, C.P., THOMAS, S., LOCKAU, W., SHAFFER, P.W., AUSTIN, S.M., CHIEN, W.S. y GALONSKY, A. (1.977). The pathway of assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. J. Biol. Chem. 252, 7894-7900.
- MEERS, J.L.; TEMPEST, D.W. y BROWN, C.M. (1.970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate in some bacteria. J. Gen. Microbiol. 64. 187-194.
- MIFLIND, B.J. and LEA, P.J. (1.976). The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. TIBS, 1, 103-106.
- MORRIS, I.; SYRETT, P.J. (1.963). The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. Arch. Microbiol. 47, 32-41.
- MORRIS, I. y SYRETT, P.J. (1.963). Cyanate inhibition of nitrate reductase. Biochim. Biophys. Acta. 77, 649-650.
- MORTENSON, L.E. (1.979). Structure and function of nitrogenase. Ann. Rev. Biochem. 48, 387-418.

- MORTON, A.G. y MACMILLAN, A. (1.954). The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exp. Bot.* 5, 232-252.
- MORTON, A.G. (1.956). A study of nitrate reduction in mould fungi. *J. Exp. Bot.* 7, 97-112.
- NAGATANI, H., SHIMIZU, M. y VALENTINE, R.C. (1.971). The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* 79, 164-175.
- NISHIKIMI, M., RAO, N.A. y YAGI, K. (1.972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 86, 849-854.
- OHMORI, M., OHMORI, K. y STROTMAN, H. (1.977). Inhibition of nitrate uptake by ammonium in a blue-green algae *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* 114, 225-229.
- PADAN, E., ZILBERSTEIN, D. y ROTTENBERG, H. (1.976). The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *Eur. J. Biochem.* 63, 533-541.
- PANEQUE, A., BARCENA, J.A., CORDERO, N., REVILLA, E. y LLOBELL, A. (1.982). Benzil viologen-mediated *in vivo* and *in vitro* inactivation of glutamine synthetase in *Azotobacter chroococcum*. *Mol. Cell Biochem.* 49, 33-41.

- PISTORIUS, E.K., FUNKHOUSER, E.A. y VOSS, H. (1978). Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. *Planta* 141, 279-282.
- PRUSINER, S. y STADTMAN, E.R. (ed.) (1.973). En: The Enzymes of Glutamine Metabolism. Academic Press, New York.
- RIGANO, C. y VIOLANTE, U. (1.973). Effect of nitrate, ammonia y nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in *Cyanidium caldarium*. *Arch. Mikrobiol.* 90, 27-33.
- ROON, R.J., EVEN, H.L. y LARIMORE, F. (1.974). Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 118, 89-95.
- SCHMIDT, C.N.G. y JERVIS, L. (1.980). Affinity purification of glutamate synthase from *E. coli*. *Anal. Biochem.* 104, 127-129.
- SENIOR, P.J.; BEECH, G.A.; RITCHIE, A.F. y DAWES, E.P. (1.972). The role of oxygen limitation in the formation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128, 1193-1201.
- SERRA, J.L.; LLAMA, M.J. y CADENAS, E. (1.978). Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum* II. Regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 62, 991-994.

- SHAPIRO, B. y STADTMAN, E. (1.970). The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 24, 501-524.
- SCHLOEMER, R.H. y GARRETT, R.H. (1.974). Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 118, 259-269.
- SIEDEL, J. y SHELTON, E. (1.979). Purification and properties of *Azotobacter vinelandii* glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 214-224.
- SNELL, F.D. y SNELL, C.T. (1.949). Colorimetric methods of analysis, Vol. 3, pp. 804-805. Van Nostrand, New York.
- SOSA, F.M.; ORTEGA, T. y BAREA, J.L. (1.978). Mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* affected in the nitrate assimilation capability. *Plant Sci. Lett.* 11, 51-58.
- STADTMAN, E.R.; SMYRNIOTIS, P.Z.; DAVIS, J.N. y WITTENBERGER, M.E. (1.979). Enzymic procedures for determining the average state of adenilation of *E. coli* glutamine synthetase. *Anal. Biochem.* 95, 275-285.
- STEWART, W.D.P.; FITZGERALD, G.D. y BURRIS, R.H. (1.967). In situ studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 2071-2078.
- SYRETT, P.J. y LEFTLEY, J.W. (1.976). Nitrate and urea assimilation by algae. En: *Perspectives in Experimental Biology* (N. Sunderland, ed.), Vol. 2, pp. 221-234, Oxford: Pergamon.

- SYRETT, P.J. y MORRIS, I. (1.963). The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta 67, 566-575.
- SYRETT, P.J. y HIPKIN, C.R. (1.973). The appearance of nitrate reductase activity in nitrogen-starved cells of *Ankistrodesmus braunii*. Planta 111, 57-64.
- SYRETT, P.J. (1.981). Nitrogen metabolism of microalgae. Can. Bull. Fish Aquat. Sci. 210, 182-210.
- TEMPEST, D.W.; MEERS, J.L. y BROWN, C.M. (1.973). En: The Enzymes of Glutamine Metabolism (Prusiner, S. y Stadtman, E.R., eds.), pp. 167, Academic Press, New York.
- THACKER, A. y SYRETT, P.J. (1.972). Disappearance of nitrate reductase activity from *Chlamydomonas reinhardtii*. New Phytol. 71:435-441.
- THAYER, J.R. y HUFFAKER, R. (1.982). Kinetic evaluation, using <sup>13</sup>N, reveals two assimilatory nitrate transport systems in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 149, 198-202.
- THOMPSON, J.P. y SKERMAN, V.B.D. (1.979). En: Azotobacteraceae: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen-fixing bacteria (Thompson, J.P. y Skerman, V.B.D., eds.) pp. 262-267, Academic Press, London.
- TISCHNER, R. y LORENZEN, H. (1.979). Nitrate uptake and nitrate reduction in Synchronous *Chlorella*. Planta 146, 287-292.

- TORTOLERO, M., VILA, R. y PANEQUE, A. (1.975). Ferredoxin-dependent nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Plant Sci. Lett.* 5, 141-145.
- TRONICK, S.R., CIARDI, J.E. y STADTMAN, E.R. (1.973). Comparative biochemical and immunological studies of bacterial glutamine synthetases. *J. Bacteriol.* 115, 858-868.
- TYLER, B. (1.976). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.
- ULLRICH, W.R. (1.983). Uptake and reduction of nitrate: Algae and fungi. En: *Encyclopedia of Plant Physiol.* (Läuchli, A. y Bialeski, R.L., eds.), vol. 15, pp. 376-298, Springer, Berlin-Heidelberg, New York.
- VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1.971). Role of molybdenum in nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.* 48, 294-299.
- VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1.973). Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.* 133, 701-708.
- VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. y APARICIO, P.J. (1.972). NADH-nitrate reductase de *Chlorella*: nouvelle contribution a l'etude de ses propriétés. *Physiol. Vég.* 10, 637-652.

- VENNESLAND, B. y GUERRERO, M.G. (1.979). Reduction of nitrate and nitrite. En: Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiol. new ser. (Gibbs, M. y Latzko, E. eds.), vol. 6. Springer, Berlin-Heidelberg, New York.
- VILLALOBO, A.; ROLDAN, J.M.; RIVAS, J. y CARDENAS, J. (1.977). Assimilatory nitrate reductase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch. Microbiol. 112, 127-132.
- WILSON, D.B. (1.974). Source of energy for *E. coli* galactose transport systems induced by galactose. J. Bacteriol. 120, 866-871.
- ZUMFT, W.G. (1.972). Ferredoxin: nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 276, 363-375.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

doña María Elisa Revilla Torres  
titulada "Transporte y Asimilación de Nitrato en la  
bacteria Aerobia Azotobacter Chroococcum"

se acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "cum  
laude"

Sevilla 17 de Febrero 1.984

El Vocal.

El Vocal.

El Vocal.

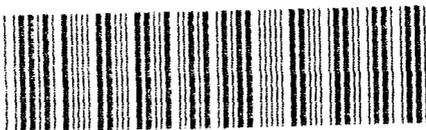
Presidente.

El Secretario.

El Doctorado.

JRM  
El Doctorado.

Elisa Revilla



500293077

FRI E TO 089

293077