

R. 10896



V/12

NITRATO REDUCTASA ASIMILATORIA DE LA BACTERIA  
Acinetobacter carboaceticus



Tesis presentada para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía  
por el Licenciado  
Don Antonio Villalobo Polo

A large, stylized handwritten signature in black ink.

Sevilla, Julio de 1976

El Director del Trabajo

El Catedrático Ponente

A handwritten signature in black ink, which appears to be "Jacobo Cárdenas".

A large, stylized handwritten signature in black ink.

Dr. Jacobo Cárdenas Torres  
Profesor de Bioquímica



MANUEL LOSADA VILLASANTE, Catedrático de Bioquímica,  
de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Se-  
villa

CERTIFICA: Que el presente trabajo ha sido realizado  
en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de  
Ciencias bajo la dirección del Dr. JACOBO CARDENAS TO  
RRES

Sevilla a 1 de Julio de 1976

*Manuel Losada*

---

En primer lugar agradezco al Prof. D. Manuel Losada Villasante el haberme acogido en su equipo de investigación y haberme orientado en la realización de esta Tesis así como cuantas críticas ha realizado durante el transcurso de la misma.

A los Doctores Jacobo Cárdenas Torres y Joaquin Rivas Florido por su dirección y formación científica a la que tanto han contribuido.

A los Doctores Antonio Paneque, Enrique Palácian, Miguel Garcia Guerrero, Carlos Gomez-Moreno, Fernando de la Rosa, José M<sup>a</sup> Maldonado, Juan Lopez Barea, Francisco Castillo, Pedro Aparicio, Angel M<sup>a</sup> Relimpio y Joaquin Herrera por su apoyo científico, y en especial a la Dra Maria Tortolero que amablemente me cedió las preparaciones de ferredoxina de Azotobacter.

A mis compañeros, Francisco Sosa, Fernando Calero, Pedro Candau, José Miguel Méndez, Jesús Diez-Dapena, Reyes Vila, y José Antonio Bárcenas, especialmente a José Manuel Roldán y Rafael Picorell por su directa participación en este trabajo.

A mis amigos y compañeros Carlos Manzano, Alicia Chaparro y Trini Ortega debo, no solo un aprender cotidiano en el campo científico sino también un apoyo humano durante mi estancia en este Departamento difícilmente superable.

A mi amigo José Moreno por su inestimable ayuda técnica y a M<sup>a</sup> José Pérez de León y Teresa Silva Cueto por la confección de este trabajo.

Por último quiero agradecer su apoyo económico a las siguientes instituciones: III Plan Nacional de Desarrollo, Philips Research Laboratories (Holanda) y National Science Foundation, U.S.A. (6F-44115).

A Marietta

## Indice

ABREVIATURAS .....	14
I INTRODUCCION.....	16
II MATERIALES Y METODOS.....	23
1 CULTIVO DEL MICROORGANISMO .....	24
1.1 Material biológico utilizado .....	24
1.2 Condiciones y medio de cultivo standard .....	24
1.3 Mantenimiento del inóculo en medio líquido .....	25
1.4 Variaciones de las condiciones de cultivo standard	
1.4.1 <i>Cultivos en grandes volúmenes</i> .....	25
1.4.2 <i>Cultivos con concentraciones de sales bajas</i> <i>y carentes de NTA</i> .....	26
1.4.3 <i>Cultivos deficientes en molibdeno e hierro</i> ..	27
1.4.4 <i>Cultivos con otras fuentes de nitrógeno</i> ..	27
1.5 Crecimiento en medio sólido .....	28
1.6 Conservación de la estirpe a bajas temperaturas..	29
2 PREPARACION DE EXTRACTOS ACELULARES .....	29
3 ENZIMAS .....	30
3.1 Purificación de la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	30
3.1.1 <i>Adsorción en DEAE-celulosa</i> .....	31
3.1.2 <i>Precipitación fraccionada con sulfato amónico</i> <i>co</i> .....	31
3.1.3 <i>Filtración por Sephadex G-25</i> .....	32
3.2 Purificación de ferredoxina de <u>Azotobacter</u> .....	32
3.3 Purificación de la ferredoxina-NADP <sup>+</sup> -reductasa de espinacas .....	32

3.4	Preparación de cloroplastos de espinacas .....	32
3.5	Preparación de las células para la determinación de actividades enzimáticas "in situ" .....	33
3.6	Ensayo de las actividades enzimáticas .....	33
3.6.1	<i>Ensayo normal de la nitrato reductasa</i> .....	33
3.6.2	<i>Ensayo de las NAD(P)H diaforasas</i> .....	34
3.6.3	<i>Ensayo de la nitrito reductasa</i> .....	35
3.6.4	<i>Ensayo de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa de espinacas</i> .....	36
3.6.5	<i>Ensayo de las ferredoxinas</i> .....	36
4	TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS .....	36
4.1	Centrifugaciones .....	36
4.2	Concentración de proteínas .....	37
4.3	Cromatografía de filtración por gel .....	37
4.4	Medidas de pH .....	37
4.5	Técnicas utilizadas para estudios en anaerobiosis ....	38
4.6	Centrifugaciones en gradiente de sacarosa .....	38
4.7	Determinación del peso molecular por filtración en gel	39
4.8	Electroforesis de disco sobre gel de poliacrilamida..	40
4.9	Determinaciones espectrofotométricas .....	41
4.10	Determinación del crecimiento celular .....	41
4.11	Determinación de clorofila .....	41
4.12	Determinación de proteína .....	41
4.13	Determinación de nitrato .....	42
4.14	Determinación de nitrito .....	42
4.15	Determinación de amonio .....	42

5	REACTIVOS .....	42
III	RESULTADOS .....	44
1	CARACTERIZACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	45
1.1	Donadores de electrones y cofactores para la nitrato reductasa .....	45
1.2	Reducción enzimática de nitrato con metil viológeno reducido químicamente con ditionito .....	45
1.3	Relación entre la concentración de proteína y la actividad de la nitrato reductasa .....	47
1.4	Relación entre el tiempo de ensayo y la actividad de la nitrato reductasa a distintas temperaturas .....	47
1.5	Relación entre el pH de ensayo y la actividad de la nitrato reductasa .....	47
1.6	Determinación de la Km para el nitrato .....	52
1.7	Determinación de la Km para el metil viológeno .....	52
1.8	Inhibidores de la actividad nitrato reductasa .....	57
1.9	Peso molecular de la nitrato reductasa .....	57
1.10	Coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa .....	57
2	PAPEL DEL MOLIBDENO Y DEL HIERRO EN LA ASIMILACION DEL NITRATO EN <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	62
2.1	Efecto del tungstato sobre el crecimiento de células de <u>Acinetobacter</u> cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno .....	62
2.2	Efecto inhibidor del tungstato a distintas concentraciones sobre el crecimiento de <u>Acinetobacter</u> cultivadas en nitrato .....	62



2.3	Efecto del tungstato sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	65
2.4	Efecto del molibdato sobre el crecimiento de <u>Acinetobacter</u> en medios con nitrato y en presencia de tungstato .....	65
2.5	Efecto del molibdato sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> cultivadas en nitrato y en presencia de tungstato .....	68
2.6	Efecto del hierro sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	68
3	INACTIVACION Y REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	68
3.1	Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	68
3.2	Reducción de nitrato en presencia de cianato por la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> con metil viológeno reducido químicamente con ditionito .....	71
3.3	Efecto de la concentración de cianato sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	71
3.4	Relación entre la concentración de enzima y la actividad nitrato reductasa en presencia y en ausencia de cianato .....	75
3.5	Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa ensayada a baja temperatura .....	75
3.6	Reactivación con cianato a 2°C de la nitrato reductasa inactivada previamente en el ensayo a 30°C ..	75
3.7	Efecto de la concentración de nitrato y metil viológeno sobre la actividad nitrato reductasa ensayada en presencia de cianato .....	80

3.8	Efecto de distintas concentraciones de nitrato sobre la inactivación de la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> reducida con ditionito .....	80
3.9	Cinética de inactivación de la nitrato reductasa por ditionito y bajas concentraciones de nitrato .....	83
3.10	Protección por cianato de la inactivación de la nitrato reductasa producida por ditionito y nitrato .....	83
3.11	Reactivación por cianato de la inactivación producida por ditionito y nitrato sobre la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	83
3.12	Requerimiento de ditionito para la reactivación por cianato de la nitrato reductasa previamente inactivada por ditionito y nitrato .....	89
3.13	Efecto del metil viológeno sobre la nitrato reductasa inactivada por ditionito y nitrato .....	89
3.14	Unión reversible del cianato con la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	89
3.15	Efecto del carbamil fosfato sobre la actividad nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	93
4	REGULACION DE LA SINTESIS DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	93
4.1	Represión por amonio de la síntesis de la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	93
4.2	Derepresión de la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	95
5	LA FERREDOXINA COMO DONADOR DE ELECTRONES DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	95
5.1	La ferredoxina de <u>Azotobacter</u> como donador de electrones de la nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> ....	95

5.1.1	<i>Reducción de nitrato por ferredoxina reducida con un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados</i> .....	95
5.1.2	<i>Reducción de nitrato por ferredoxina reducida con un sistema auxiliar ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa y NADPH</i> .....	99
5.2	<b>Aislamiento y purificación de la ferredoxina de <u>Acinetobacter</u></b> .....	99
5.2.1	<i>Preparación de extractos acelulares y adsorción de la ferredoxina sobre DEAE-celulosa...</i>	101
5.2.2	<i>Cromatografía en DEAE-celulosa por gradiente lineal de cloruro</i> .....	102
5.2.3	<i>Concentración de la preparación y filtración por Sephadex G-25</i> .....	102
5.3	<b>Homogeneidad electroforética en gel de poliacrilamida de la ferredoxina de <u>Acinetobacter</u></b> .....	103
5.4	<b>Espectro de absorción de la ferredoxina de <u>Acinetobacter</u></b> .....	103
5.5	<b>Fotoreducción de NADP<sup>+</sup> mediante cloroplastos iluminados de espinacas y ferredoxina de <u>Acinetobacter</u></b> ..	106
5.6	<b>Oxidación de NADPH mediante ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa de espinaca utilizando como aceptor de electrones la ferredoxina de <u>Acinetobacter</u></b> .....	106
5.7	<b>Reducción enzimática de nitrato mediante la nitrato reductasa y ferredoxina de <u>Acinetobacter</u> reducida mediante un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados</b> .....	106

6	PAPEL DE LAS NAD(P)H OXIDOREDUCTASAS DEPENDIENTES DE VIOLÓGENOS EN LA REDUCCION DEL NITRATO EN <u>Acinetobacter calcoaceticus</u> .....	109
6.1	Reducción enzimática de nitrato mediante los piridin nucleótidos reducidos y los viológenos .....	109
6.2	Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y benzil viológeno .....	109
6.3	Reducción enzimática de nitrato mediante los piridin nucleótidos y las flavinas .....	113
6.4	Efecto de la concentración de FAD sobre la reducción enzimática del nitrato por NADH .....	113
6.5	Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y FAD .....	113
6.6	Actividad NAD(P)H diaforasa en los extractos acelulares de <u>Acinetobacter</u> .....	117
6.7	Separación de las actividades NAD(P)H diaforasas y nitrato reductasa de <u>Acinetobacter</u> .....	117
6.8	Determinación del peso molecular de las NAD(P)H diaforasas de <u>Acinetobacter</u> .....	122
6.9	Aislamiento y purificación parcial de las NAD(P)H diaforasas de <u>Acinetobacter</u> .....	122
6.10	Caracterización parcial de la NADPH diaforasa pesada de <u>Acinetobacter</u> .....	126
6.10.1	<i>Aceptores de electrones de la NADPH-diaforasa pesada</i> .....	126
6.10.2	<i>Reducción enzimática del DPIIP mediante la NADPH-diaforasa pesada</i> .....	126
6.10.3	<i>Determinación de la Km para el NADPH de la NADPH-diaforasa pesada</i> .....	126

6.10.4	<i>Efecto de la temperatura sobre la NADPH diaforasa pesada</i> .....	130
6.10.5	<i>Efecto de distintos compuestos sobre la inactivación térmica de la NADPH diaforasa pesada</i> ..	130
6.10.6	<i>Efecto de las flavinas sobre la NADPH-diaforasa pesada</i> .....	130
6.10.7	<i>Inactivación de la NADPH-diaforasa pesada por NADPH</i> .....	130
6.11	<i>Caracterización parcial de la NADH-diaforasa ligera de <u>Acinetobacter</u></i> .....	134
6.11.1	<i>Aceptores de electrones para la NADH-diaforasa ligera</i> .....	134
6.11.2	<i>Reducción enzimática del DPIIP mediante la NADH-diaforasa ligera</i> .....	134
6.11.3	<i>Protección contra la inactivación térmica de la NADH diaforasa ligera de <u>Acinetobacter</u></i> .....	134
IV	DISCUSION .....	138
V	CONCLUSIONES .....	152
VI	BIBLIOGRAFIA .....	156

## Abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BV	Bencil viológeno oxidado
BVH	Bencil viológeno reducido
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil celulosa
DPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DPIP <sub>ox</sub>	2,6-diclorofenol indofenol oxidado
DTE	Ditioeritritol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
$E_{1\text{ cm}}^{1\text{M}}$	Coefficiente de extinción molar
$E_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/ml}}$	Coefficiente de extinción mg/ml
$E'_o$	Potencial de oxido-reducción standard
FAD	Flavin-adenin-dinucleótido
FMN	Flavin-mononucleótido
$g$	Constante de gravitación
$K_m$	Constante de Michaelis
mA	Miliamperio
MV	Metil viológeno oxidado
MVH	Metil viológeno reducido
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenín dinucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenín dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida-adenín dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida-adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH ó NADPH indistintamente
NEM	N-etilmaleimida
NTA	Acido nitrilotriacético
pHMB	p-hidroximercurobenzoato

p/v	peso/volumen
PM	peso molecular
r.p.m.	revoluciones por minutos
S	Unidad Svedberg
S <sub>20,w</sub>	Coefficiente de Sedimentación
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano
V	Voltio
v/v	volumen/volumen
W	watio
∅	diámetro

## I INTRODUCCION



La atmósfera actual de la tierra es muy oxidante pues contiene un 21% de oxígeno. Esto hace que una gran cantidad de elementos se encuentren en forma de compuestos oxidados tales como: silicatos, sulfatos, fosfatos, nitratos, carbonatos, etc. Cuando un organismo necesita utilizar cualquiera de estos elementos como fuente para la síntesis de sus distintos componentes celulares, requiere reducirlos previamente a un estado de valencia utilizable

En el caso de los organismos que asimilan nitrógeno nítrico, la reducción de nitrato a amoníaco, utilizable ya directamente para la síntesis del material celular nitrogenado, se realiza en dos pasos enzimáticos bastante bien caracterizados: 1) el nitrato se reduce a nitrito en una reacción catalizada por la nitrato reductasa (cambio de valencia del nitrógeno de +5 a +3); 2) el nitrito resultante se reduce a amoníaco, mediante una reacción en la que interviene el enzima nitrito reductasa (cambio de valencia del nitrógeno de +3 a -3) (61).

La reducción de nitrato hasta amoníaco se ha estudiado a fondo en plantas superiores y algas verdes habiéndose caracterizado los enzimas que participan en el proceso, así como su mecanismo de regulación. (9, 16, 42, 59, 63, 64, 90, 152).

En ciertas levaduras y hongos, la asimilación del nitrógeno nítrico sigue esencialmente los mismos pasos enzimáticos encontrados en plantas superiores y algas, y los requerimientos básicos de donadores de electrones, cofactores y metales así como su mecanismo de regulación resultan ser notablemente similares (22, 27, 42, 64, 111, 112).

En el caso de los procariontes, a excepción de unos cuantos organismos bien caracterizados, (64, 71, 88) el proceso de reducción de nitrato no está tan bien estudiado y sólo se posee una información fragmentaria (92, 103).

Las bacterias utilizan el nitrato de dos maneras diferentes. Ciertos microorganismos bacterianos no fotosintéticos, son capaces de llevar a cabo una reducción desasimilativa del nitrato, también conocida como respiración de nitrato (82). En estas bacterias, el nitrato se reduce a nitrito, actuando aquel, en lugar del  $O_2$ , como último aceptor de la cadena de transporte de electrones respiratoria. El nitrito producido se transforma generalmente en distintos compuestos nitrogenados ( $NO$ ,  $N_2O$ ,  $N_2$ ) produciéndose así un empobrecimiento del contenido en nitrógeno en los ambientes donde viven estos microorganismos que por ello se denominan desnitrificantes. Al parecer, en este proceso participan

entre el reductor y el sustrato aceptor último, unos transportadores de electrones similares a los de la cadena de transporte mitocondrial (flavoproteínas, quinonas, citocromos, etc.) así como ciertos metales susceptibles de experimentar reacciones redox reversibles, (92).

El enzima que interviene en la reducción de nitrato a nitrito como último eslabón de la cadena de transporte respiratoria bacteriana, también llamada nitrato reductasa respiratoria, ha sido caracterizada en E. coli K-12 (25, 73), Micrococcus denitrificans (24) y Micrococcus halodenitrificans (116). Se trata de un enzima asociado a membranas, de alto peso molecular y que contiene molibdeno, hierro no hemínico y grupos sulfuro lábiles, que al parecer son indispensables para la función catalítica de la proteína.

Otro tipo de reducción de nitrato operado por las bacterias es el de la reducción asimilativa, mediante el cual, el nitrato es reducido a nitrito en un primer paso, y en una ulterior reducción convertido en amoniaco. El enzima que participa en el primer paso del proceso, llamada nitrato reductasa asimilatoria ha sido caracterizada recientemente en algunos procariontes (14, 34, 35, 36, 52, 70, 71, 107).

En general, en estos organismos el enzima se encuentra asociado a particulas y la ferredoxina reducida es el donador inmediato de electrones en la reducci3n de nitrato a nitrito y s3lo en unos cuantos casos y en ciertas condiciones parece ser que el NADH actua como donador en el proceso (52, 104) lo cual con -trasta con los requerimientos del complejo nitrato reductasa de algas verdes, plantas superiores, hongos y levaduras que dependen exclusivamente de NAD(P)H (64). Los viol3genos reducidos sustituyen eficazmente a la ferredoxina y el enzima no parece requerir FAD para su actividad. Por el contrario la nitrato reductasa del grupo de organismos antes mencionado es un complejo enzimático de alto peso molecular que contiene flavina, molibdeno y citocromo b, y con dos actividades que actúan secuencialmente, entre el donador de electrones primario y el nitrato (64).

La nitrato reductasa asimilatoria de procariontes no-fotosintéticos ha sido menos estudiada (92). Hasta muy recientemente se sabía que este enzima, a diferencia de la nitrato reductasa respiratoria, no estaba asociada a membranas, no reducía clorato o bromato además del nitrato, y eran insensibles al tratamiento con azida (93, 94, 96-102).

En nuestro laboratorio, se ha aislado y caracterizado la nitrato reductasa asimilatoria de Azotobacter chroococcum. Es

un enzima de peso molecular 100.000, que contiene molibdeno, utiliza la ferredoxina o los viológenos reducidos como donadores de electrones, puede existir en dos formas enzimáticas interconvertibles, activa e inactiva y cuya síntesis se reprime por amoníaco y se induce por nitrato (31, 32, 135).

Ultimamente se ha conseguido reducir el nitrato en dicha bacteria con NAD(P)H mediante diaforasas presentes en el microorganismo, capaces de transportar los electrones a los viológenos que, una vez reducidos, pueden llevar a cabo la reducción del nitrato en presencia de la nitrato reductasa (133, 134, 135).

El objeto de este trabajo es la caracterización de la nitrato reductasa de la bacteria Acinetobacter calcoaceticus. Esta bacteria pertenece al amplio grupo de las Moraxellas, oxidasa-negativa. Es un cocobacilo, Gran-negativo, quimioorganotrofo, aerobio estricto, incapáz de fijar nitrógeno o de reducción desasimilativa del nitrato que utiliza una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de carbono y puede asimilar nitrato (8). Excepto la antedicha capacidad de reducir nitrato por estos organismos nada se conocía sobre el enzima nitrato reductasa (37, 110). Los resultados que presentamos a continuación pueden resumirse en los siguientes puntos:

1) Aislamiento y caracterización de la nitrato reductasa de A.calcoaceticus.

2) Purificación de la ferredoxina de A.calcoaceticus y del papel de este transportador en el proceso de asimilación de nitrato en este organismo.

3) Aislamiento y caracterización de las diaforasas dependientes de NAD(P)H, presentes en esta bacteria y determinación de su posible participación en la asimilación de nitrato.

Parte de este trabajo ha sido publicado y comunicado en varios congresos nacionales e internacionales (114, 115, 143, 144). Algunos experimentos han sido presentados como parte de la Tesis de Licenciatura (142).

## II MATERIALES Y METODOS

## 1. CULTIVO DEL MICROORGANISMO

### 1.1. Material biológico utilizado

El organismo utilizado en este trabajo ha sido la bacteria Acinetobacter calcoaceticus cepa N° 3 (8) procedente del Departamento de Química Celular, Instituto de Biología Celular, C.S.I.C., Madrid, España.

### 1.2. Condiciones y medio de cultivo standard

El organismo que estudiamos fue cultivado en condiciones estériles, aerobícamente, con agitación vigorosa (200 r.p.m.) a 27°C en un incubador NEW BRUNSWICK, modelo G-25, en matraces erlenmeyer de 2 litros de capacidad, conteniendo un litro de medio de cultivo. El medio empleado fue esencialmente, el descrito por ORNSTON Y STANIER (1966) para Pseudomonas putida (87) pero algo modificado en cuanto a la concentración de sus componentes.

El medio contenía, en milimoles por litro:  $\text{NO}_3\text{K}$ , 10; succinato disódico, 12,5;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 20;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 20; ácido nitrilotriacético, 5,25;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 12;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 2,25 y en  $\mu\text{moles}$  por litro:  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$ , 0,7;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 125; EDTA, 42,7;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 190;  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 45,5;  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , 7,85;  $(\text{NO}_3)_2\text{Co}$ , 4,2;  $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2$ , 2,3. El pH se ajustó a 6,8.



El succinato y los fosfatos se esterilizaron en solución aparte, para evitar que precipitasen, y posteriormente se añadieron en condiciones estériles al resto del medio de cultivo.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó en un autoclave eléctrico, SELECTA modelo P, a 1 atmósfera de presión (120°C) durante 20 min.

El rendimiento en peso húmedo de bacteria osciló en estas condiciones entre 0,9-1,5 gr/1 aproximadamente.

### 1.3. Mantenimiento del inóculo en medio líquido

Se cultivaron en erlenmeyers de 500 ml, inóculos de 100 ml en las condiciones descritas en 1.2. Estos inóculos se refrescarían periódicamente a tiempos que oscilaron entre 1 y 7 días.

Cada semana se partió de un inóculo nuevo procedente de medio sólido o bien de un Stock de cultivos conservados a baja temperatura en las condiciones que se especifican posteriormente.

### 1.4. Variaciones de las condiciones de cultivo standard

#### 1.4.1. *Cultivos en grandes volúmenes*

Cuando fué necesario, las bacterias se cultivaron en bote-

llas de 20 litros, 12-16 litros de medio de cultivo manteniendo el medio con fuerte aireación mediante una bomba de aire tipo RECIPROTOR. Se tomaron las precauciones adecuadas para que el aire inyectado no contaminase los cultivos y se añadió al medio silicona líquida, a una concentración final de 0,01% (v/v) para evitar la formación de espuma durante el crecimiento. Para estos volúmenes se utilizaron inóculos de 1 a 3 litros de cultivo crecidos en las condiciones descritas en 1.2. .

#### 1.4.2. *Cultivos con concentraciones de sales bajas y carentes de NTA*

Con objeto de incrementar el rendimiento de células obtenidas por litro de medio de cultivo se ensayaron modificaciones del medio de cultivo normal y se utilizó un nuevo medio de cultivo en el que la concentración de elementos trazas se descendió 10 veces, excluyéndose del medio el ácido nitrilotriacético (NTA). El  $\text{NO}_3\text{K}$ , el succinato disódico y los fosfatos se mantuvieron a la misma concentración del medio normal, el hierro se añadió en forma de solución de Fe-EDTA y a una concentración final de 86  $\mu\text{moles/l}$ . A este nuevo medio de cultivo se le denomina medio II. El rendimiento en peso húmedo de células fué, en estas condiciones, entre 1,4-2,0 g/litro aproximadamente.

#### 1.4.3. *Cultivos deficientes en molibdeno e hierro*

Cuando se realizaron experimentos para estudiar el efecto de metales se utilizó el medio de cultivo II omitiendo las sales de molibdeno o bien de hierro. En los experimentos de competencia entre el wolframato y el molibdato, estas sustancias se añadieron en forma de  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$  y  $\text{WO}_4\text{Na}_2$  a las concentraciones que se indican en su lugar correspondiente. En los experimentos donde se estudia el efecto de la adición de hierro, al incrementar la concentración de éste se aumentó proporcionalmente la concentración de EDTA; y en los medios carentes de hierro la concentración usada de EDTA fué  $4,2 \mu\text{M}$ .

En estos experimentos se utilizaron inóculos deficientes en molibdeno o hierro preparados por crecimiento y sucesivas transferencias (4-5 veces) en medios carentes de éstos elementos trazas y en los que la fuente de nitrógeno era amonio.

#### 1.4.4. *Cultivos con otras fuentes de nitrógeno*

Para el estudio de la regulación por distintas fuentes de nitrógeno de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus, se sustituyó en el medio normal el  $\text{NO}_3\text{K}$  por  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  o bien por una mezcla de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y  $\text{NO}_3\text{K}$ . En estos casos la molaridad total del nitrógeno se mantuvo siempre 10 mM. Cuando se empleó  $\text{NO}_2\text{Na}$  co-

mo fuente nitrogenada, se tuvo la precaución de no exceder nunca una concentración de 5 mM, debido a que concentraciones superiores inhibían fuertemente el crecimiento de las bacterias.

### 1.5. Crecimiento en medio sólido

La bacteria se cultivó en soporte sólido constituido por 2% (p/v) de agar y 1% de extracto de levadura DIFCO (Detroit, Michigan, U.S.A.) o bien sustituyendo éste último por los componentes del medio de cultivo normal excepto que los fosfatos estaban a una concentración final de 4 mM.

La incubación se llevó a cabo en un aparato NEW BRUSNSWICK, modelo PSYCROTHERM, a 27°C y después de 3-4 días de crecimiento, los tubos se conservaron entre 0-4°C. En un segundo procedimiento, las células se recogían en condiciones estériles y se conservaron a más bajas temperaturas como se indica en el apartado 1.6.

Con objeto de controlar la pureza de los cultivos, la bacteria se cultivó en medio sólido en placas Petri. Complementariamente el grado de pureza de las colonias se controló mediante microscopía de contraste de fases utilizando un microscopio ZEISS, con objetivo de inmersión y aumento total de 1250 x

### 1.6. Conservación de la estirpe a bajas temperaturas

Las colonias bacterianas crecidas en agar se recogieron en esterilidad con 2 ml de una solución de fosfatos 40 mM, pH 6,8 y se añadieron a 2 ml de glicerina esteril, conservándose la mezcla a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las bacterias pueden mantenerse durante años en estas condiciones, plenamente viables.

## 2. PREPARACION DE EXTRACTOS ACELULARES

Las bacterias se recogieron en la fase final del crecimiento logarítmico (12-13 horas después de la inoculación), por centrifugación ( $16.000 \times g$  durante 5 minutos) y después de lavar dos veces con agua destilada, se resuspendieron en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.5 en la proporción de 5 ml de tampón por cada gramo de peso húmedo de células aproximadamente. Cuando se estudió la reducción de nitrato mediante piridín-nucleótidos en presencia de flavinas, se le añadió al tampón antes mencionado DTE  $100 \mu\text{M}$  con objeto de proteger la actividad. En el estudio de las actividades de diaforasas los extractos se prepararon con el tampón anterior al cual se le añadió FAD  $10 \mu\text{M}$ . Las células se rompieron en frío mediante ultrasonido con un sonicador BRANSON, modelo B-12 a  $20 \text{ Kciclos/seg}$  ( $75 \text{ W}$ ), durante un periodo de tiempo que osciló entre 2 y 5 minutos. El material roto se centrifugó a  $39.000 \times g$  durante 15 min, recogién dose el sobrenadante don

de estaba la actividad enzimática. Para ciertos experimentos que requerían extractos acelulares exentos de pequeñas partículas, las células rotas se centrifugaron a 46.500 x g durante 15-30 min. Las operaciones de centrifugación se realizaron a 4°C. Estos sobrenadantes se usaron como extractos crudos y se emplearon para la realización de los experimentos y como material de partida para llevar a cabo algunos pasos de purificación.

Los extractos acelulares también se prepararon por tratamiento con lisozima y rotura por choque osmótico. Las células bacterianas se mantuvieron a 35°C durante 3 horas en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, que contenía manitol 0,5 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM y 100 mg de lisozima/g de peso húmedo. Las células tratadas se recogían por centrifugación a baja velocidad, se lavaron dos veces con tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y finalmente se dejaron en dicho tampón durante 30 min a 2°C. Por último las células rotas se centrifugaron a 46.000 x g durante 15-30 min en las condiciones anteriormente descritas.

### 3. ENZIMAS

#### 3.1. Purificación de la nitrato reductasa de Acinetobacter

La nitrato reductasa de A. calcoaceticus, la bacteria objeto de nuestro estudio, se purificó siguiendo básicamente los

pasos empleados para el enzima de Azotobacter chroococcum (31) con ciertas modificaciones. Todos los pasos de purificación, se realizaron entre 0 y 4°C.

### 3.1.1. Adsorción en DEAE-celulosa

Unos 25 ml de extracto acelular, se pasaron a través de una columna de DEAE-celulosa (10 cm altura x 3,2 cm  $\emptyset$ ) equilibrada previamente con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5, al objeto de adsorber en ella la nitrato reductasa. Después de lavar la columna con el mismo tampón fosfato, se eluyó el enzima con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5, 200 mM de ClNa.

### 3.1.2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Al eluato anterior se le añadió  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  hasta 40% de saturación y después de dejar la solución unos 10 min con agitación suave se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min. Al sobrenadante de ésta primera precipitación se le añadió más sulfato amónico hasta alcanzar una saturación del 60%, y la solución se trató y centrifugó como en el caso anterior. Se recogió el sedimento y se resuspendió en un volumen de 10 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5.

### 3.1.3. Filtración por Sephadex G-25

La preparación anterior se desalinizó, pasandola a través de una columna de Sephadex G-25 (10 cm altura x 3,2 cm  $\phi$ ) equilibrada previamente con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Esta preparación enzimática se utilizó donde se indica, como nitrato reductasa parcialmente purificada. Esta preparación no poseía una actividad específica significativamente mayor que el extracto crudo, pero la nitrato reductasa así obtenida resultó mucho más estable y fué posible conservarla en frío durante mayores periodos de tiempo sin pérdida considerable de su actividad.

### 3.2. Purificación de ferredoxina de Azotobacter

La ferredoxina de Azotobacter chroococcum se preparó esencialmente siguiendo el método descrito por YOCH y col. (1969) (150) pero sin fraccionar en ferredoxina I y II.

### 3.3. Purificación de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa de espinacas

La ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa de espinacas se preparó siguiendo parcialmente el método descrito por SHIN y col. (1963) (118).

### 3.4. Preparación de cloroplastos de espinacas

Los fragmentos de cloroplastos de espinacas se prepara-



ron según el método descrito por WHATLEY y ARNON (1963) (148). Los cloroplastos se extrajeron con un tampón Tris-ClH 20 mM, pH 8 que contiene ClNa 0,35 M, se lavaron con la misma solución y por último, se rompieron por choque osmótico en el mismo tampón pero con ClNa 0,035 M. Los fragmentos de cloroplastos se calentaron a 55°C durante cinco minutos para destruir la actividad del fotosistema II (89).

### 3.5. Preparación de las células para la determinación de actividades enzimáticas "in situ"

La permeabilización de las bacterias se consiguió esencialmente según el método descrito por KORNBERG y REEVE (1972) (55). Después de lavar tres veces las células cultivadas normalmente en nitrato, se trató una suspensión de éstas bacterias en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 (0,1 mg peso húmedo/ml) con una mezcla de butanol-etanol (1:9 v/v) hasta una concentración final de 1% v/v agitando vigorosamente durante 1 min exacto. A continuación se congeló totalmente la suspensión a -20°C. La suspensión descongelada se usó como material de partida para los ensayos de actividades enzimáticas "in situ".

### 3.6. Ensayo de las actividades enzimáticas

#### 3.6.1. *Ensayo normal de la nitrato reductasa*

La actividad de la nitrato reductasa se determinó en aereo-

biosis en un volumen final de 1 ml, que contenía: 100  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 2  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$ ; 2  $\mu$ moles de metil viológeno; 0,8 mg de  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  en 0,1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  95 mM; y una cantidad apropiada de preparación enzimática. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 2 min o bien a 2°C durante 10 min. Las variantes de este ensayo se especifican en las leyendas de los correspondientes experimentos. La reacción se detuvo agitando fuertemente la mezcla de reacción en un LAB-LINE, modelo Supermixer, hasta que el ditionito sódico se oxidó completamente, lo que se ponía de manifiesto por la desaparición del color azul característico del metil viológeno reducido. El nitrito formado se estimó entonces colorimétricamente como se indica más adelante. Una unidad de actividad enzimática se define como un  $\mu$ mol de nitrito formado por minuto.

### 3.6.2. *Ensayo de las NAD(P)H diaforasas*

La actividad de las diaforasas se ensayó siguiendo espectrofotométricamente a 600 nm y a temperatura ambiente la desaparición del color azul característico del DPIP oxidado. Se usaron cubetas aeróbicas de 1 cm de paso de luz utilizando para los cálculos un  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ M}} = 21.000$  para el  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$ . La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: tampón fosfato potásico 200  $\mu$ moles; DPIP 0,2  $\mu$ moles; NAD(P)H 0,6  $\mu$ moles y una cantidad adecuada de preparación enzimática.

Cuando se utilizaron los viológenos como aceptores de electrones la reacción se estudió siguiendo espectrofotométricamente la aparición del color característico del MV o del BV reducidos a 602 nm y 565 nm respectivamente, utilizando un  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ M}} = 9.700$  para el MVH y un  $E_{1\text{ cm}}^{1\text{ M}} = 8.300$  para el BVH. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: tampón fosfato potásico 200  $\mu\text{moles}$ ; MV o BV 16  $\mu\text{moles}$ ; NAD(P)H 0,6  $\mu\text{moles}$  y una cantidad apropiada de preparación enzimática. La reacción se desarrolló a temperatura ambiente en cubetas Thumberg de 1 cm de paso de luz después de evacuar el aire y rellenar con nitrógeno de alta pureza, esta operación se llevó a cabo por lo menos 10 veces consecutivas. La modificación de las condiciones del ensayo se especifican en las leyendas de los experimentos correspondientes. La unidad de actividad enzimática se define como  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H oxidado por minuto.

### 3.6.3. *Ensayo de la nitrito reductasa*

La actividad MVH-nitrito reductase se midió por desaparición de nitrito según el método de RAMIREZ *et al.*, (1966) (105) pero utilizando tampón fosfato potásico, pH 7,5. En los extractos acelulares de Acinetobacter, preparados como se ha descrito anteriormente, no se detectó actividad nitrito reductasa, salvo contadas ocasiones.

### 3.6.4. Ensayo de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa de espinacas

Se llevó a cabo según LAZZARINI Y SAN PIETRO (1962) (57) siguiendo la reducción del citocromo c a 550 nm usando NADPH como donador de electrones.

### 3.6.5. Ensayos de las ferredoxinas

Las ferredoxinas tanto de Acinetobacter como de Azotobacter se estimaron por su capacidad transportadora de electrones en la reducción fotoquímica del NADP<sup>+</sup> por fragmentos de cloroplastos de espinacas según el método descrito por YOCH y ARNON (1970) (151)

## 4. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

### 4.1. Centrifugaciones

Para la obtención de los extractos acelulares y en los distintos pasos de purificación se emplearon centrífugas refrigeradas SORWALL modelo RC-2B y BECKMAN modelo J-21B. Cuando fué necesario manejar grandes volúmenes, las células se recogieron en una centrífuga SORVALL SS-1 dotada de un sistema de centrifugación continua SZENT GYORGY.

En los gradientes de sacarosa se usó una ultracentrífuga BECKMAN SPINCO modelo L2-50B con rotor SW-56Ti de receptáculos basculantes.

#### 4.2. Concentración de proteínas

La concentración de los extractos acelulares se llevó a cabo en concentradores de macrosolutos MINICON-B15 que retienen compuestos por encima de 15.000 de peso molecular o bien en una célula de ultrafiltración, modelo 52 provista de membrana DIAFLO PM10 que retiene los compuestos de peso molecular superior a 10.000. La ultrafiltración se realizó bajo presión de nitrógeno sin exceder la presión máxima tolerada (4,7.atm.). Ambos tipos de concentradores fueron adquiridos a AMICON (Lexington, Massachusetts, U.S.A.).

#### 4.3. Cromatografía de filtración por gel

Las sales ordinariamente se eliminaron por filtración de los extractos enzimáticos a través de columnas de Sephadex G-25 (medium). Las determinaciones de peso molecular y distintos pasos de purificación de los enzimas se realizaron en columnas de Sephadex G-150. Ambos tipos de Sephadex fueron suministrados por PHARMACIA (Uppsala, Suecia). Las fracciones de las columnas de cromatografía se recogieron mediante un colector automático de fracciones LKB modelo ULTRORAC.

#### 4.4. Medidas de pH

Las medidas de pH se efectuaron en pH-metros BECKMAN modelo Expandomatic o METROHM HERISAU modelo E-512 con escala expandida.

#### 4.5. Técnicas utilizadas para estudios en anaerobiosis

Los experimentos en atmósfera inerte se llevaron a cabo en cubetas espectrofotométricas Thumberg o bien en vasijas de aparato de Warburg modelo AMINCO 5-4155 o modelo BRAUN MELSUNGEN V166, previamente gaseadas con argon o nitrógeno de alta pureza suministrados por la Sociedad Española de Oxígeno (S.E.O.). En los experimentos con cloroplastos, se usó luz blanca de intensidad 18.000 lux.

#### 4.6. Centrifugaciones en gradiente de sacarosa

Los gradientes se prepararon utilizando un mezclador tipo BUCHLER (Tubingen, Alemania). Una alícuota de 0,2 ml del extracto a analizar conteniendo CNOK 2 mM se colocó en la parte superior de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20% (p/v) de 3.3 ml de volumen y una longitud de 5 cm. La sacarosa estaba disuelta en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5 con CNOK 2 mM.

La centrifugación se llevó a cabo a 2°C, y a 45.000 r.p.m. en una ultracentrifuga BECKMAN SPINCO modelo L2-50B.

Se recogieron fracciones de tres gotas a partir del fondo del tubo con un DENSI-FLOW tipo BUCHLER utilizando un colector automático de fracciones LKB. En cada una de las fracciones se ana

lizaron las proteínas marcadoras midiendo su absorbancia a 280 nm o bien las distintas actividades enzimáticas.

Para la determinación del coeficiente de sedimentación ( $S_{20,W}$ ) y peso molecular mediante este método se utilizó como marcador ovoalbúmina (43.500 p.m.) según la técnica de MARTIN y AMES (1961) (72).

#### 4.7. Determinación del peso molecular por filtración en gel

El peso molecular de la nitrato reductasa y de las diaforasas se estimó por filtración en gel según el método descrito por ANDREWS (1964) (1), utilizando una columna de Sephadex G-150 (65.5 cm altura x 1.5 cm  $\phi$ ) equilibrada con Tris ClH 50 mM pH 7,5, ClK 0,1 M y CNOK 2 mM. Las proteínas marcadoras y los enzimas se eluyeron con el mismo tampón a un flujo de 14.5 ml/hora. En la determinación del peso molecular de la nitrato reductasa se usó una preparación enzimática parcialmente purificada mientras que para la de las diaforasas se utilizaron extractos acelulares. Se recogieron fracciones de 3.5 ml en un colector LKB modelo ULTRORAC con sistema de cuentagotas automático.

Las proteínas utilizadas como marcadores fueron  $\gamma$ -globulina humana Fracción II (PM = 160.000); seroalbúmina bovina (PM =

68.000); ovoalbúmina (PM = 43.500);  $\alpha$ -quimotripsinógeno-A de pancreas bovino (PM = 23.650), y citocromo c de corazón de caballo tipo III (PM = 12.384). Para determinar el volumen de elución ( $V_e$ ) de los distintos marcadores se midió su absorbancia a 280 nm ó a 230 nm, mientras que el del citocromo c se determinó a 412 nm. El volumen vacío ( $V_o$ ) de la columna se determinó con Azul Dextra-no-2000.

#### 4.8. Electroforesis de disco sobre gel de poliacrilamida

Se llevó a cabo en gel de poliacrilamida a una concentración del 7,5% (p/v) a pH 9,5 en tampón Tris-Glicina y a temperatura ambiente en tubos de 45 mm altura x 5 mm  $\phi$  a un amperaje de 4 mA/tubo y 100-130 voltios.

La preparación de las distintas soluciones para la polimerización de la acrilamida se hizo según describe el manual de instrucciones de SHANDON SCIENTIFIC COMPANY LIMITED (London) (117).

El revelado de la banda se llevó a cabo con el colorante NEGRO-AMIDO B-10 y la decoloración con una mezcla de ácido acético al 7% y metanol al 5% en agua.



#### 4.9. Determinaciones espectrofotométricas

Las cinéticas enzimáticas y los espectros de absorción se siguieron en espectrofotómetros BECKMAN DK-2A o PYE UNICAM SP-1800. Para las determinaciones colorimétricas se usaron espectrofotómetros BAUSCH y LOMB Spectronic, modelos 20, 100 y 700. Los coeficientes de extinción molar utilizados,  $E_1^1 \frac{M}{cm}$ , fueron: para NAD(P)H (340 nm) = 6.220; DPIP (600 nm) = 21.000; citocromo c (550 nm) = 28.000; ferricianuro (420 nm) = 1.000.

#### 4.10. Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular se estimó por medidas turbidimétricas a 660 nm en alícuotas de los cultivos o bien en erlenmeyers con brazo lateral adaptable al espectrofotómetro.

#### 4.11. Determinación de clorofila

La concentración de clorofila en los fragmentos de cloroplastos se determinó por su absorbancia a 652 nm después de extraer con acetona al 80% según el método descrito por ARNON (1949) (3), usando un  $E_1^1 \frac{mg/ml}{cm} = 34,5$  (652 nm).

#### 4.12. Determinación de proteína

La proteína se determinó a 500 nm por el método de LOWRY et al. (1951) (68) utilizando ovoalbúmina como patrón, o por el mé

todo de WARBURG y CHRISTIAN (1941) (147).

#### 4.13. Determinación de nitrato

Se estimó cualitativamente por reducción a nitrito mediante polvo de Zinc en medio ácido según el método descrito por BARKER (1974) (7) y subsecuente determinación de nitrito como se especifica en 4.14.

#### 4.14. Determinación de nitrito

El nitrito se determinó colorimétricamente a 540 nm por la reacción de diazotación de GRIESS-ILOSWAY, según la técnica propuesta por SNELL y SNELL (1949) (120).

#### 4.15. Determinación de amonio

El amonio se determinó por nesslerización según el método de CONWAY (1957) (19), midiendo el producto coloreado a 440 nm.

### 5. REACTIVOS

Los siguientes compuestos: NADH, NADPH, FAD, FMN, lisozi-  
ma, citocromo c,  $\alpha$ -quimotripsinógeno-A, ovoalbúmina, Tris, pHMB,  
y DEAE-celulosa se adquirieron a SIGMA, St. Louis, U.S.A.. La  
 $\gamma$ -globulina humana y la seroalbúmina fueron suministradas por  
SCHWARZ-MANN, New York, U.S.A. El metil viológeno y el bencil vio-  
lógeno procedían o bien de MANN, New York, U.S.A. o bien de SERVA,  
Heidelberg, Alemania.

El sulfato de kanamicina se adquirió a MEIJI SEIKA KAISHA, Tokio, Japón.

El resto de los compuestos utilizados fueron de calidad analítica y se adquirieron a SIGMA, St. Louis, U.S.A., MERCK, Darmstadt, Alemania; RIEDEL, Hannover, Alemania; BDH, Poole, Inglaterra y CARLO ERBA, Milano, Italia. El agua se desionizó mediante un cambiador SETA R-100, serie 2/67 o bien en un destilador DRA.

### III RESULTADOS

## 1. CARACTERIZACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

### 1.1. Donadores de electrones y cofactores para la nitrato reductasa

En la Tabla 1 se presentan los donadores de electrones y cofactores de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus. Ni el NADH ni el NADPH, solos o en presencia de cantidades catalíticas de flavinas pueden actuar como donadores de electrones en la reacción. Sin embargo, el metil viológeno, con menor eficacia el benzil viológeno, reducidos químicamente con ditionito resultaron efectivos donadores. El ditionito y los flavin nucleótidos reducidos fueron mucho menos eficientes en la reducción de nitrato. La reacción se estudió en atmósfera inerte, bajo argón, para evitar la interferencia de las oxidasas existentes en los extractos acelulares. Los mismos resultados se obtuvieron usando extractos enzimáticos parcialmente purificados.

Como se indica más adelante (6.1 y 6.3) fue posible reducir nitrato enzimáticamente con NAD(P)H, utilizando como transportadores de electrones los viológenos o las flavinas a altas concentraciones, mediante diaforasas presentes en los extractos acelulares.

### 1.2. Reducción enzimática de nitrato con metil viológeno reducido químicamente con ditionito

La reducción de nitrato con MV reducido químicamente con ditionito, es un proceso enzimático. En ausencia de nitrato, dona-

TABLA 1

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES PARA LA NITRATO  
 REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES	NITRITO FORMADO (nmoles)
Ninguno	0
NADH	1
NADPH	2
NAD(P)H + FAD ó FMN	2
$S_2O_4^{2-}$ , MV	153
$S_2O_4^{2-}$ , BV	110
$S_2O_4^{2-}$ , FAD	6
$S_2O_4^{2-}$ , FMN	5
$S_2O_4^{2-}$ ,	2

En los experimentos con piridin nucleotidos reducidos, la mezcla de reacción, contenía en un volumen final de 2 ml: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 200  $\mu$ moles;  $NO_3K$ , 4  $\mu$ moles; NAD(P)H, 0,6  $\mu$ moles; y donde se indica, FAD ó FMN 40 nmoles. En los experimentos con viológenos o flavinas reducidas químicamente con ditionito, la mezcla de reacción contenía en un volumen total de 2ml: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 200  $\mu$ moles;  $NO_3K$  4  $\mu$ moles;  $Na_2S_2O_4$ , 1,6 mg, en 0,2 ml de  $CO_3HNa$  95 mM; y donde se indica MV ó BV 4  $\mu$ moles; FAD ó FMN, 4  $\mu$ moles. Extracto acelular conteniendo 1 mg de proteina. La reacción se llevó a cabo en vasijas de WARBURG bajo atmósfera de argon a 24°C durante 2 min.

dor o enzima, la reducción no tuvo lugar. Lo mismo ocurrió cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de enzima hervido (Tabla 2).

### 1.3. Relación entre la concentración de proteína y la actividad de la nitrato reductasa

Como se observa en la Fig. 1, la actividad nitrato reductasa fue proporcional a la concentración de proteína usada en el ensayo.

### 1.4. Relación entre el tiempo de ensayo y la actividad de la nitrato reductasa a distintas temperaturas

A 30°C la velocidad de la reacción enzimática ensayada con MV y ditionito fue proporcional al tiempo durante los dos primeros minutos. Luego, la reacción se detuvo observándose una drástica inactivación del enzima (Fig. 2A). Este efecto comenzó a observarse a los 10°C (Fig. 2B) y ya desde los 20°C la inactivación fué prácticamente igual que a 30°C. A 2°C, sin embargo la cinética de la reacción enzimática fué lineal durante 30 minutos (Fig. 2C). La razón de este curioso efecto se discute más adelante.

### 1.5. Relación entre el pH de ensayo y la actividad de la nitrato reductasa

En la Fig. 3 se muestra el efecto del pH sobre la activi-

TABLA 2

REDUCCION ENZIMATICA DE NITRATO CON METIL VIOLOGENO REDUCIDO QUIMICAMENTE CON DITIONITO

SISTEMA	NITRITO FORMADO (nmoles)
Completo	58
<u>menos</u> $\text{NO}_3^-$	3
<u>menos</u> MV	4
<u>menos</u> $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	2
Completo, nitrato reductasa calentada 5 min a 100°C	3

La reacción se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos para el ensayo standard de la nitrato reductasa a 30°C, durante 2 min. Nitrato reductasa 0,16 mg.



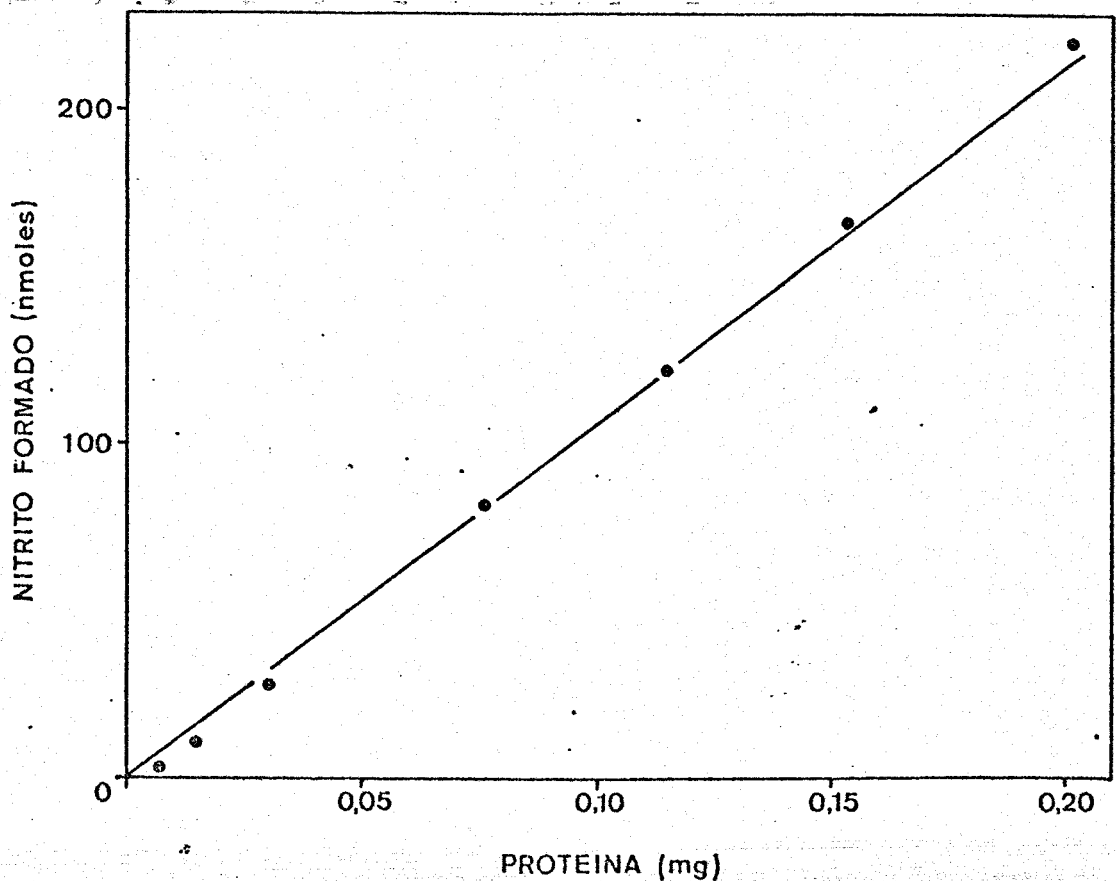


Fig. 1 *Relación entre la concentración de proteína y la actividad de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus. La preparación enzimática con las concentraciones de proteína indicadas se ensayó a 30°C durante 2 min en un volumen final de 1 ml, con los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tampón fosfato potásico, pH 7.5, 100;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 10; MV, 5; y 0.8 mg de  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  en 0.1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  95 mM.*

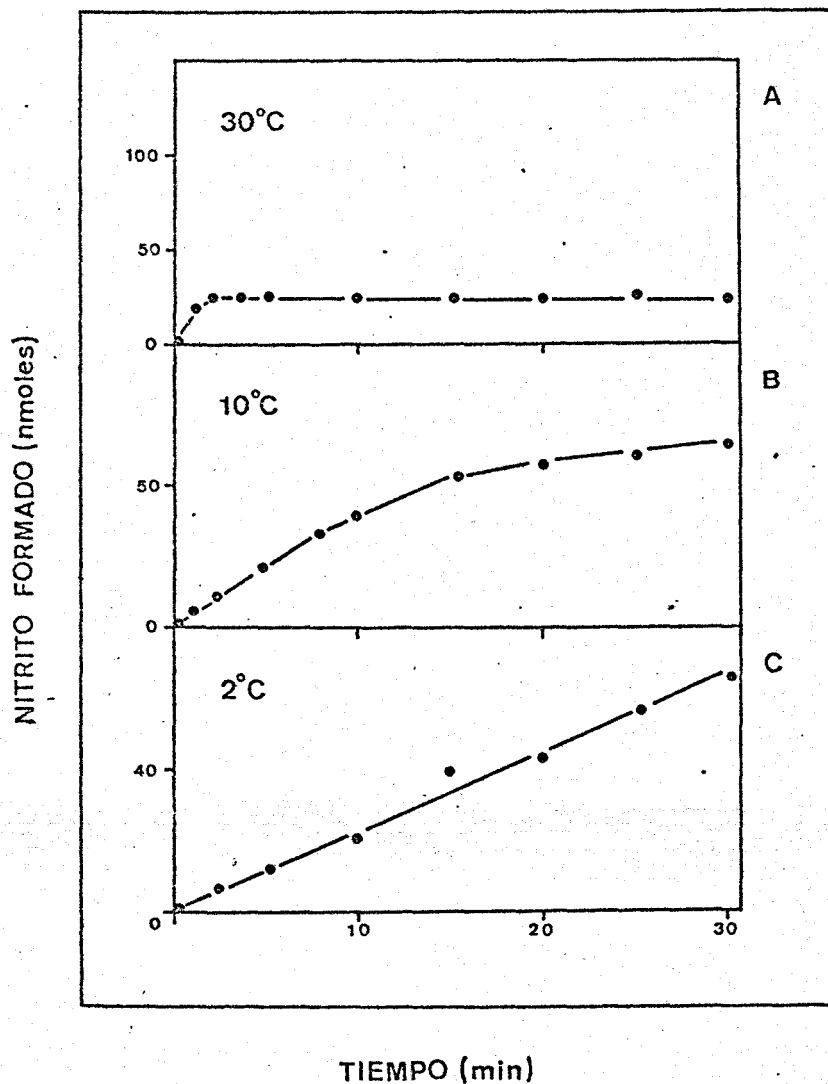


Fig. 2 Cinética de la nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* ensayada con metil viologeno reducido químicamente por ditionito a distintas temperaturas. El ensayo se realizó a las temperaturas indicadas y en las condiciones descritas en Materiales y Métodos salvo que la mezcla de reacción era 12 veces mayor, tomándose a los tiempos indicados alícuotas de 1 ml en las que se determinó el nitrito aparecido.

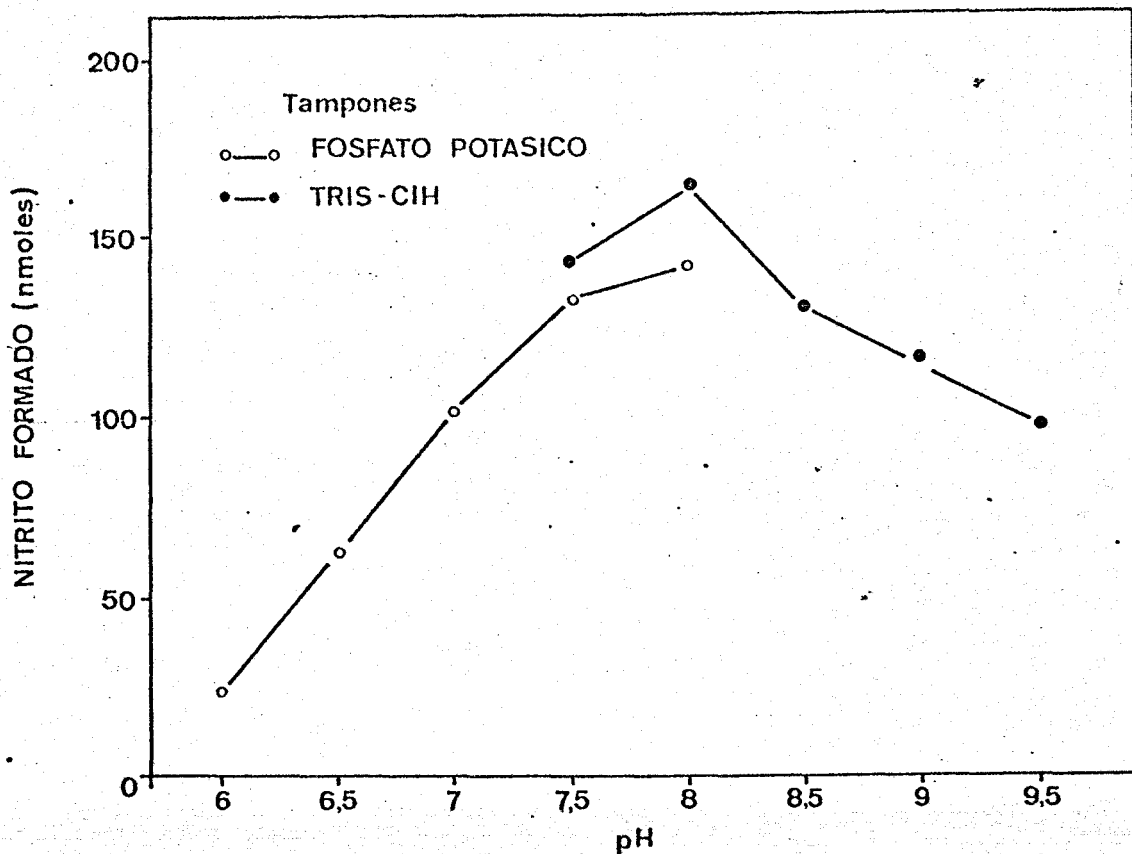


Fig. 3 Efecto del pH sobre la actividad de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml los siguientes compuestos en  $\mu$ moles:  $\text{NO}_3\text{K}$ , 10; MV, 5; y 0.8 mg de  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  en 0.1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 95 mM y 100  $\mu$ moles de los tampones que se indica a los correspondientes pH. Nitrato reductasa 0,5 mg.

dad nitrato reductasa ensayada en presencia de diversos tampones. Como puede observarse el pH óptimo resultante fue 8.

#### 1.6. Determinación de la $K_m$ para el nitrato

Cuando se determinó la velocidad de la reacción enzimática frente a concentraciones crecientes de nitrato a 30°C con MV, el enzima no presentó una cinética del tipo Michaelis-Menten (Fig. 4). Solo si la reacción se llevaba a cabo en presencia de CNOK (cfr. 3.7) a 30°C o si la actividad se ensayaba a 2°C, se observaba un comportamiento tipo Michaelis. De esta última forma se calculó una  $K_m$  aparente del enzima para el nitrato de 0,11 mM (Fig. 5).

#### 1.7 Determinación de la $K_m$ para el metil viológeno

Similarmente, la representación de los inversos de concentración de MV frente a los inversos de velocidad presentó características anómalas, cuando el ensayo enzimático se realizaba a 30°C (Fig. 6). Disminuyendo proporcionalmente la cantidad de ditio nito en los ensayos con baja concentración de viológeno, se observó que la reacción obedecía al esquema típico de los enzimas con cinética de Michaelis. En estas condiciones una  $K_m$  aparente para el metil viológeno de 0,77 mM se calculó a partir de la representación de inversos de Lineweaver-Burk (Fig. 7).

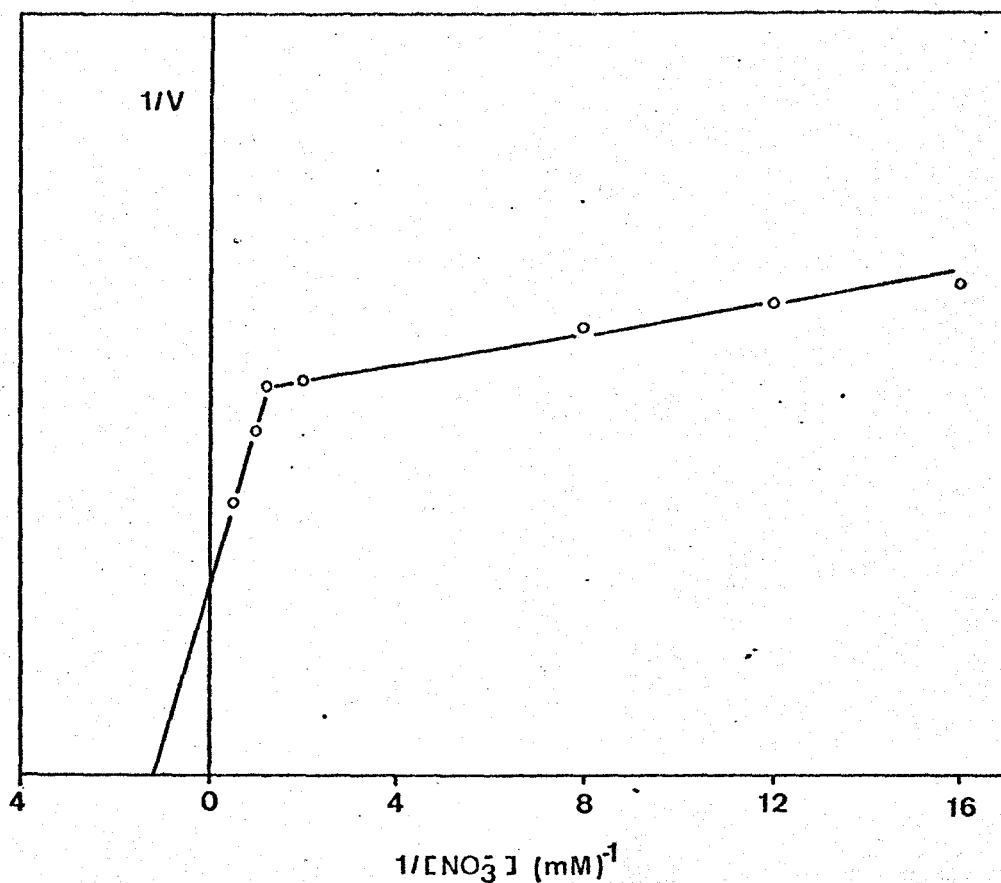


Fig. 4 Efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus ensayada a  $30^\circ\text{C}$ . Las condiciones del ensayo fueron las descritas en Materiales y Métodos excepto que el nitrato se añadió a las concentraciones in dicadas. Extracto acelular 0.22 mg de proteína.

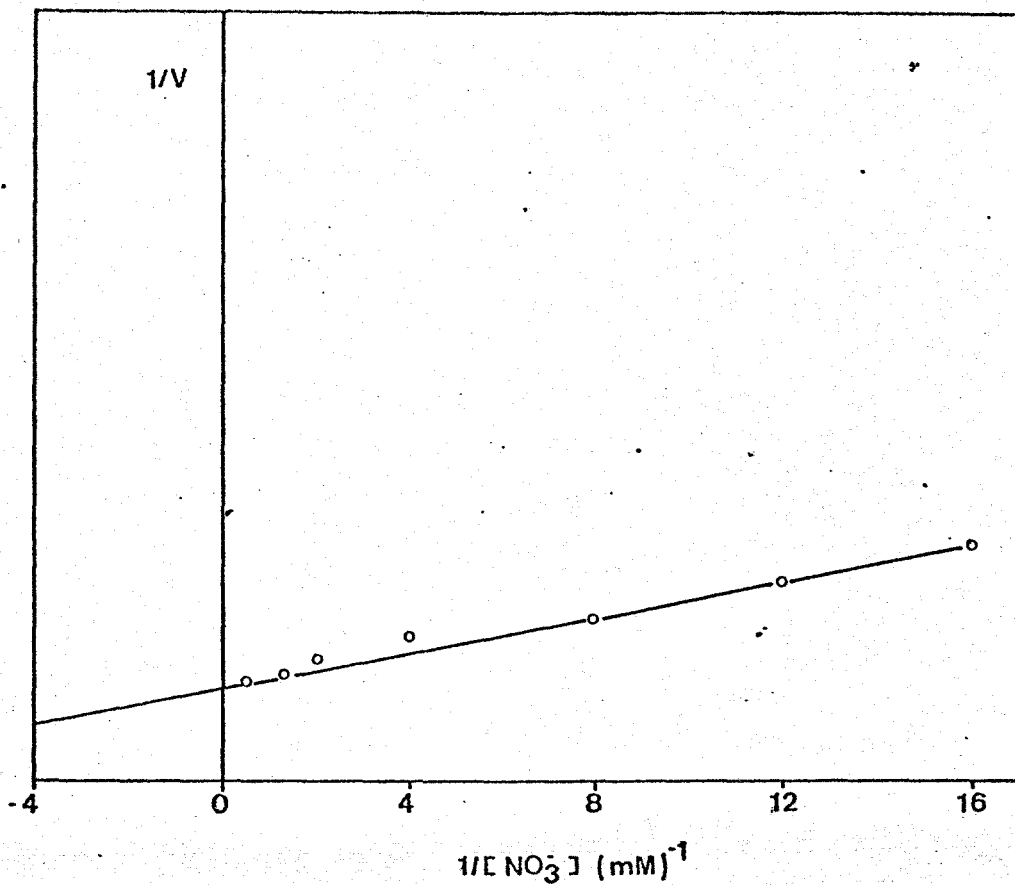


Fig. 5 Efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus ensayada a  $2^{\circ} \text{ C}$ . Las condiciones del ensayo fueron las descritas en Materiales y Métodos excepto que el nitrato se añadió a las concentraciones in dicadas. Extracto libre de células, 0.25 mg de proteína.

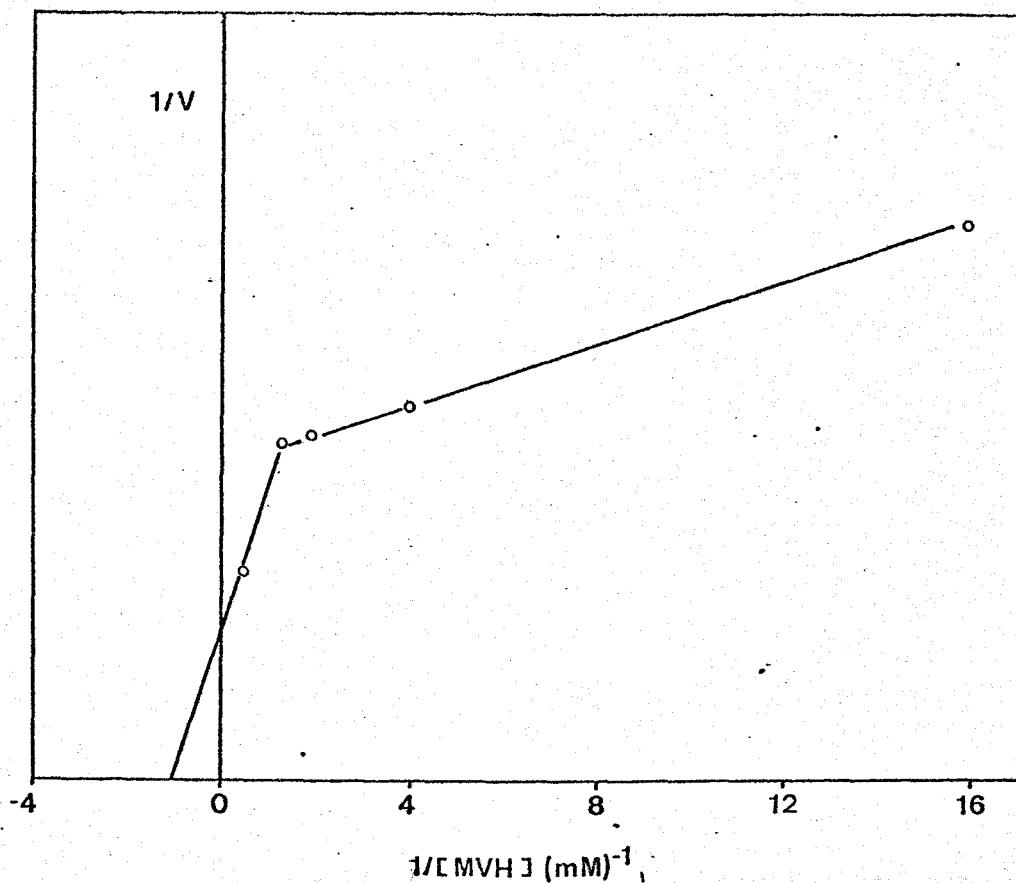


Fig. 6 Efecto de la concentración de metil viologeno reducido sobre la actividad de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus a concentración fija de ditionito. Las condiciones del ensayo fueron las descritas en Materiales y Métodos excepto que el MV se añadió a las concentraciones indicadas. Extracto libre de células, 0.3 mg de proteína.



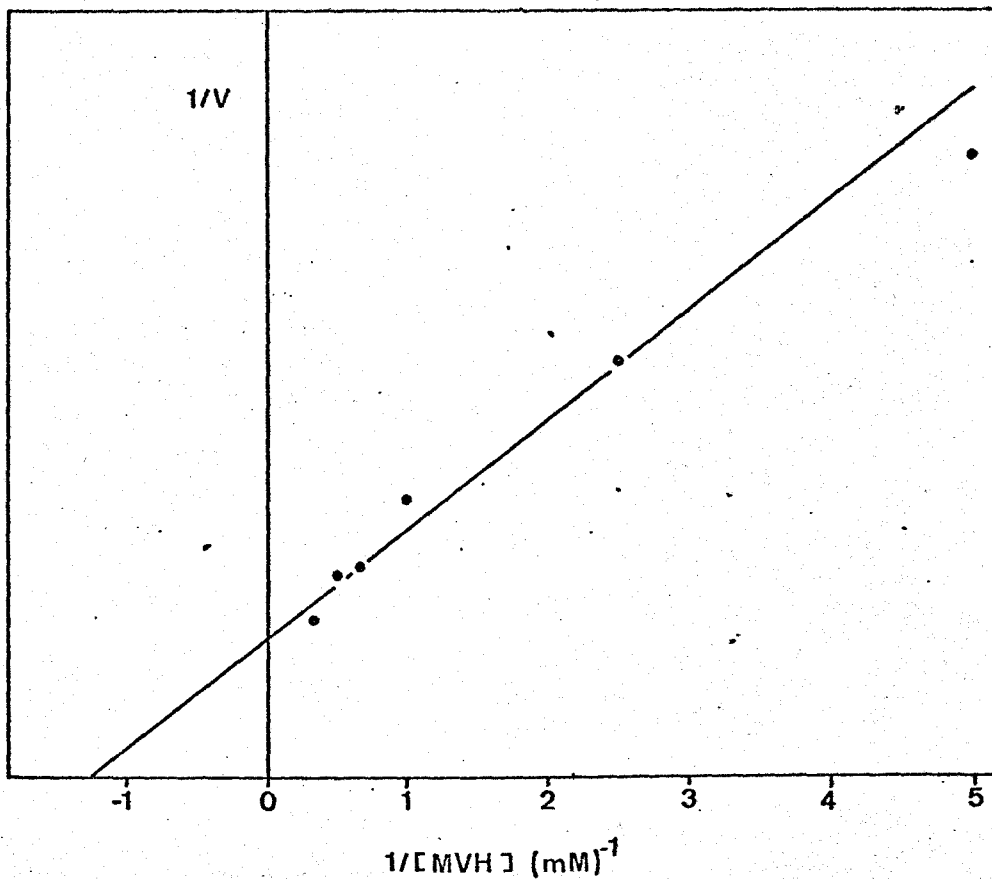


Fig. 7 Efecto de la concentración de metil viologeno reducido en la actividad de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus modificando proporcionalmente las concentraciones de ditionito y MV. Las condiciones del ensayo son las reseñadas en Materiales y Métodos excepto que el MV se utilizó a las concentraciones que se indican y la concentración de  $S_2O_4^{2-}$  era proporcional a la concentración de MV utilizada. Preparación enzimática, 0.3 mg.



### 1.8. Inhibidores de la actividad nitrato reductasa

El cianuro fue efectivo inhibidor de la nitrato reductasa a concentraciones entre 0,1-0,2 mM, mientras que la azida inhibió en mucho menor extensión. El enzima fue sensible a los reactivos de grupos -SH, PHMB y NEM, siendo el primero de ellos un potente inhibidor de la actividad nitrato reductasa a partir de concentraciones tan bajas como 10  $\mu$ M (Tabla 3).

El tipo de inhibición ejercida por el cianuro fue de tipo acompetitivo como puede observarse en la Fig. 8.

### 1.9. Peso molecular de la nitrato reductasa

El peso molecular de la nitrato reductasa se determinó por filtración en Sephadex G-150 utilizando proteínas marcadoras de peso molecular conocido como se describe en Materiales y Métodos. El peso molecular calculado a partir de los resultados que se recogen en la Fig. 9 fue 96,000.

### 1.10. Coefficiente de sedimentación de la nitrato reductasa

Se calculó comparativamente viendo el desplazamiento del pico de actividad de la nitrato reductasa en un gradiente lineal de sacarosa con respecto a un marcador tal como la ovoalbúmina de  $S_{20,w}$  conocido (Fig. 10). El  $S_{20,w}$  calculado fué de 6,5S. El peso molecular

TABLA 3

EFFECTO DE DISTINTOS INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE  
LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

INHIBIDOR	CONCENTRACION (M)	INHIBICION (%)
Ninguno	-	0
CNK	$10^{-4}$	87
CNK	$2 \times 10^{-4}$	93
$N_3Na$	$10^{-3}$	20
pHMB	$10^{-5}$	85
pHMB	$10^{-4}$	95
NEM	$4 \times 10^{-3}$	52

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en Materiales y Métodos, excepto que los distintos inhibidores se añadieron, a las concentraciones indicadas, a la mezcla de reacción al comienzo del ensayo. Extracto acelular, 0,3 mg.

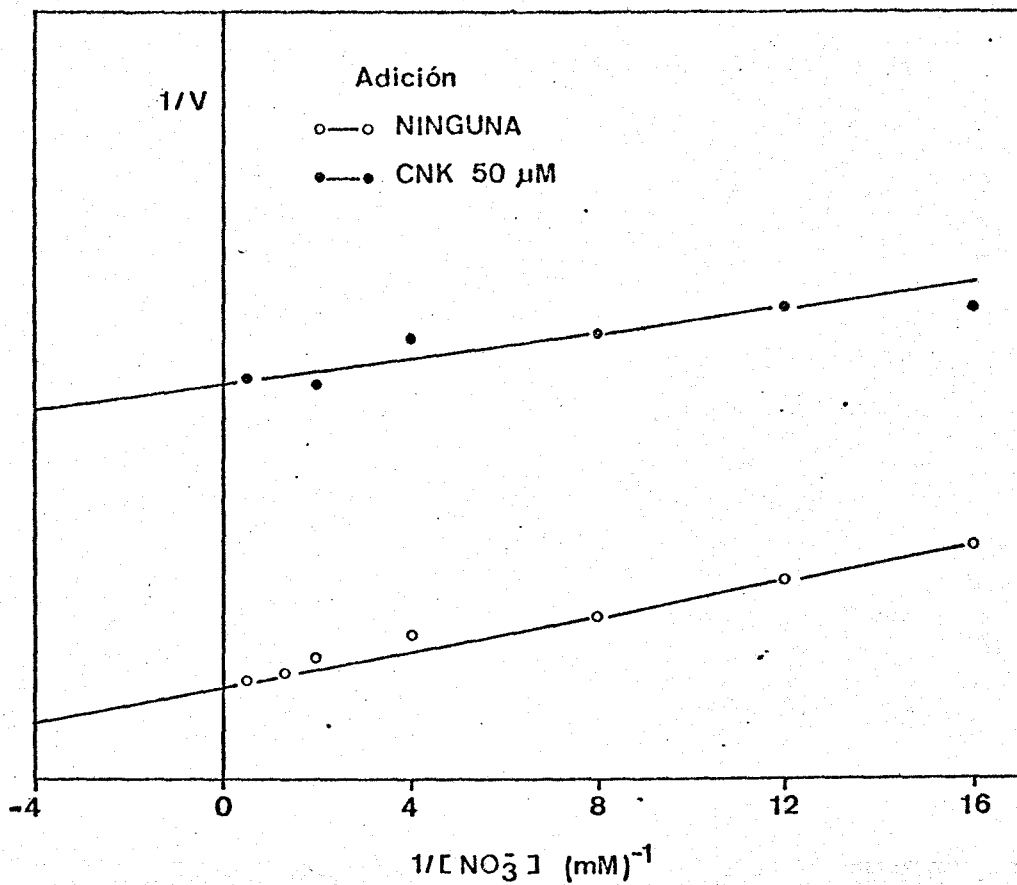


Fig. 8 *Inhibición por el cianuro sobre la nitrato reductasa con respecto al nitrato.* Los ensayos se llevaron a cabo según se indica en Materiales y Métodos excepto que el nitrato se utilizó a las concentraciones dadas y donde se indica se añadió al ensayo CNK 50  $\mu\text{M}$ . Extracto acelular, 0.25 mg.

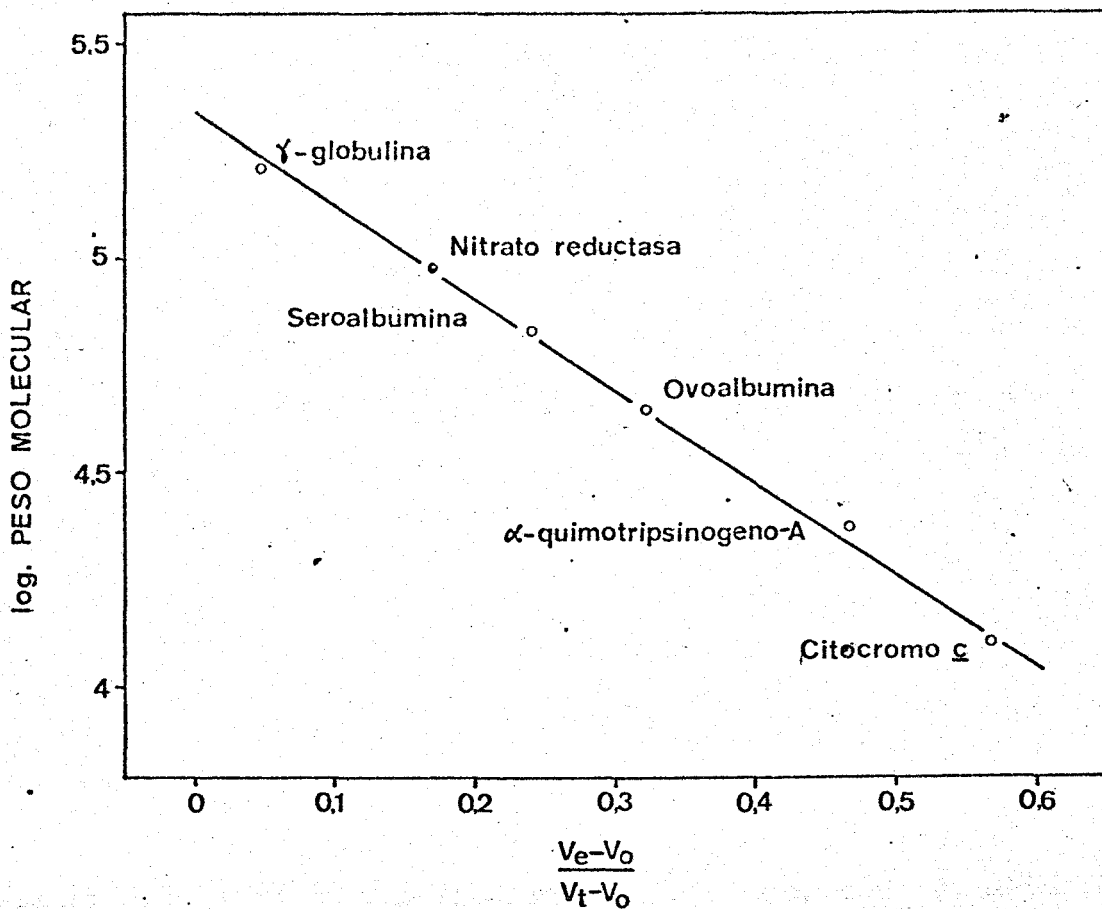


Fig. 9 Estimación del peso molecular de la nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* por filtración en una columna de *Se* *phadex G-150*. Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en Materiales y Métodos

$V_e$ = volumen de elución de cada proteína standard o del enzima  
 $V_t$ = volumen total de la columna  
 $V_0$ = volumen vacío.

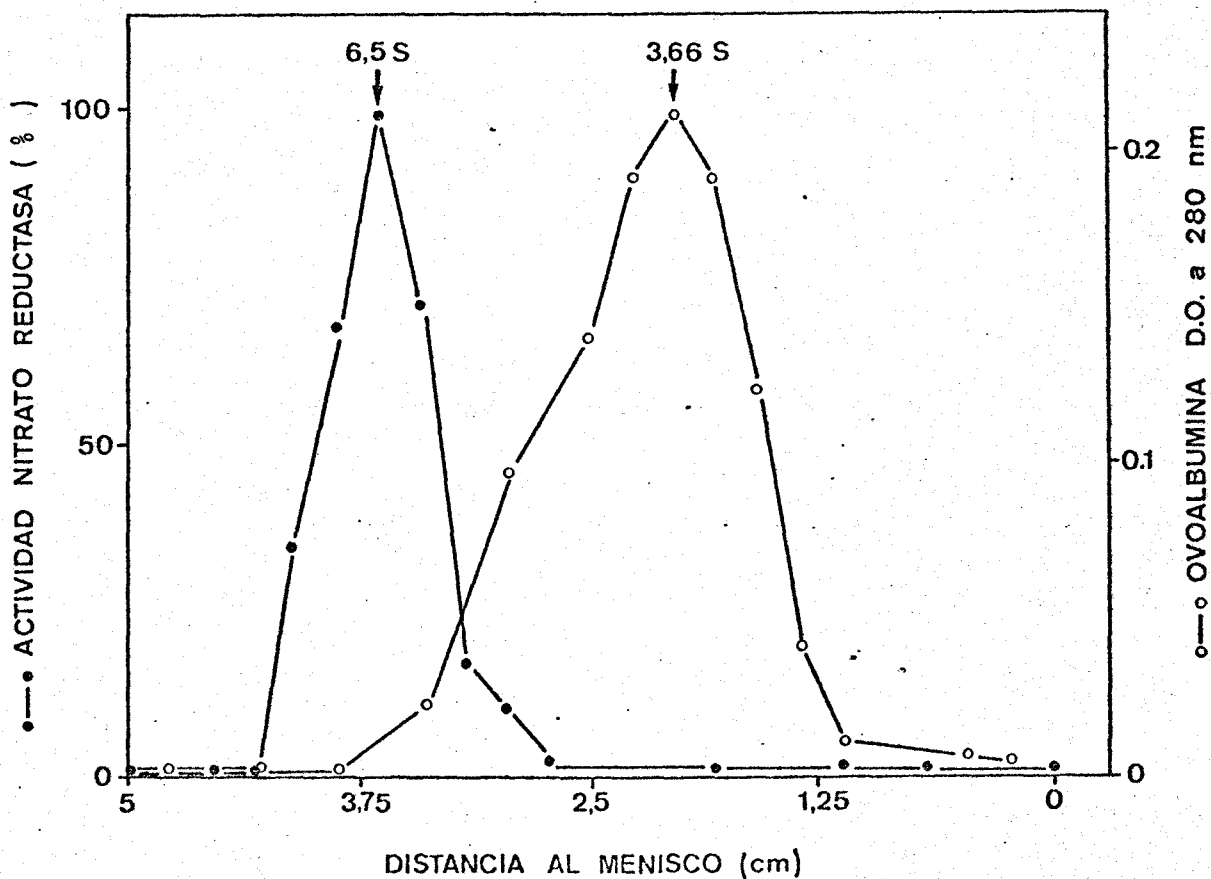


Fig. 10 *Determinación del coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus por centrifugación en gradiente de sacarosa.* 0.2 ml de extracto acelular conteniendo 0.4 mg de proteína se centrifugaron a 45.000 r.p.m. en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 20% durante 12,5 horas a 2°C en un tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.5, 2 mM en CNOK usando como proteína patrón ovoalbumina ( P.M.= 43.500;  $S_{20,w} = 3.66$ ). La actividad nitrato reductasa se determinó en fracciones de 0.1 ml en presencia de 2 mM CNOK a 30°C durante 15 min, con MV y ditioni to en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La ovoalbumina se detectó, midiendo su absorbancia a 280 nm.

calculado a partir del coeficiente de sedimentación por el método de MARTIN y AMES (1961) (72) fue de unos 100.000.

## 2. PAPEL DEL MOLIBDENO Y DEL HIERRO EN LA ASIMILACION DEL NITRATO EN Acinetobacter calcoaceticus

### 2.1. Efecto del tungstato sobre el crecimiento de células de Acinetobacter cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno

El tungstato inhibió el crecimiento de A. calcoaceticus cuando se añadió al medio de cultivo con nitrato como única fuente de nitrógeno. Este efecto no se pudo observar en medios en los que el nitrógeno estaba en forma de nitrito o amoníaco, incluso a concentraciones de tungstato 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 11). En estos experimentos se usaron inóculos deficientes en molibdeno. En las células cultivadas con nitrito o amoníaco el crecimiento fue rápido tanto en ausencia como en presencia de tungstato. En las células cultivadas en nitrato se observó una gran diferencia transcurriendo varias horas hasta que el cultivo que contenía tungstato mostró indicios de crecimiento.

### 2.2. Efecto inhibitor del tungstato a distintas concentraciones sobre el crecimiento de células de Acinetobacter cultivadas en nitrato

En la Figura 12 se presenta el efecto de concentracio

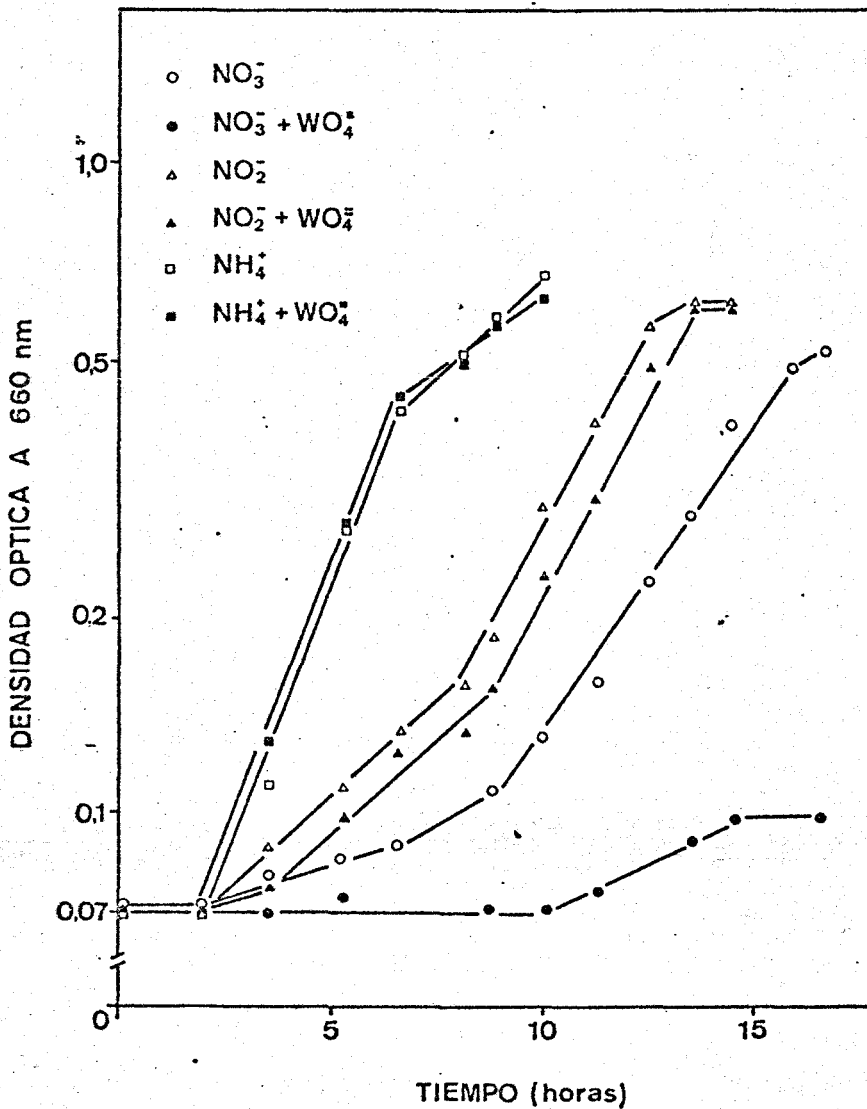


Fig. 11 Efecto inhibitor del tungstato sobre el crecimiento de células de Acinetobacter calcoaceticus cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno. El crecimiento se siguió según se detalla en Materiales y Métodos. Los medios usados eran deficientes en molibdeno y contenían la fuente de nitrógeno que se indica. Donde se indica,  $\text{WO}_4\text{Na}_2$  100  $\mu\text{M}$  se añadió al medio de cultivo. Otras condiciones experimentales se especifican en Materiales y Métodos.

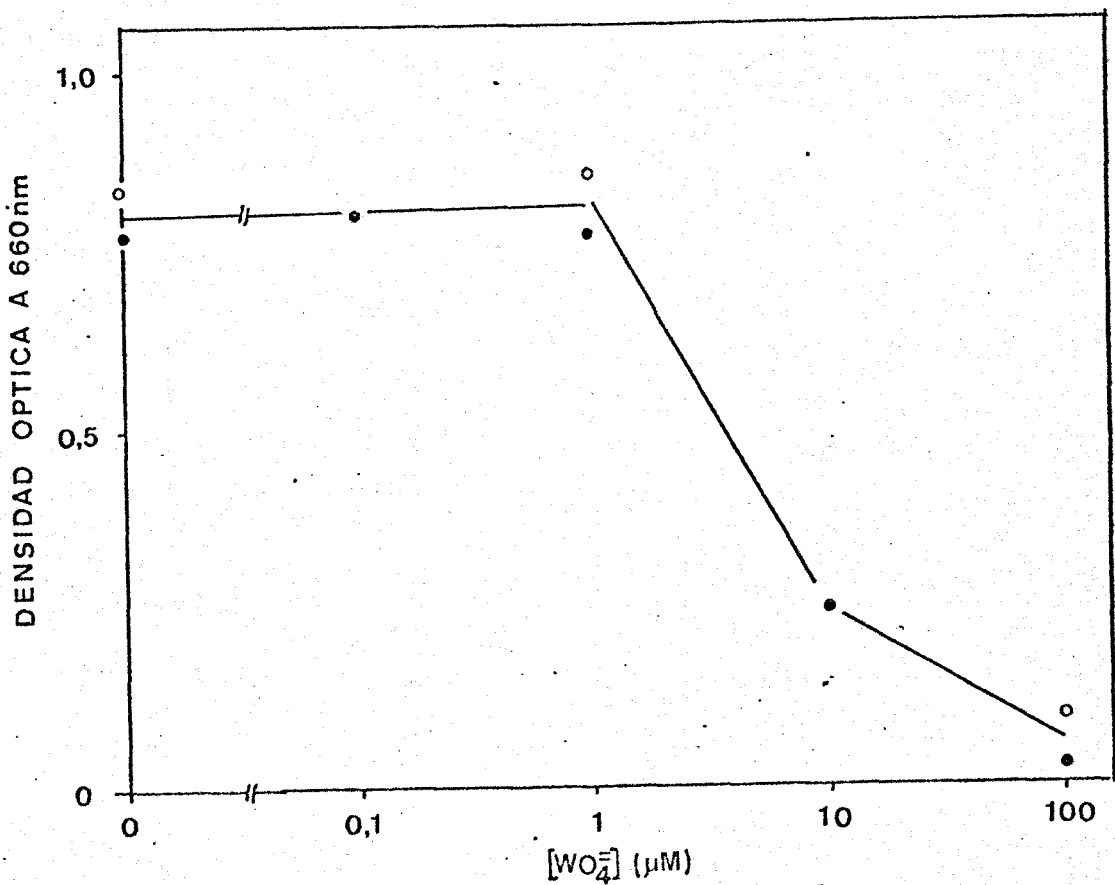


Fig 12 Efecto inhibitor del tungstato a distintas concentraciones sobre el crecimiento de células de Acinetobacter calcoaceticus cultivadas en nitrato. Las células se crecieron durante 13 horas en medios que contenían 0.25 µM de MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y las cantidades de WO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> que se indican. El inóculo de partida era deficiente en molibdeno y se cultivó con amonio como fuente nitrogenada. Otras condiciones experimentales se especifican en Materiales y Métodos.



nes crecientes de tungstato añadidas al medio de cultivo con nitrato sobre el crecimiento de A. calcoaceticus. Se observa que una concentración de 10  $\mu\text{M}$  afecta el crecimiento en gran medida.

### 2.3. Efecto del tungstato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter

La adición de cantidades crecientes de tungstato a células de Acinetobacter cultivadas en nitrato, produjo una drástica disminución en los niveles de nitrato reductasa. El efecto antagónico de tungstato frente al molibdato en la actividad enzimática se muestra en la Fig. 13.

### 2.4. Efecto de molibdato sobre el crecimiento de Acinetobacter en medios con nitrato y en presencia de tungstato

En la Fig. 14 se muestra la competencia en el crecimiento operada por molibdato añadido a células cultivadas en presencia de tungstato. Una concentración de molibdato 1  $\mu\text{M}$  es capaz de superar el efecto de una concentración de tungstato 100  $\mu\text{M}$ , que en ausencia de molibdato impedía prácticamente el crecimiento de células cultivadas en nitrato (Fig. 11).

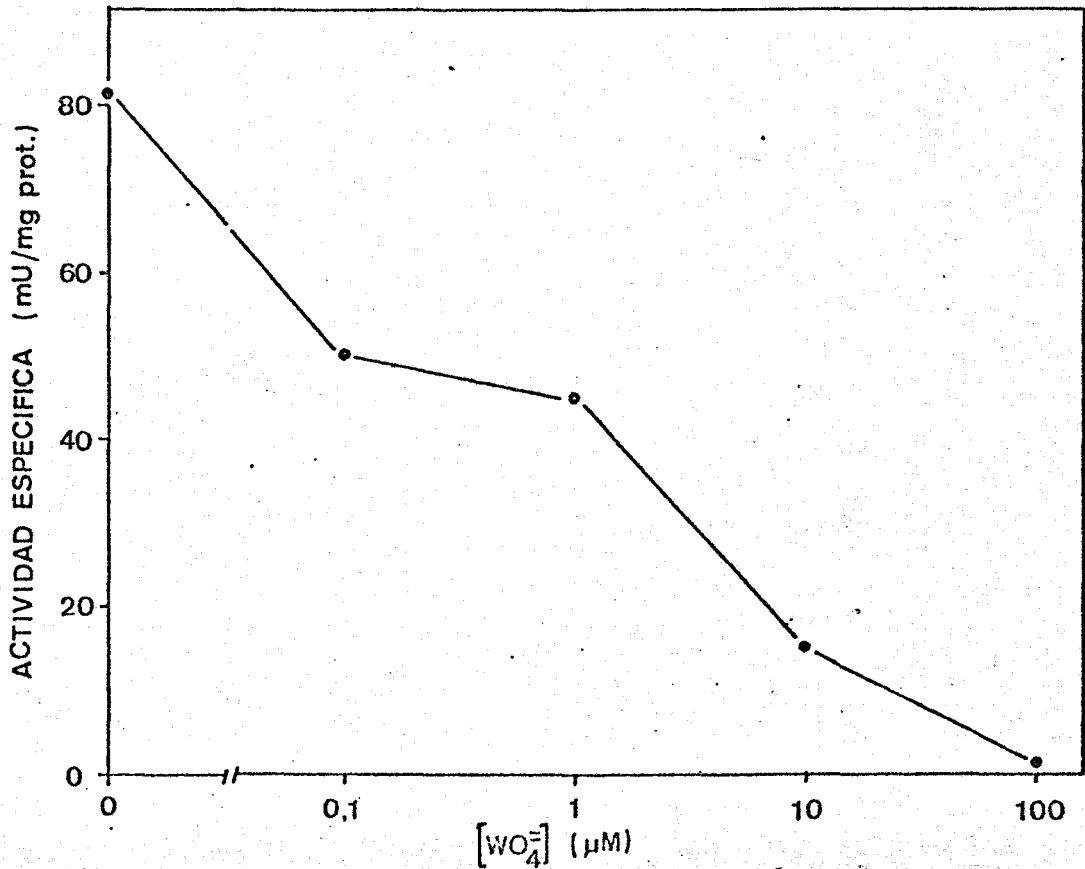


Fig. 13 Efecto del tungstato sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Las células se crecieron durante 13 horas en medios con nitrato que contenían  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ ,  $0.25 \mu\text{M}$  y las concentraciones de  $\text{WO}_4\text{Na}_2$  que se indican. A continuación se recogieron las células y se prepararon los extractos acelulares en los que se determinó la actividad nitrato reductasa, como se describe en Materiales y Métodos. Los inóculos de partida eran deficientes en molibdeno y procedían de células cultivadas en amonio.

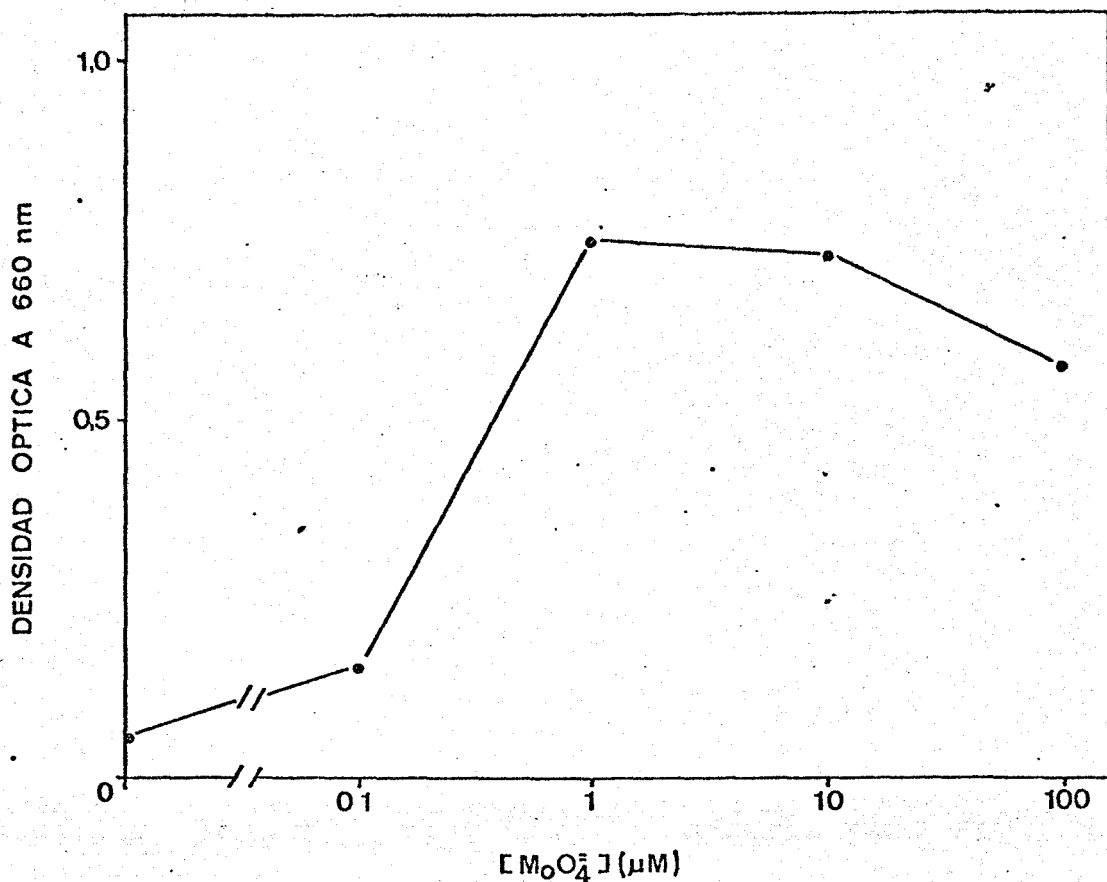


Fig. 14 Efecto del molibdato sobre el crecimiento de células de Acinetobacter calcoaceticus cultivadas en nitrato y en presencia de tungstato. Las células se crecieron durante 13 horas en medios con nitrato, 10.0 μM de WO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y las concentraciones de MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> que se indican. Otras condiciones experimentales fueron las mismas que se indican en la leyenda de la Fig. 12.

## 2.5 Efecto del molibdato sobre la actividad nitrato reductasa de células de Acinetobacter cultivadas en nitrato y en presencia de tungstato

El efecto antagónico entre el molibdato y tungstato se ha visto también a nivel de actividad enzimática. Al crecer células en nitrato,  $WO_4Na_2$  100  $\mu$ M y concentraciones crecientes de molibdato, un incremento paralelo de los niveles intracelulares de nitrato reductasa, pudo ser observado (Fig. 15).

## 2.6 Efecto del hierro sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter

El posible papel del hierro sobre la actividad nitrato reductasa se estudió mediante experimentos similares a los descritos en 2.5. Como se muestra en la Fig. 16 creciendo Acinetobacter en concentraciones crecientes de  $Fe^{2+}$  en medios con nitrato, se observó un incremento significativo de la actividad enzimática paralelo a las concentraciones del metal presentes en el medio de cultivo.

## 3. INACTIVACION Y REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

### 3.1. Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter

Como queda indicado anteriormente (1.4), la actividad nitrato reductasa cuando se ensayaba con MV y ditionito a 30° C

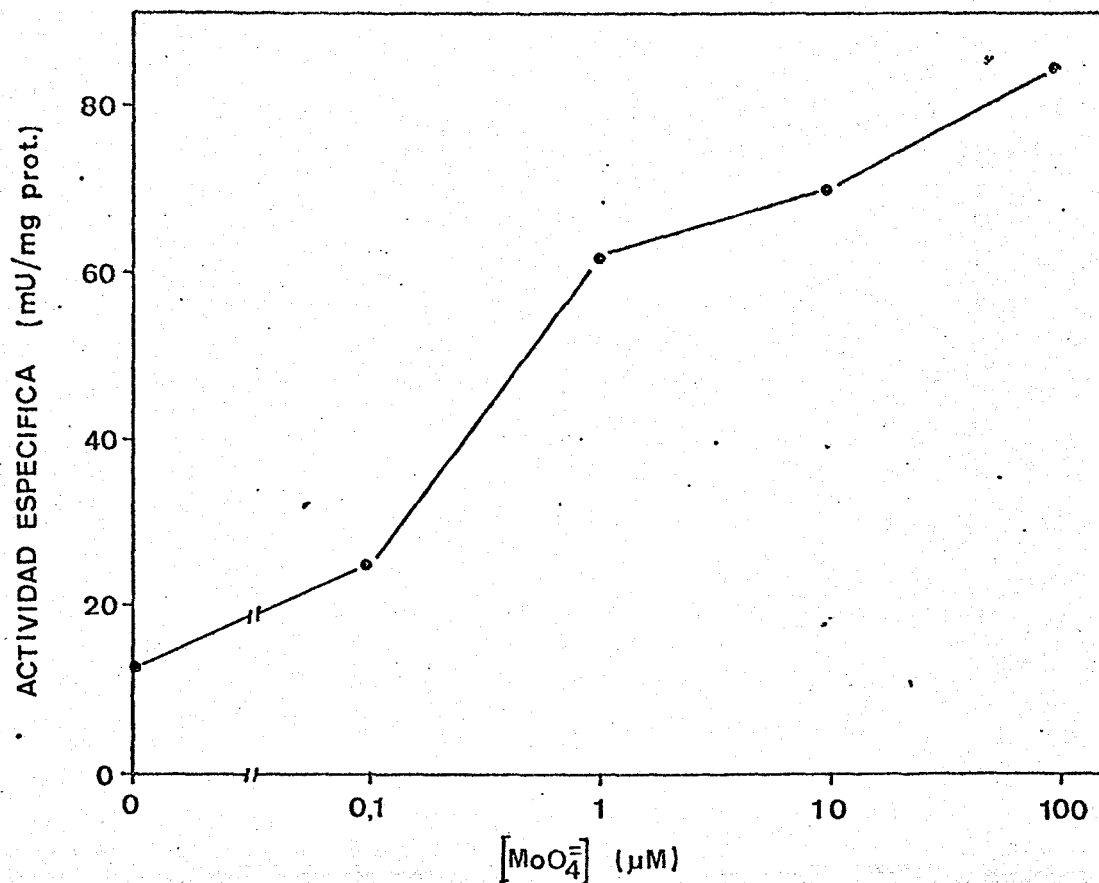


Fig. 15 Efecto del molibdato sobre la actividad nitrato reductasa de células de *Acinetobacter calcoaceticus* cultivadas en nitrato y en presencia de tungstato. Las células se crecieron en medios con nitrato, 100 μM de WO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y las concentraciones de MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> que se indica. Otras condiciones experimentales fueron las mismas que se indica en la leyenda de la Fig. 13.

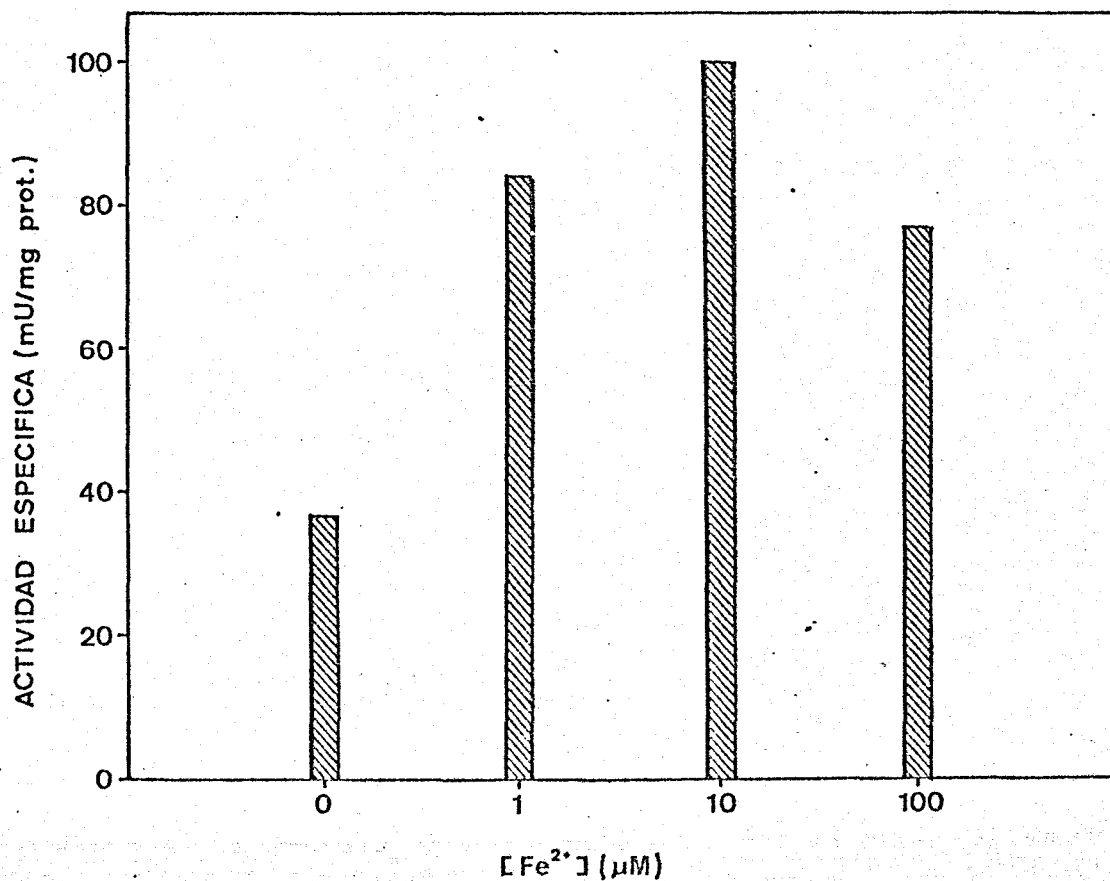


Fig. 16 Efecto del hierro sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Las células se crecieron durante 13 horas en medios con nitrato y a las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> que se indica. Los inóculos de partida se prepararon a partir de células cultivadas con amonio en medios deficiente en hierro. Para otras condiciones experimentales, ver Materiales y Métodos

experimentaba, después de breve tiempo una inactivación total. Si el ensayo se realiza en presencia de CNOK 2 mM, la velocidad de la reacción permanecía constante al menos durante 30 min. Y si la adición de cianato se hace al enzima previamente inactivado, se observa un efecto reactivador que reestablece la capacidad del enzima en el proceso de reducción (Fig. 17).

### 3.2. Reducción de nitrato en presencia de cianato por la nitrato reductasa de Acinetobacter con metil viologeno reducido químicamente con ditionito

La reacción enzimática se caracterizó en presencia de cianato. En estas condiciones la reacción presentó los mismos requerimientos de sustrato, reductor, transportador de electrones y enzima, observados en el ensayo normal en ausencia de cianato (Tabla 4).

### 3.3. Efecto de la concentración de cianato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter

En la Fig. 18 se presenta el efecto de distintas concentraciones de cianato añadidas al ensayo de actividad de la nitrato reductasa. La actividad se incrementó al aumentar la concentración de cianato hasta 2 mM. A concentraciones superiores la velocidad de la reacción enzimática no experimentó cambio alguno.

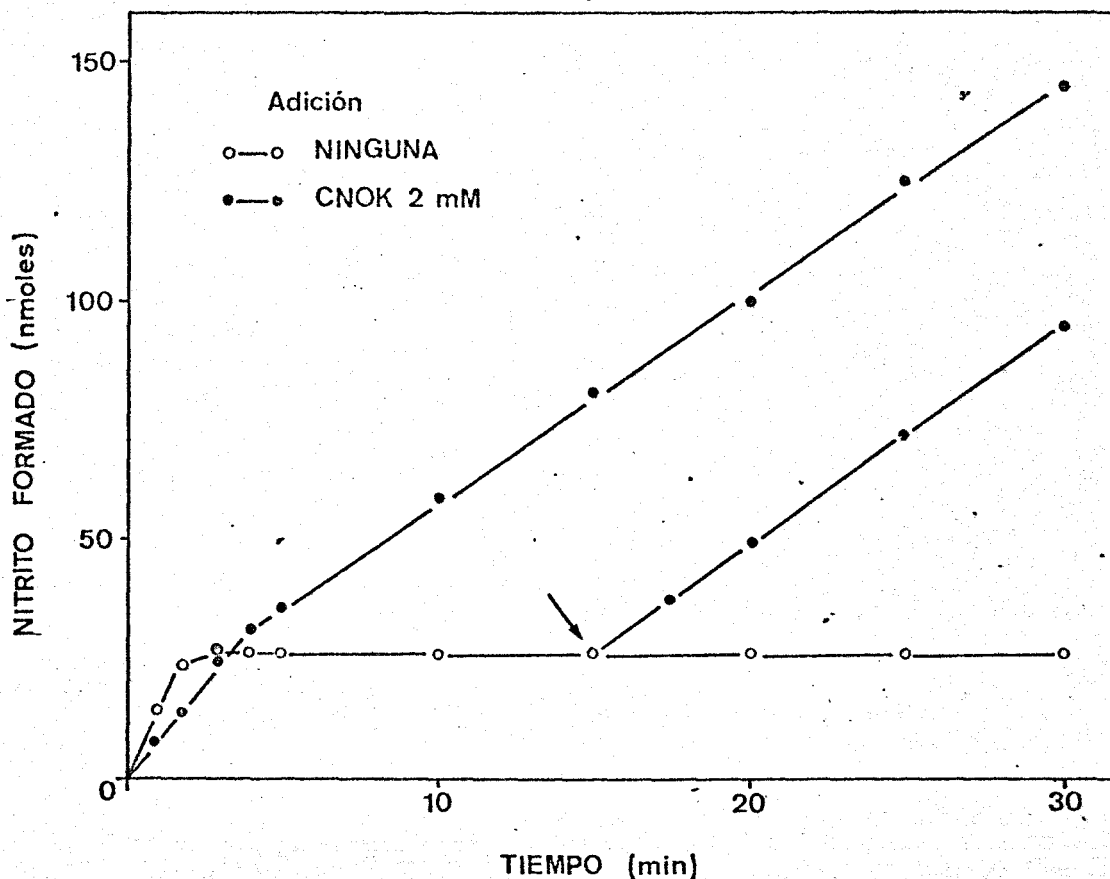


Fig. 17 Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 12 ml: 1.2 mmoles de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 120  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$ ; 60  $\mu$ moles de metil viologeno; 9.6 mg de ditionito sódico en 1.2 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  95 mM y 4.8 mg de preparación enzimática. Donde se indica se añadió CNOK hasta una concentración 2 mM. La reacción se llevó a cabo a 30°C a los tiempos indicados en alícuotas de 1 ml.



TABLA 4

REDUCCION DE NITRATO EN PRESENCIA DE CIANATO POR LA NITRATO  
 REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus CON METIL VIOLOGE-  
 NO REDUCIDO QUIMICAMENTE CON DITIONITO

SISTEMA	NITRITO FORMADO (nmoles)
Completo	82
<u>menos</u> $\text{CNO}^-$	18
<u>menos</u> $\text{NO}_3^-$	3
<u>menos</u> MV	3
<u>menos</u> $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	2
Completo, nitrato reductasa calentada 5 min a $100^\circ\text{C}$	2

Las condiciones de la reacción fueron las descritas en Ma-  
 teriales y Métodos para el ensayo a  $30^\circ\text{C}$  excepto que el sis-  
 tema de reacción contenía CNOK 2 mM y la duración del ensayo  
 fué de 30 min. Preparación enzimática 0,04 mg.

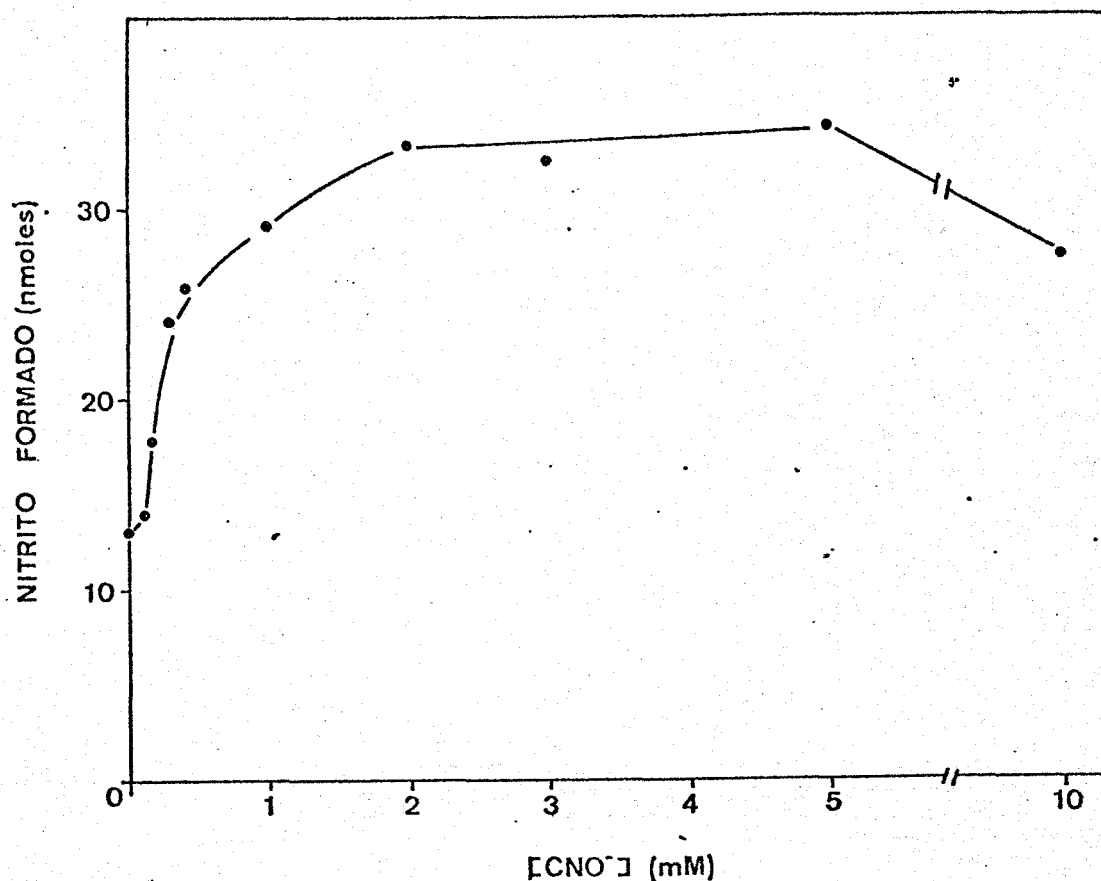


Fig.18 Efecto de la concentración de cianato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ moles de tampón fosfato<sup>4</sup>potásico, pH 7.5; 10  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$ ; 5  $\mu$ moles de MV; 0.8 mg de  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  en 0.1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  95 mM; 0.8 mg de preparación enzimática y las concentraciones de CNOK que se indican. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 10 min.

### 3.4. Relación entre la concentración de enzima y la actividad nitrato reductasa en presencia y en ausencia de cianato

La actividad enzimática fue proporcional a la concentración del enzima en el ensayo cuando se llevó a cabo la reacción en presencia de cianato, al igual que cuando éste estaba ausente, aunque en presencia de agente protector se observó un ligero incremento de la actividad (Fig.19).

### 3.5. Efecto del cianato sobre la actividad nitrato reductasa ensayada a baja temperatura

La adición de cianato a la mezcla de reacción, cuando el ensayo se llevó a cabo a 2°C, no se tradujo en un incremento significativo de la actividad enzimática (Fig. 20), lo cual no quiere decir que la inactivación antes descrita ( 1.4 ), fuese exclusivamente un efecto de la temperatura, ya que el enzima calentado a 30°C durante 15 min., retuvo su actividad íntegramente cuando se ensayó a 2°C (Fig. 21).

### 3.6. Reactivación con cianato a 2°C de la nitrato reductasa inactivada previamente en el ensayo a 30°C

El enzima inactivado en el ensayo a 30°C es capaz de reactivarse con cianato a bajas temperaturas mientras que el simple cambio de temperatura desde 30°C a 2°C, fué incapaz de provocar la reactivación (Fig. 22). Lo cual refuerza el hecho de que no sólo

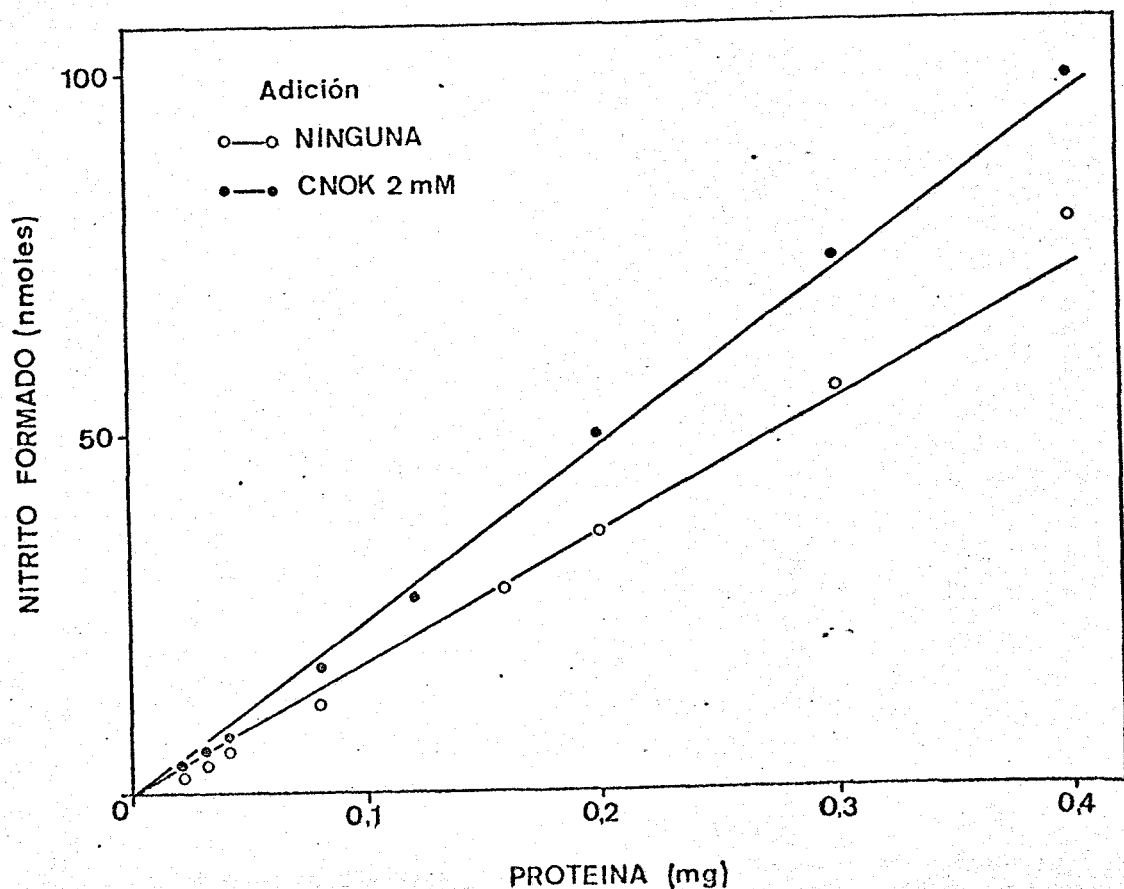


Fig. 19 *Relación entre la concentración de enzima y la actividad nitrato reductasa en presencia y ausencia de cianato.* La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 10  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$ ; 5  $\mu$ moles de MV y 0.8 mg de ditionito en 0.1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  95 mM. Donde se indica se añadieron 2  $\mu$ moles de CNOK. Extracto acelular, 0.2 mg.

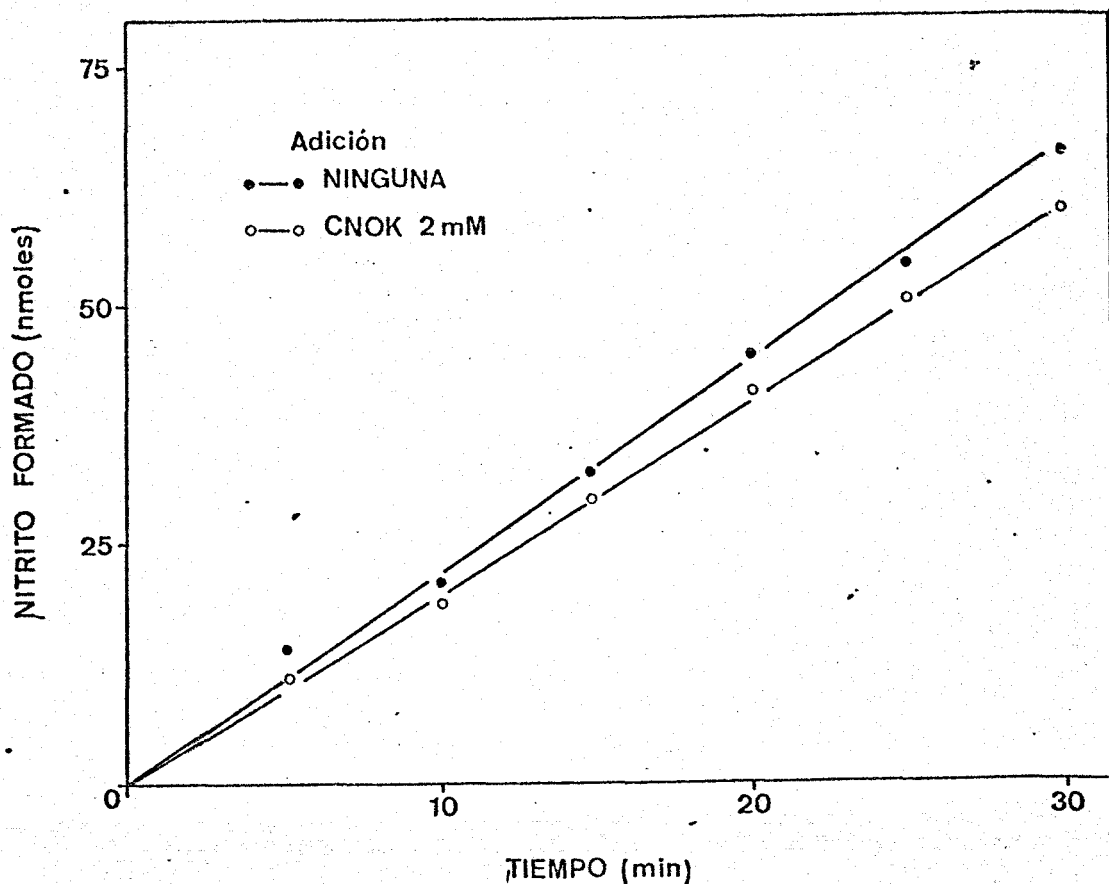


Fig. 20 *Cinética de la reducción de nitrato mediante la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus a 2°C en presencia y en ausencia de cianato.* La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 12 ml: 1.2 mmoles de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 120  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$ ; 60  $\mu$ moles de MV; 9.6 mg de ditionito sódico en 1.2 ml de  $\text{CO}_2\text{HNa}$  95 mM y 4.8 mg de preparación enzimática. Donde se indica se añadieron 24  $\mu$ moles de CNOK. A los tiempos señalados, se tomaron alícuotas de 1 ml en las cuales se determinó el nitrato formado, como se describe en Materiales y Métodos.

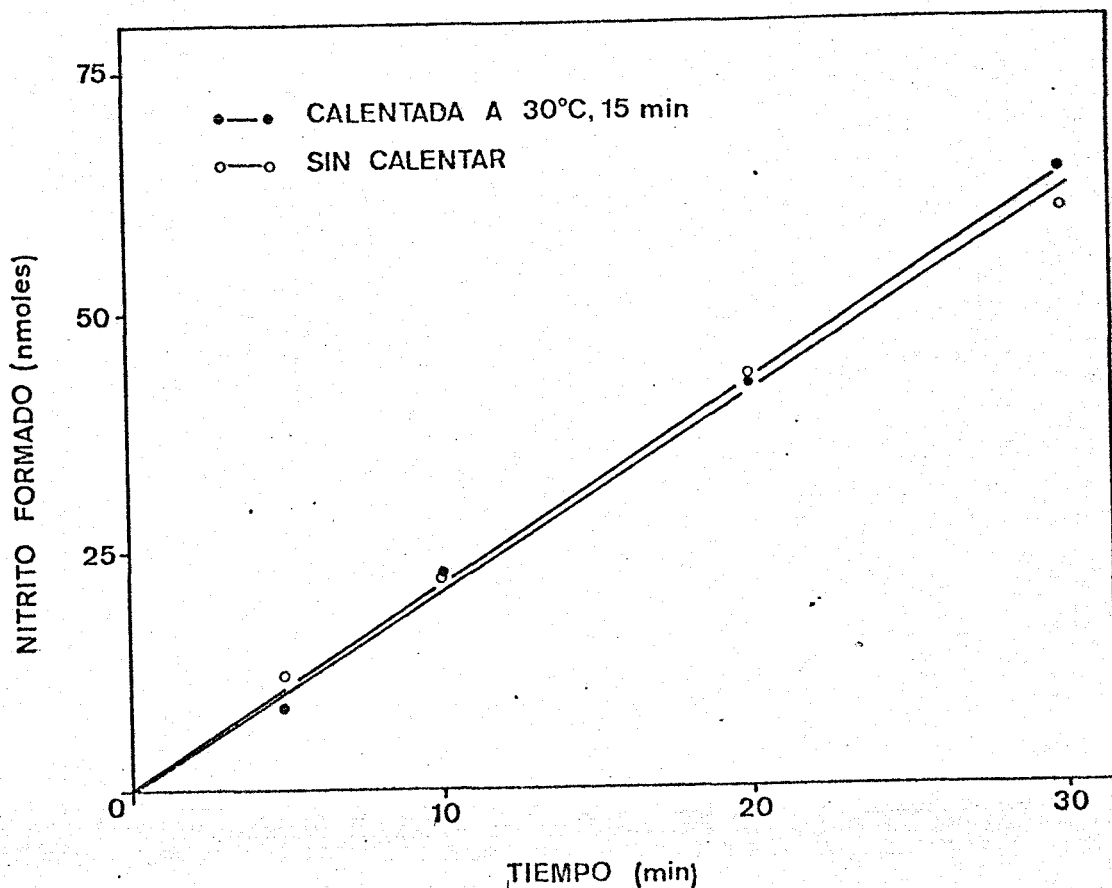


Fig. 21 *Cinética de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus ensayada a 2°C y previamente calentada a 30°C.* Donde se indica la preparación enzimática (2 mg) se preincubó con tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.5 durante 15 min a 30°C. A continuación se le añadieron los reactivos de ensayos como se indica en Materiales y Métodos y la actividad se ensayó a 2°C en alícuotas de 1 ml en las que se determinó el nitrito aparecido a los tiempos indicados. La mezcla de reacción fué de 10 ml.

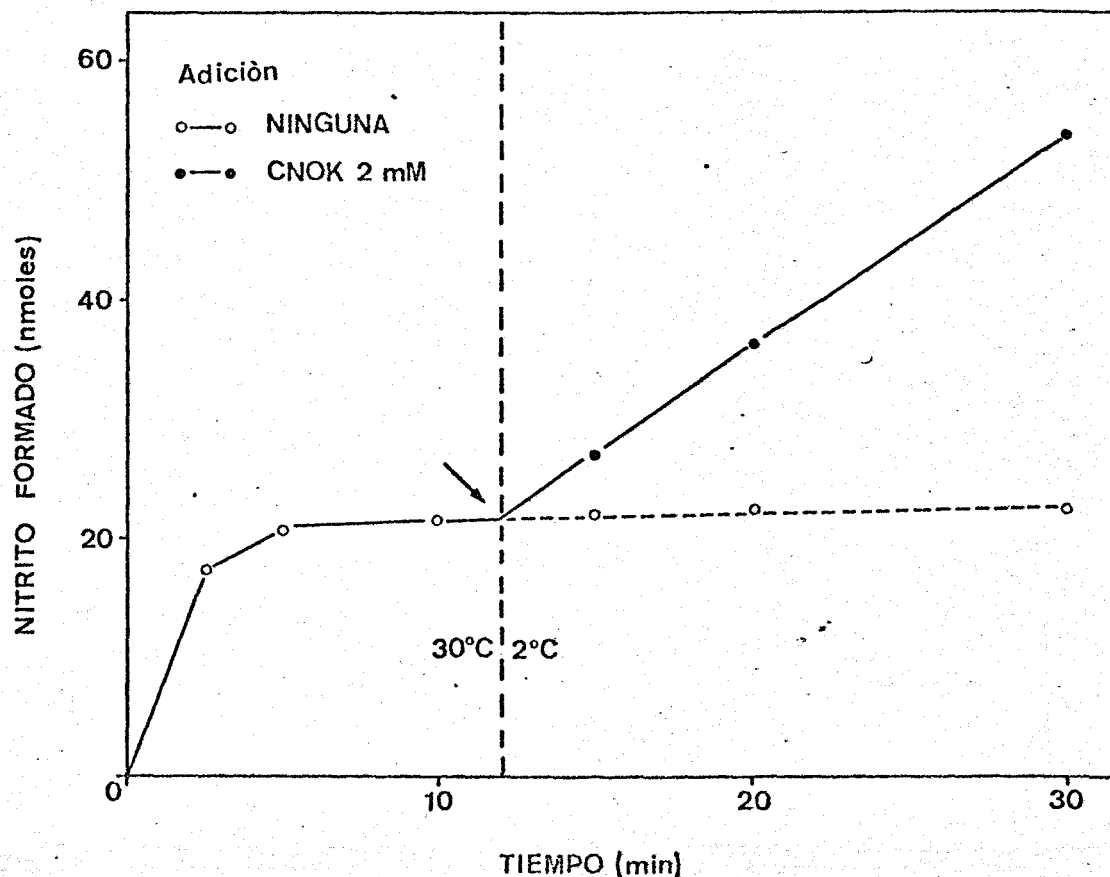


Fig. 22 Efecto del cianato a 2°C sobre la nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* previamente inactivada a 30°C. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 10,8 ml: 1,2 mmoles de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 120 µmoles de NO<sub>3</sub>K; 60 µmoles de metil viologeno; 9,6 mg de ditionito sódico en 1.2 ml de CO<sub>3</sub>HNa 95 mM y 5 mg de preparación enzimática. La reacción se llevó a cabo a 30°C tomándose alícuotas de 0.9 ml en las que se determinó el nitrito aparecido, a los tiempos señalados. Donde se indica, se dividió el resto de la mezcla de reacción en dos partes y se continuó la reacción a 2°C, añadiéndose CNOK a una de ellas, hasta una concentración final de 2 mM y determinándose la actividad de la misma manera en alícuotas de 0,9 ml a los tiempos indicados.

interviene la temperatura en la inactivación de la nitrato reductasa.

### 3.7. Efecto de la concentración de nitrato y metil viologeno sobre la actividad nitrato reductasa ensayada en presencia de cianato

En la Fig. 23 se muestra una representación de inversos tipo Lineweaver-Burk de la actividad nitrato reductasa de A. calcoaceticus ensayada a 30°C en presencia y en ausencia de CNOK. A diferencia del curso bifásico que se observó en ausencia de cianato, en presencia de éste el enzima presentó una saturación por sustrato tipo Michaelis-Menten. En estas condiciones se calculó un  $K_m$  aparente para el nitrato de 0.35 mM.

Cuando se intento determinar la  $K_m$  para el MV en presencia de cianato, con cantidades fijas de ditionito, se observó el mismo fenómeno que cuando se estudió en ausencia del agente protector (Fig. 24) (ver 1.7)..

### 3.8. Efecto de distintas concentraciones de nitrato sobre la inactivación de la nitrato reductasa de Acinetobacter reducida con ditionito

Cuando el enzima se preincubó con ditionito a 2°C no se observó prácticamente inactivación. Si el tratamiento se reali-



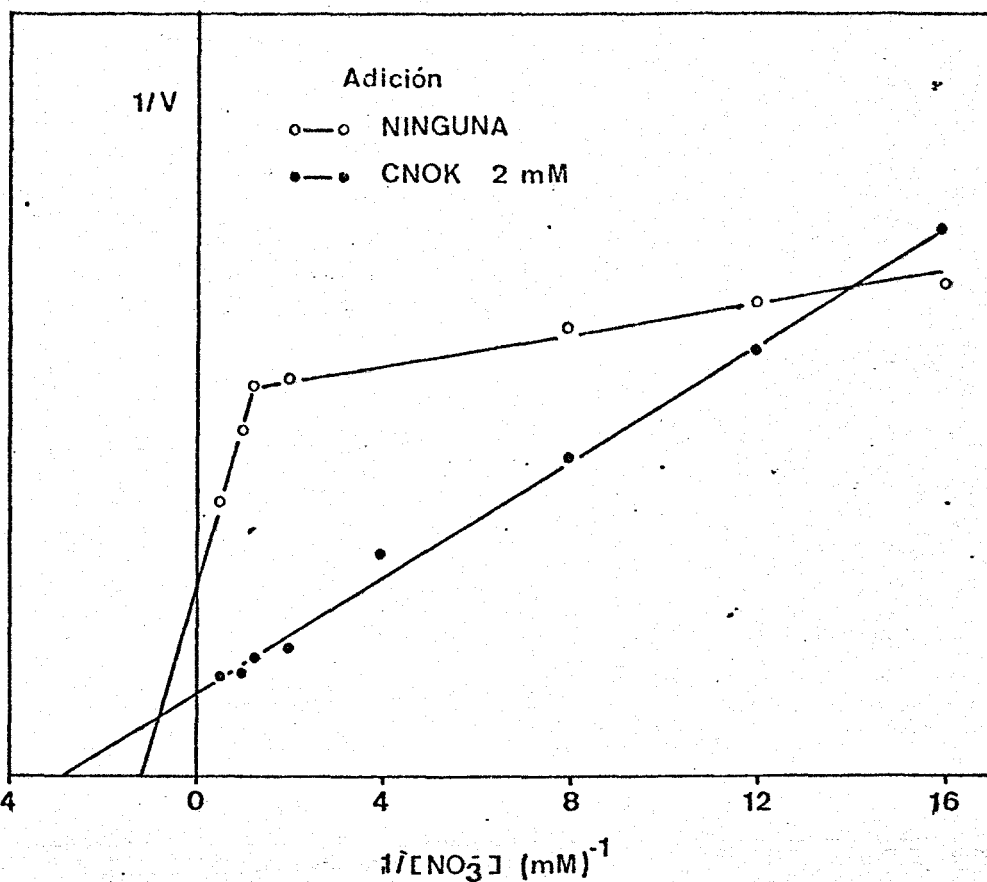


Fig. 23 Efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* en ausencia y en presencia de cianato, a 30°C. La preparación enzimática (0.4 mg) se ensayó a 30°C durante 2 min con las concentraciones de nitrato indicadas bien en ausencia o en presencia de CNOK 2 mM. Otras condiciones de ensayo fueron las mismas que se indica en Materiales y Métodos. El volumen final de la mezcla de reacción fué 2 ml.

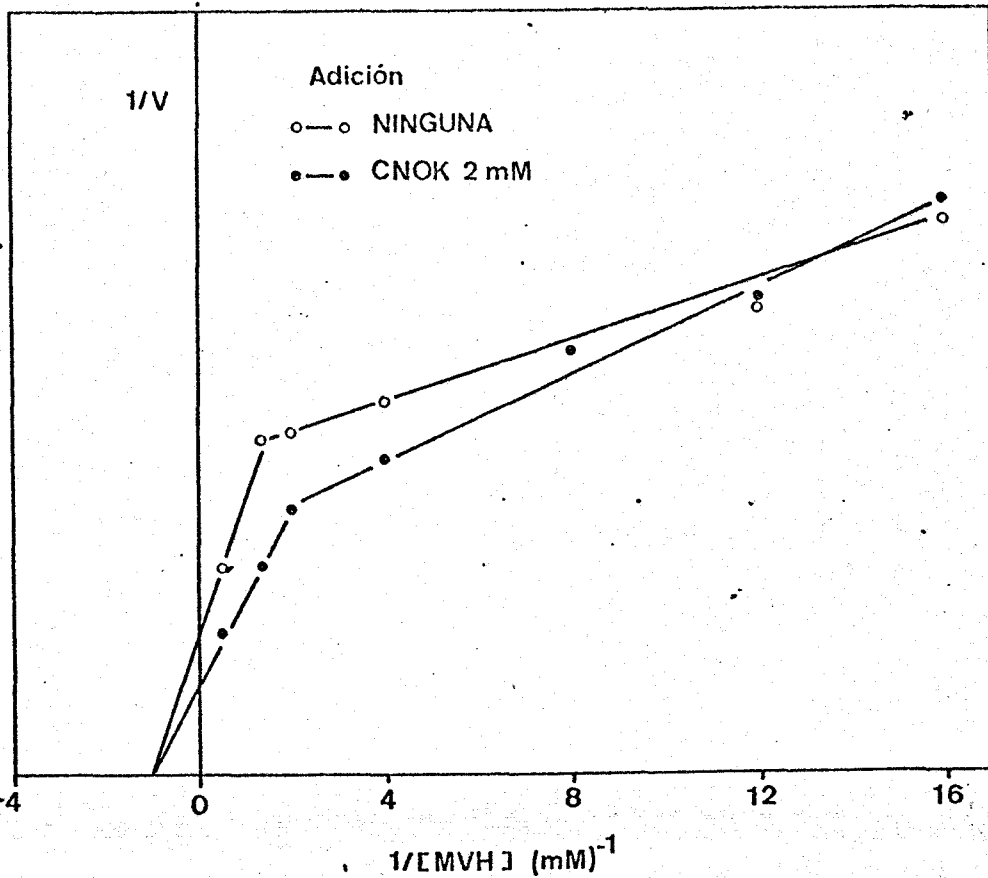


Fig. 24 Efecto de la concentración de metil viologeno sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* a concentración constante de ditonito en ausencia y en presencia de cianato. La nitrato reductasa (0.2 mg) se ensayó a 30°C durante 15 min con distintas concentraciones de metil viologeno. Donde se indica la actividad se ensayó en presencia de CNOK 2 mM. O tras condiciones experimentales fueron las mismas que se indican en Materiales y Métodos.

zaba en presencia de pequeñas concentraciones de nitrato se observaba una drástica inactivación. A concentraciones mayores, del orden de 10 mM la inactivación no fué tan significativa (Fig.25).

### 3.9. Cinetica de inactivación de la nitrato reductasa por ditionito y bajas concentraciones de nitrato

El proceso de inactivación de la nitrato reductasa por ditionito y bajas concentraciones de nitrato es muy rápida y en 2 min. la inactivación fué prácticamente total (Fig. 26).

### 3.10. Protección por cianato de la inactivación de la nitrato reductasa producida por ditionito y nitrato

El cianato añadido a la mezcla de preincubación, antes que el ditionito y el nitrato, evitaba la inactivación antes mencionada (Tabla 5) .

### 3.11. Reactivación por cianato de la nitrato reductasa de Acinetobacter inactivada por ditionito y nitrato

El enzima inactivado por ditionito y nitrato se reactiva hasta un 80% al añadir CNOK en el momento del ensayo (Tabla 6). Cuando el enzima inactivado se preincubó durante 10 min. a 2°C en presencia de CNOK 2 mM, la reactivación conseguida fué completa (Tabla 7).

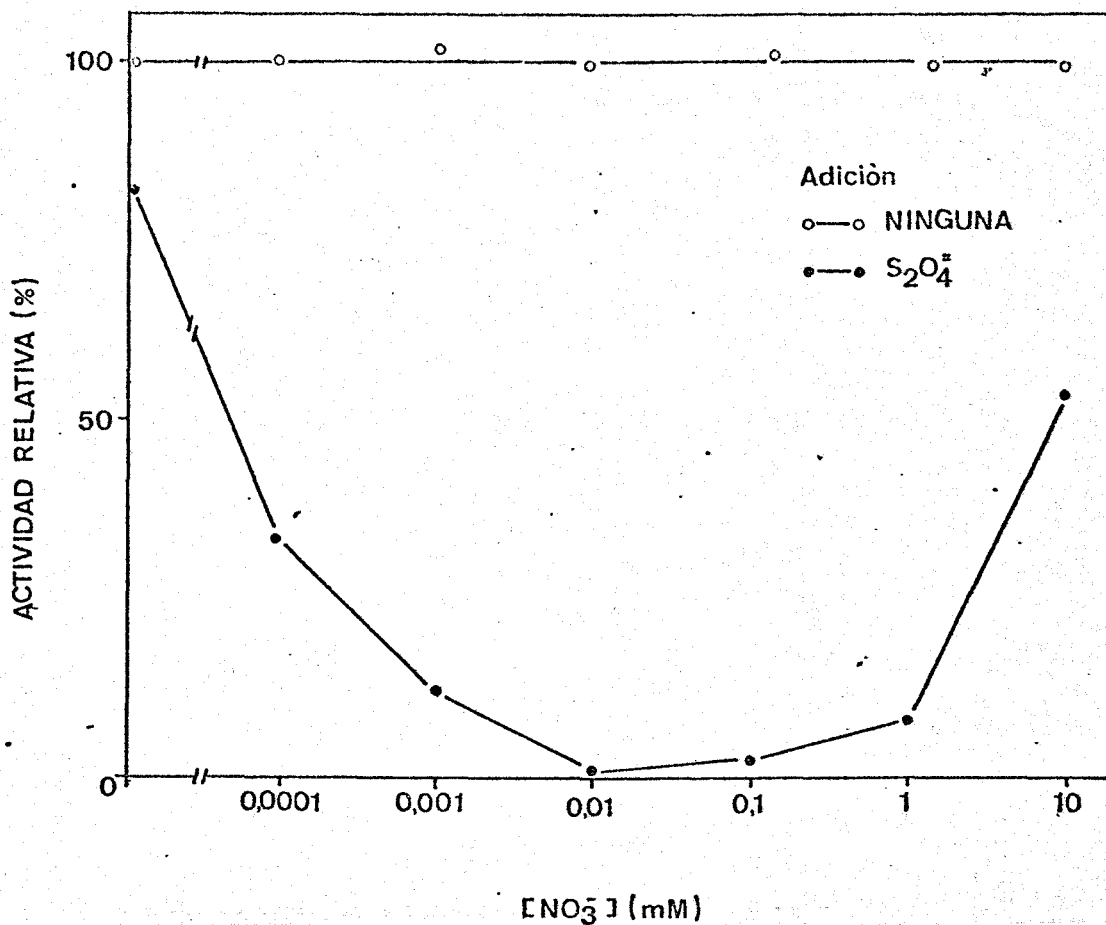


Fig. 25 Efecto de distintas concentraciones de nitrato sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* reducida con ditionito. 0.8 mg de extracto acelular se preincubaron con 25  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7.5; 0.4 mg de S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> en 0.05 ml de CO<sub>3</sub>HNa 95 mM, y las concentraciones de NO<sub>3</sub>K que se indican durante 15 min a 2°C. Posteriormente se tomaron alícuotas de 0.1 ml ensayándose en ellas la actividad a 2°C, durante 10 min en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

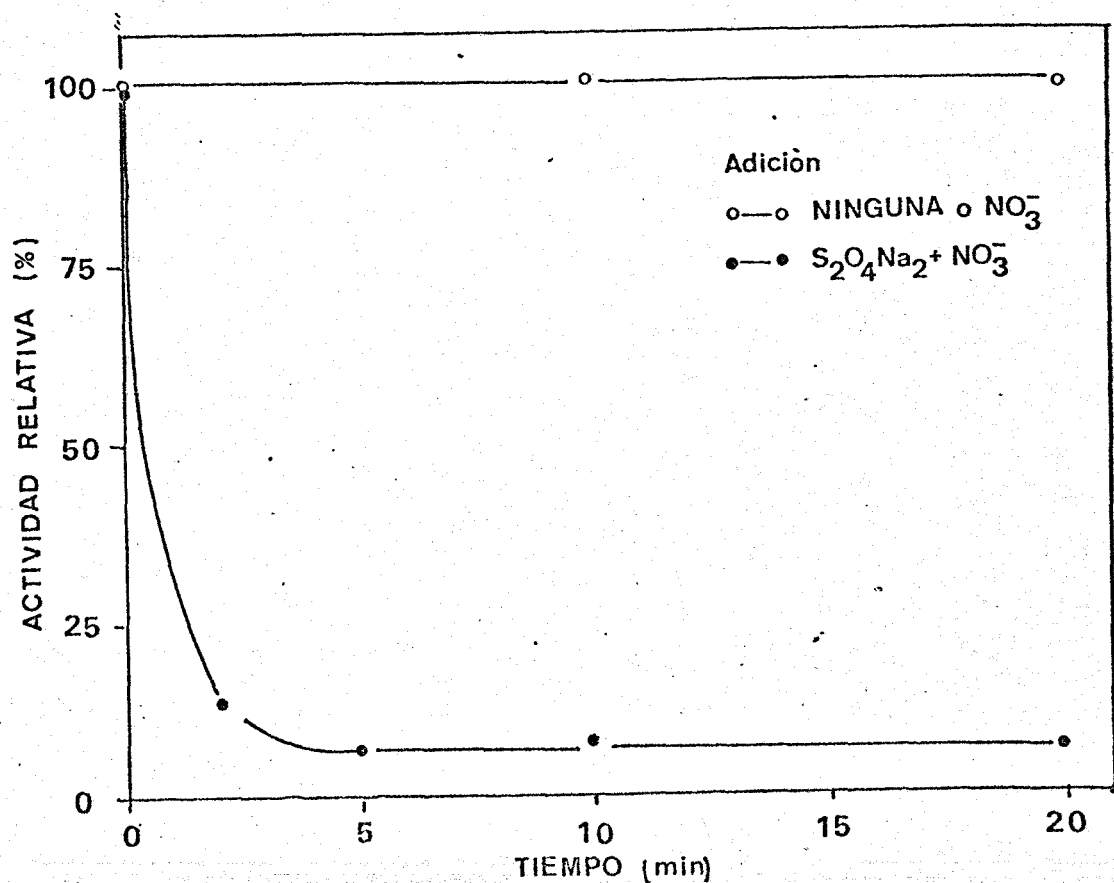


Fig. 26 *Cinética de inactivación de la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus por ditionito y bajas concentraciones de nitrato.* La preparación enzimática (2,8 mg) se preincubó a 2°C, en un volumen total de 2 ml en presencia de 100 μmoles de tampón fosfato potásico, pH 7.5 y 20 nmoles de NO<sub>3</sub>K y 1,6 mg de S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> disueltos en 0.2 ml de CO<sub>3</sub>HNa 95 mM. La activación se determinó, a los tiempos indicados, en alícuotas de 0.1 ml completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard, como se describe en Materiales y Métodos.

TABLA 5

PROTECCION POR CIANATO DE LA INACTIVACION DE LA NITRATO  
 REDUCTASA PRODUCIDA POR DITIONITO Y NITRATO

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	100
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	3
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$ , $CNO^-$	93

El extracto acelular (1 mg) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 50  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7,5 y donde se indica, con 10 nmoles de  $NO_3^-K$ , 1  $\mu$ mol de  $CNO^-K$  y 0,8 mg de  $S_2O_4Na_2$  en 0.1 ml de  $CO_3HNa$  95 mM, durante 15 min a 2°C. La actividad se determinó, después de la preincubación, en alicuotas de 0.1 ml, completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard, a 2°C, como se indica en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 48 nmoles de nitrito formado en 10 min. Cuando fué necesario, los valores de la actividad se corrigieron sustrayendo el nitrito formado durante la preincubación.

TABLA 6

REACTIVACIÓN DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter cal-coaceticus PREVIAMENTE INACTIVADA CON DITIONITO Y NITRATO POR ADICION DE CIANATO EN EL MOMENTO DEL ENSAYO ENZIMATICO

TRATAMIENTO	ADICION	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	-	100
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	-	10
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	$CNO^-$	79

La preparación enzimática (1.3 mg) se preincubó en un volumen final de 1 ml, 50  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7,5 y donde se indica 10 nmoles de  $NO_3^-K$  y 0,8 mg de  $S_2O_4^{2-}$  en 0.1 ml de  $CO_3HNa$  95 mM, durante 10 min a 2°C. La actividad se determinó, después de la preincubación, en alícuotas de 0.4 ml, completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard, a 2°C como se explica en Materiales y Métodos. Donde se indica se añadió además 2  $\mu$ moles de CNOK. El 100% de actividad corresponde a 67 nmoles de nitrito formado en 10 min.

TABLA 7

REACTIVACION POR CIANATO DE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Acinetobacter calcoaceticus INACTIVADA CON DITIONI-  
 TO Y NITRATO

TRATAMIENTO I	TRATAMIENTO II	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	Ninguno	100
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	Ninguno	6
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	$CNO^-$	99

El extracto acelular (2.3 mg) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 50  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7.5, y donde se indica, 10 nmoles de  $NO_3^-K$ ; 0.8 mg de  $S_2O_4^{2-}$  en 0.1 ml de  $CO_3HNa$  95 mM durante 10 min a 2°C. Posteriormente, donde se indica, se añadió 1  $\mu$ mol de  $CNO^-$  y se preincubó durante 10 min a 2°C. La actividad se determinó a 2°C en alícuotas de 0.2 ml completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard, como se indica en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 90 nmoles de nitrito formado en 20 min. Cuando fué necesario, la actividad se corrigió sustrayendo el nitrito formado durante la preincubación.



### 3.12. Requerimiento de ditionito para la reactivación por cianato de la nitrato reductasa previamente inactivada por ditionito y nitrato

Como se observa en la Tabla 8, el enzima debía estar reducido con ditionito para que el cianato produjera la reactivación. Cuando el enzima, previamente inactivado con ditionito y nitrato, se preincubó con CNOK 2 mM después de oxidar el ditionito, sólo se recuperó hasta un 15 % de su actividad. Si el ditionito estaba presente durante la preincubación la recuperación observada fué hasta un 70 %. Esta reactivación dependió del poder reductor, pues los productos de oxidación del ditionito no fueron capaces de inhibir la actividad nitrato reductasa.

### 3.13. Efecto del metil viologeno sobre la nitrato reductasa inactivada por ditionito y nitrato

La tabla 9 muestra que el metil viologeno fué un efectivo protector frente a la inactivación de la nitrato reductasa por ditionito y nitrato a bajas concentraciones. Sin embargo fué incapaz de reactivar apreciablemente el enzima, en presencia o ausencia del ditionito, una vez que la inactivación habia tenido lugar.

### 3.14. Unión reversible del cianato con la nitrato reductasa de Acinetobacter

En la Tabla 10 se muestra el efecto de la filtración

TABLA 8

REQUERIMIENTO DE DITIONITO PARA LA REACTIVACION POR  
 CIANATO DE LA NITRATO REDUCTASA PREVIAMENTE INACTI-  
 VADA CON DITIONITO Y NITRATO



TRATAMIENTO I	TRATAMIENTO II	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	Ninguno	100
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	Ninguno	6
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	$CNO^-$	15
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	$CNO^-$ , $S_2O_4^{2-}$	70

El extracto acelular (8.3 mg) se preincubó en un volumen final de 4 ml con 200  $\mu$ moles de tampón fosfato potásico, pH 7.5 y donde se indica 40 nmoles de  $NO_3^-K$  y 3,2 mg de  $S_2O_4^{2-}$  en 0.4 ml de  $CO_3HNa$  95 mM, durante 10 min a 2°C. A continuación se dividió esta mezcla en tres partes iguales, y tras oxidar el ditionito mediante agitación suave, se añadió, donde se indica:  $CNO^-$  1 mM y  $S_2O_4Na_2$  (0.8 mg/ml) disuelto en  $CO_3HNa$  95 mM. Transcurridos 10 min a 2°C, se determinó la actividad en alícuotas de 0.1 ml completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard, a 2°C como se indica en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 48 nmoles de nitrito formado en 10 min. Cuando fué necesario, la actividad se corrigió sustrayendo el nitrito formado durante la preincubación.

TABLA 9

EFFECTO DEL METIL VIOLOGENO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Acinetobacter calcoaceticus INACTIVADA POR DITIONITO Y  
 NITRATO

TRATAMIENTO I	TRATAMIENTO II	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	Ninguno	100
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	Ninguno	6
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$ , MV	Ninguno	99
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	MV	11
$S_2O_4^{2-}$ , $NO_3^-$	MV, $S_2O_4^{2-}$	8

En la primera serie de experimentos el extracto acelular (3,2 mg) se preincubó a 2°C durante 10 min en un volumen final de 1 ml con 50  $\mu$ moles de tampón fosfato fotásico, pH 7.5 y donde se indica con los siguientes compuestos:  $NO_3^-K$ , 10 nmoles; MV 2  $\mu$ moles y  $S_2O_4Na_2$  0.8 mg en 0.1 ml de  $CO_3HNa$ . La actividad se determinó en alícuotas de 0.2 ml a 2°C durante 10 min como se indica en Materiales y Métodos. En la segunda serie de experimentos, tras una preincubación del enzima con los compuestos que se indican, después de oxidar el  $S_2O_4^{2-}$  se volvió a preincubar en las mismas condiciones, con MV o con MV y  $S_2O_4Na_2$  0.8 mg/ml disuelto en  $CO_3HNa$  95 mM. La actividad se determinó de igual forma en alícuotas de 0.2 ml. El 100% de actividad corresponde a 80 nmoles de nitrito formado en 10 min. Cuando fué necesario la actividad se corrigió sustrayendo el nitrito formado durante la preincubación.

TABLA 10

EFFECTO DE LA FILTRACION POR SEPHADEX G-25 SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus PREVIAMENTE TRATADA CON CIANATO

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD (nmoles/mg de proteina)	
	-CNO <sup>-</sup>	+CNO <sup>-</sup>
I	541	1500
II	1470	1576
III	490	1200

En el Tratamiento I, la nitrato reductasa (0.7 mg) se preincubó a 30°C durante 10 min con tampón fosfato potásico, 100 mM, pH 7.5 en un volumen final de 1 ml. El Tratamiento II, fué como el I excepto que el enzima se preincubó en presencia de CNOK 20 mM. En el Tratamiento III, el enzima preincubado como en II, fué pasado a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7.5. La actividad se determinó en alícuotas de 0.1 ml completadas hasta 1 ml con los reactivos del ensayo standard con MV. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 20 min en ausencia (-CNO<sup>-</sup>) o en presencia (+CNO<sup>-</sup>) de CNOK 2 mM.

por Sephadex G-25 sobre la nitrato reductasa previamente tratada con CNOK 20 mM. Como puede observarse, la filtración por Sephadex del enzima previamente tratado separó CNOK de la misma, ya que al ensayar la actividad nitrato reductasa a 30°C durante 20 min. no se detectó el efecto protector del cianato (Tratamiento III,  $-\text{CNO}^-$ ), al igual que ocurrió cuando el enzima sin tratar se ensayó en ausencia de dicho compuesto (Tratamiento I,  $-\text{CNO}^-$ ). Por el contrario cuando el enzima preincubado con CNOK 20 mM se ensayó en ausencia de cianato añadido, el efecto protector fué patente puesto que la concentración de CNOK en la mezcla de reacción fué suficiente para que el enzima trabajara con plena eficiencia.

### 3.15. Efecto del carbamil fosfato sobre la actividad nitrato reductasa de Acinetobacter

El carbamil fosfato fué también capaz, al igual que el cianato, de proteger y reactivar la nitrato reductasa durante su ensayo a 30°C con metil viologeno reducido químicamente por ditionito, con la diferencia de que la cinética de actividad obtenida fué exponencial con el tiempo (Fig. 27).

## 4. REGULACION DE LA SINTESIS DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

### 4.1. Represión por amonio de la síntesis de la nitrato reductasa de Acinetobacter

Los niveles intracelulares de nitrato reductasa depen-

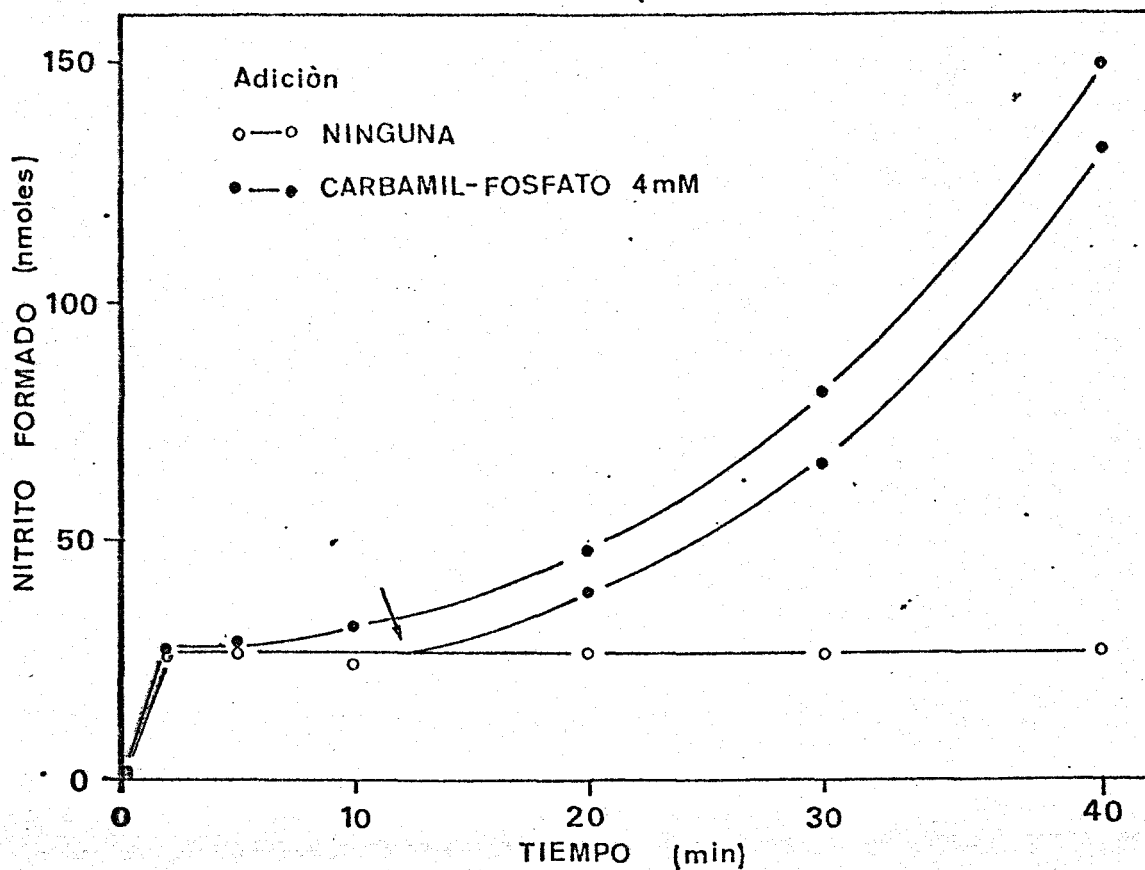


Fig. 27 Efecto del carbamil fosfato sobre la actividad nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la Figura 17 excepto que se usó carbamil fosfato a una concentración 4 mM en vez de CNOK.

dieron de la fuente de nitrógeno utilizada por la bacteria. Así los niveles de enzima eran altos cuando las células se cultivaron en nitrato o nitrito. Sin embargo, eran insignificantes con amonio solo o bien en presencia de nitrato o nitrito (Tabla 11).

#### 4.2. Derrepresión de la nitrato reductasa de Acinetobacter

Para comprobar que la nitrato reductasa no estaba presente en las células crecidas en amonio se llevó a cabo el experimento que se muestra en la Tabla 12. Cuando las células crecidas en amonio se transfirieron a un medio sin nitrogeno, la nitrato reductasa fué sintetizada de novo, pués en presencia de kanamicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas (137), no se observó síntesis de enzima.

### 5. LA FERREDOXINA COMO DONADOR DE ELECTRONES DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

#### 5.1. La ferredoxina de Azotobacter como donador de electrones de la nitrato reductasa de Acinetobacter

##### 5.1.1. *Reducción de nitrato por ferredoxina reducida con un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados*

Ha sido posible acoplar el poder reductor generado por cloroplastos aislados de espinacas e iluminados, con la reducción de nitrato utilizando como donador de electrones la ferredoxina de Azotobacter chroococcum. Como se observa en la Tabla 13, los

TABLA 11

EFFECTO DE DISTINTAS FUENTES NITROGENADAS SOBRE LOS NIVELES CELULARES DE NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter calcoaceticus

FUENTE DE NITROGENO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mU/mg de proteina)
$\text{NO}_3\text{K}$ 10 mM	347
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 5 mM	7
$\text{NO}_3\text{NH}_4$ 5 mM	9
$\text{NO}_2\text{Na}$ 5 mM	171
$\text{NO}_2\text{Na}$ 5 mM, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 2.5 mM	6

Las celulas se cultivaron durante 13 horas en medios con las fuentes de nitrogeno que se indican, se prepararon los correspondientes extractos celulares y se determinó en ellos la actividad, como se describe en Materiales y Métodos.



TABLA 12

DESREPRESION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Acinetobacter cal-  
coaceticus

FUENTE DE NITROGENO		ACTIVIDAD ESPECIFICA (mU/mg de proteina)
I	II	
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 5 mM	-	7
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 5 mM	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 5 mM	9
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 5 mM	Ninguna	85
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 5 mM	Ninguna, <u>mas</u> Kanamicina	6

Las células se cultivaron durante 13 horas en medio con amonio (I). A continuación se recogieron las células y después de lavar con agua destilada, se transfirieron a medios con la fuente de nitrógeno que se indica en II. Después de 4 horas de tratamiento se prepararon los extractos acelulares en los que se determinó la actividad como se indica en Materiales y Métodos. donde se indica, se añadió Kanamicina (50µg/ml)

TABLA 13

REDUCCION DE NITRATO CON FERREDOXINA DE Azotobacter  
 REDUCIDA POR CLOROPLASTOS DE ESPINACAS ILUMINADOS

SISTEMA	NITRITO FORMADO (nmoles)
Completo	21
menos ferredoxina	0
menos nitrato reductasa	0
Completo, en la obscuridad	0

El sistema de reacción completo contenía en un volumen final de 3 ml: fragmentos de cloroplasto de espinacas calentados (0.3 mg de clorofila); extracto acelular de Acinetobacter 0.5 mg; ferredoxina de Azotobacter chroococcum, 5 mg, y lo siguiente en  $\mu$ moles: tampón Tris-ClH, pH 7.5, 150; ascorbato, 10; DPIP, 0.2;  $Cl_2Mg$ , 5;  $NO_3K$ , 6. La reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg, a 24°C durante 30 min bajo atmosfera de argon. La iluminación con luz blanca fué de 18.000 Lux.

cloroplastos iluminados fueron eficaces donadores de electrones para la nitrato reductasa en presencia de la ferredoxina. En ausencia de la misma o en la obscuridad, la reacción no tuvo lugar, así como en ausencia de la nitrato reductasa.

#### 5.1.2. *Reducción de nitrato por ferredoxina reducida con un sistema auxiliar ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa y NADPH*

Utilizando el método descrito por LAZZARINI et al. (1962) (57) para la reducción de la ferredoxina de Azotobacter con NADPH y ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa de espinacas se consiguió la reducción de nitrato mediante ferredoxina y nitrato reductasa (Tabla 14). La reducción de nitrato fue estrictamente dependiente de ferredoxina y ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa, además de la nitrato reductasa.

#### 5.2. Aislamiento y purificación de la ferredoxina de Acinetobacter

Los resultados anteriores sugerían que la ferredoxina estaba implicada en la reducción del nitrato a nitrito a nivel fisiológico, por lo cual se procedió a aislar y purificar de Acinetobacter este transportador de electrones. Los resultados que se presentan a continuación demuestran que en Acinetobacter existe una ferredoxina que ha podido ser aislada y fácilmente purificada hasta homogeneidad.

TABLA 14

REDUCCION DE NITRATO MEDIANTE EL SISTEMA NADPH-FERREDOXIN-  
 NADP<sup>+</sup>-OXIDOREDUCTASA DE ESPINACA Y FERREDOXINA DE Azotobacter

SISTEMA	NITRITO FORMADO (nmoles)
Completo	11
menos ferredoxina	0
menos NADP <sup>+</sup> -Rasa	0
menos nitrato reductasa	0

El sistema de reacción completo contenía en un volumen final de 2 ml: extracto acelular de Acinetobacter, 0.8 mg; ferredoxina de Azotobacter, 1.7 mg; ferredoxin-NADP<sup>+</sup> -oxidorreductasa de espinaca, 2.4 mg; sistema regenerante de NADPH consistente en glucosa-6-fosfato, 15  $\mu$ moles; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 8.3 U.;  $Cl_2Mg$ , 2  $\mu$ moles. Y los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tampón Tris-ClH, pH 7.5, 200;  $NO_3K$ , 4; NADPH, 0.6. La reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg a 24°C durante 45 min, bajo atmosfera de argon.

### 5.2.1. Preparación de extractos acelulares y adsorción de la ferredoxina sobre DEAE-celulosa

Se partió de unos 250 g de pasta de células que se lavaron un par de veces con agua destilada y posteriormente se re-suspendieron en 500 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,4, a los que se añadieron 200 ml de n-butanol siguiendo esencialmente el método descrito por YOCH et al. (1969) (150) en Azotobacter vinelandii, excepto que se usó tampón fosfato potásico, pH 7,4. La mezcla se mantuvo a 4°C por espacio de 3 horas con agitación continua. A continuación se centrifugó la mezcla a 6.000 x g durante 2 horas. Se obtuvieron tras la centrifugación, tres zonas bien definidas: un precipitado que contenía células intactas y fragmentos celulares; una zona intermedia de color amarillo y un sobrenadante rico en compuestos lipídicos.

A la solución amarilla intermedia (400 ml) se le añadieron unos 40 ml de suspensión de DEAE-celulosa en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,4 y la mezcla resultante se agitó a 4°C durante 15 h. Después se filtró en un Buchner y se lavó en unos 3 l del mismo tampón fosfato hasta eliminar completamente el butanol. A continuación se empaquetó la DEAE-celulosa, que llevaba adsorbida la ferredoxina, en una columna (8 cm altura x 3 cm  $\phi$ ) y tras lavar con tampón fosfato, se cromatografió la ferredoxina eluyendo con tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, 0,6 M en ClNa. Se recogieron unos 50 ml.

### 5.2.2. *Cromatografía en DEAE-celulosa por gradiente lineal de cloruro*

La solución que contenía la ferredoxina se purificó seguidamente mediante una combinación de pasos de purificación descritos para otras ferredoxinas (65). Así, el eluato se diluyó unas 10 veces y se adsorbió sobre una columna de DEAE-celulosa (22,5 cm altura x 2,2 cm  $\phi$ ) calibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,4. Se formó una banda oscura en la parte superior del lecho de la columna que se eluyó con un gradiente lineal de ClNa desde 0,065 M hasta 0,65 M y el mismo tampón (300 ml) recogiendo un eluato color tabaco claro (28,4 ml) que salió alrededor de 0,4-0,5 M de  $\text{Cl}^-$ .

### 5.2.3. *Concentración de la preparación y filtración por Sephadex G-25*

El eluato anterior se diluyó de nuevo unas 10 veces con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,4 y se adsorbió en una columna de DEAE-celulosa (2,5 cm altura x 1,8 cm  $\phi$ ) calibrada con el mismo tampón. Después de lavar la columna con tampón fosfato, se eluyó la ferredoxina en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, 0,6 M en ClNa.

El anterior eluato (2,4 ml) se filtró a continuación

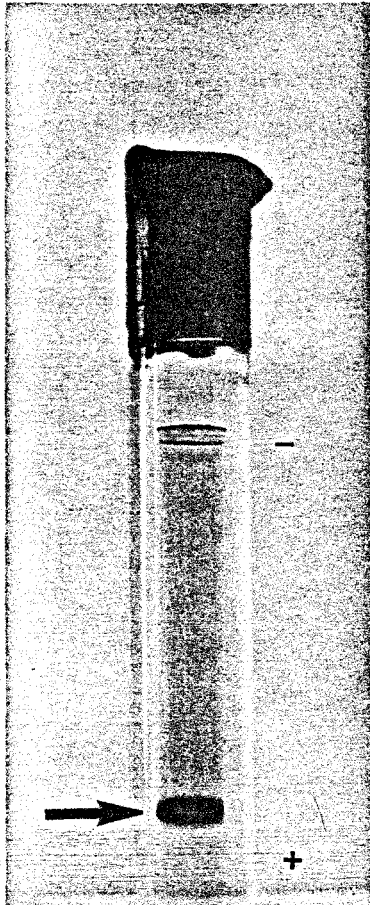
a través de una columna de Sephadex G-25 (7,5 cm altura x 2,2 cm  $\phi$ ) previamente equilibrada con tampon fosfato potásico 50 mM pH 7,4, obteniéndose finalmente unos 3,6 ml de solución de ferredoxina (2,7 mg) que se utilizaron preferentemente en los experimentos de caracterización que se describen a continuación.

### 5.3. Homogeneidad electroforética en gel de poliacrilamida de la ferredoxina de Acinetobacter

La preparación purificada de ferredoxina presentó una única banda proteica en gel de poliacrilamida al 7,5%. La banda de proteína fue fácilmente localizable en el curso del experimento, debido a su color oscuro intenso (Fotografía 1).

### 5.4. Espectro de absorción de la ferredoxina de Acinetobacter

En la Fig. 28 se muestra el espectro de absorción de la ferredoxina de Acinetobacter. Presenta, además del pico a 280 nm un hombro pronunciado a 340 nm, una inflexión a 390 nm y un hombro más suave a 420 nm, descendiendo la absorción paulatinamente desde esta longitud de onda hasta los 700 nm.



Fotografía 1: *Electroforesis de disco en gel de poliacrilamida de la ferredoxina purificada de Acinetobacter calcoaceticus. Las condiciones experimentales están detalladas en Materiales y Métodos. La muestra emigró hacia el ánodo, indicado abajo con un signo (+).*



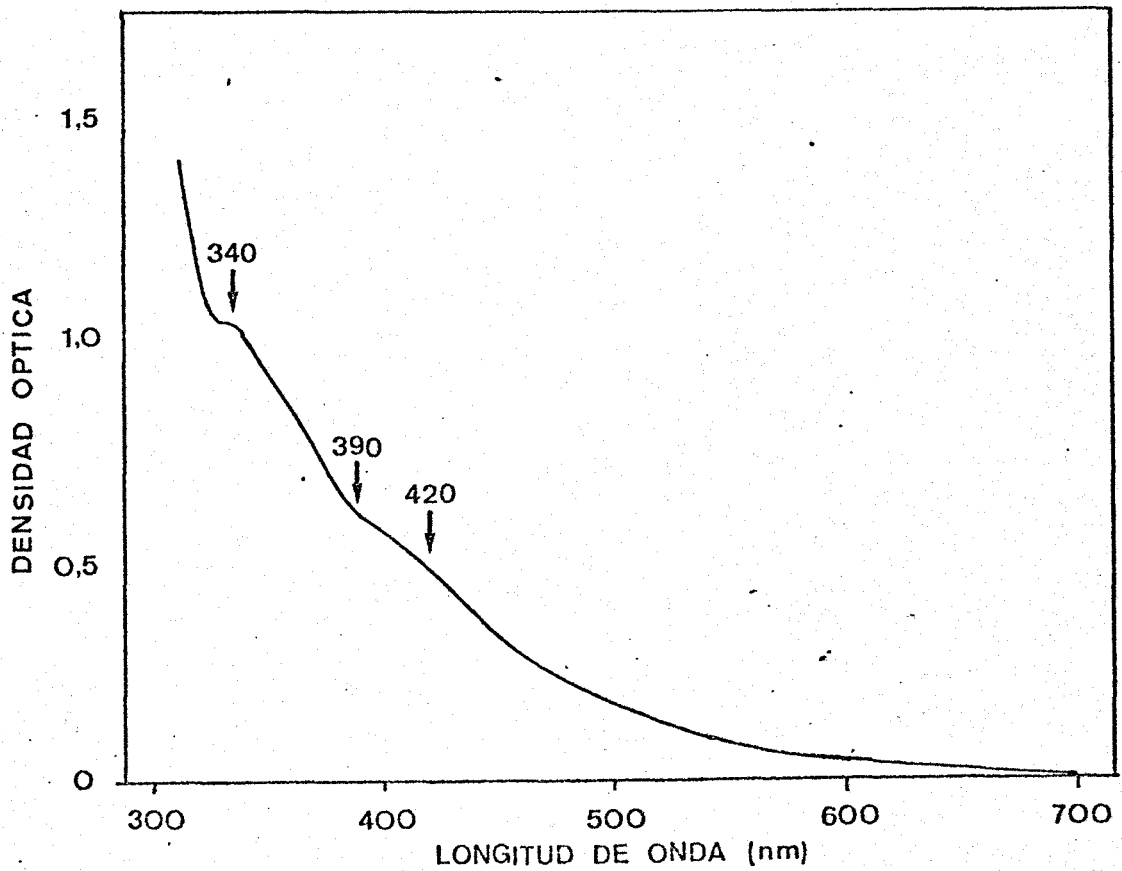


Fig. 28 Espectro de absorción de la ferredoxina de *Acinetobacter calcoaceticus*. Se llevó a cabo en cubetas de 1 cm de paso de luz, utilizando como blanco tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.4, 0.6 M en ClNa. Ferredoxina, 0,75 mg/ml.

### 5.5. Fotorreducción de $\text{NADP}^+$ mediante cloroplastos iluminados de espinaca y ferredoxina de *Acinetobacter*

La ferredoxina de *Acinetobacter* se pudo acoplar a la reducción de  $\text{NADP}^+$  por cloroplastos de espinaca iluminados (Tabla 15). El que en ausencia de ferredoxina bacteriana, se formase aún algo de NADPH, podía explicarse por la ferredoxina endógena de los propios cloroplastos.

### 5.6. Oxidación de NADPH mediante ferredoxina- $\text{NADP}^+$ -oxidorreductasa de espinaca utilizando como aceptor de electrones la ferredoxina de *Acinetobacter*

Basándonos en la propiedad de que la ferredoxina reducida reduce al citocromo c no enzimáticamente (57), se ha estudiado la oxidación del NADPH usando la ferredoxina de *Acinetobacter* como aceptor de electrones y midiéndolo la reducción del citocromo c a 550 nm. La oxidación del NADPH fue dependiente de ferredoxina como puede observarse en la Tabla 16.

### 5.7. Reducción enzimática de nitrato mediante la nitrato reductasa y ferredoxina de *Acinetobacter* reducida mediante un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados

De igual forma que se ensayó la ferredoxina de Azoto-

TABLA 15

FOTORREDUCCION DE  $\text{NADP}^+$  MEDIANTE CLOROPLASTOS ILUMINADOS  
DE ESPINACA Y FERREDOXINA DE Acinetobacter

---

SISTEMA	NADPH FORMADO (nmoles)
Completo	2430
menos ferredoxina	570

---

La mezcla de reacción completa contenía en un volumen final de 3 ml: fragmentos de cloroplasto de espinacas calentados (0.2 mg de clorofila); 0.15 mg de ferredoxina de Acinetobacter y los siguientes compuestos en  $\mu\text{moles}$ : tampón Tris-ClH, pH 7.5, 150; Ascorbato sódico, 10; DPIP, 0.2;  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 5;  $\text{NADP}^+$ , 6.2. La reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg, en atmósfera de argón a  $24^\circ\text{C}$  durante 1 hora. La iluminación fue de 18.000 lux. La concentración de NADPH se determinó midiendo su absorción a 340 nm en una alícuota de la mezcla de reacción después de eliminar los restos de cloroplastos.

TABLA 16

OXIDACION DE NADPH MEDIANTE FERREDOXINA DE Acinetobacter  
 Y FERREDOXINA-NADP<sup>+</sup>-OXIDORREDUCTASA DE ESPINACA

SISTEMA	NADPH OXIDADO (nmoles/min)
Completo	28
menos ferredoxina	1
menos ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -oxidorreductasa	0

La mezcla de reacción completa contenía en un volumen final de 2 ml: ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidorreductasa de espinaca, 0.7 mg; citocromo c, 3 mg; ferredoxina de Acinetobacter, 75 µg, y los siguiente compuestos en µmoles: tampón Tris-ClH, pH 7.5, 200; NADPH, 0.6. La reducción del citocromo c se siguió espectrofotométricamente a 550 nm.

bacter como transportadora de electrones desde los cloroplastos hasta el nitrato mediante la nitrato reductasa de Acinetobacter, la ferredoxina de Acinetobacter fue capaz de llevar a cabo la reducción de nitrato a nitrito, en presencia de la nitrato reductasa (Tabla 17).

## 6. PAPEL DE LAS NAD(P)H OXIDORREDUCTASAS DEPENDIENTES DE VIOLÓGENOS EN LA REDUCCION DEL NITRATO EN Acinetobacter calcoaceticus

### 6.1. Reducción enzimática de nitrato mediante los piridín nucleótidos reducidos y los viológenos

En anaerobiosis fue posible reducir nitrato a nitrito mediante NAD(P)H utilizando tanto el metil como el benzil viológeno como transportadores de electrones. Como se observa en la Tabla 18, el BV fue mas eficiente que el MV en este proceso.

### 6.2. Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y benzil viológeno

La reducción enzimática de nitrato fue lineal con el tiempo durante 30 minutos, cuando se usó NADH como donador de electrones y el benzil viológeno como transportador (Fig. 29), a diferencia de lo que ocurría cuando la actividad enzimática se ensayaba con viológeno reducido químicamente por ditionito (crf. 1.4).

TABLA 17

REDUCCION DE NITRATO CON FERREDOXINA REDUCIDA POR CLORO-  
 PLASTOS ILUMINADOS DE ESPINACA Y NITRATO REDUCTASA DE  
Acinetobacter calcoaceticus

SISTEMA	NITRITO FORMADO (nmoles)
Completo	7
menos ferredoxina	0
menos nitrato reductasa	0
Completo, en obscuridad	0

El sistema de reacción completo contenía en un volumen fi-  
 nal de 3 ml: fragmentos de cloroplastos de espinaca calen-  
 tados (0.2 mg de clorofila); extracto acelular de Acineto-  
bacter, 0.6 mg; ferredoxina de Acinetobacter, 0.15 mg; y  
 los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tampón Tris-ClH, pH  
 7.5, 150; ascorbato, 10; DPIP, 0.2;  $Cl_2Mg$ , 5;  $NO_3K$ , 6. La  
 reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg a 24°C du-  
 rante 1 hora, bajo atmosfera de argon. La iluminación fué  
 de 18.000 lux.

TABLA 18

EFFECTO DE LOS VIOLOGENOS EN LA REDUCCION DE NITRATO POR  
 NAD(P)H CON EXTRACTOS ACELULARES DE  
Acinetobacter calcoaceticus

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES	NITRITO FORMADO (nmoles)
NADH	2
NADH, MV	22
NADH, BV	110
NADPH	2
NADPH, MV	72
NADPH, BV	126

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml, en  $\mu$ moles: tampón fosfato potásico, pH 7.5, 200;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 4; NAD(P)H, 0.6; extracto acelular, 0.4 mg, y donde se indica: MV, 32  $\mu$ moles; BV, 16  $\mu$ moles. La reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg bajo atmosfera de argon a 24°C durante 10 min.

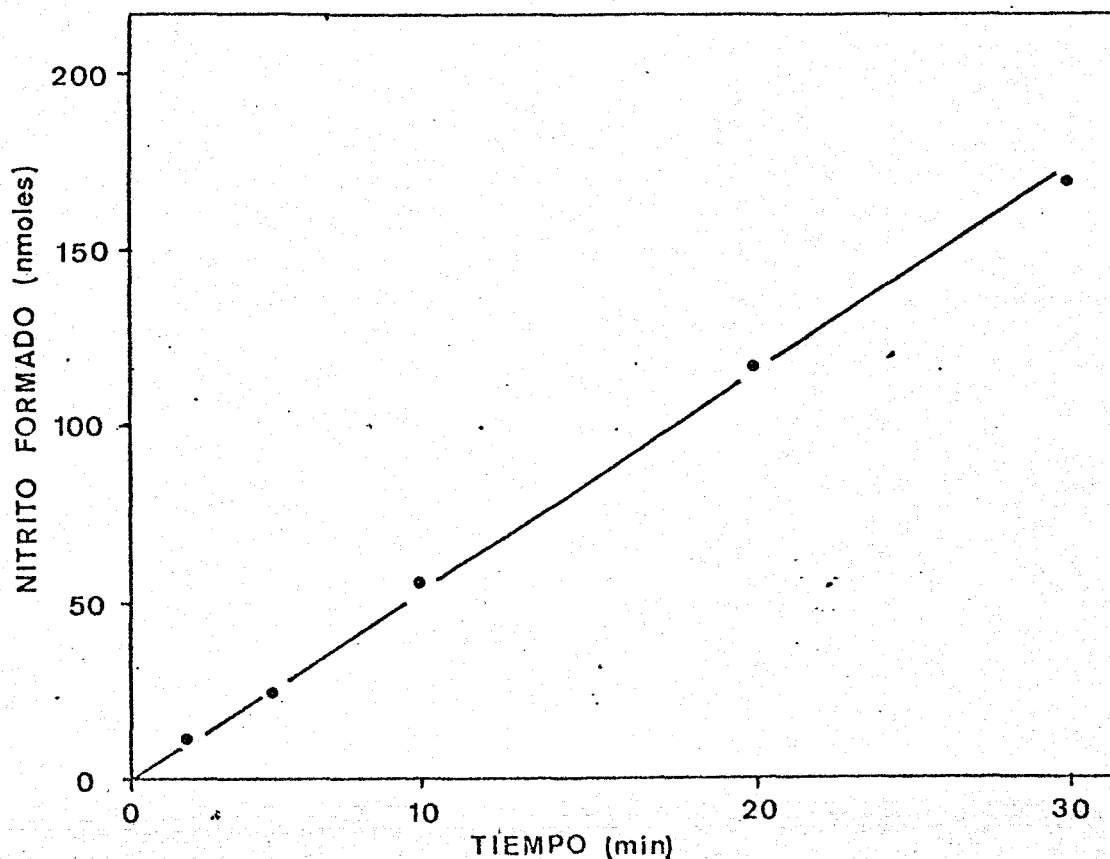


Fig. 29 *Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y benzil viologeno.* La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml, los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tam<sub>p</sub>ón fosfato potásico, pH 7.5, 200;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 4; BV, 16; NADH, 0.6 y extracto acelular 1.6 mg. La reacción se llevó a cabo a  $24^\circ\text{C}$  en vasijas de Warburg bajo atmosfera de argon y a los tiempos indicados se determinó el nitrito formado en cada una de las vasijas, como se describe en Materiales y Métodos.



### 6.3. Reducción enzimática de nitrato mediante los piridín nucleótidos reducidos y las flavinas

A altas concentraciones, los flavin nucleótidos reducidos enzimáticamente por NAD(P)H, fueron capaces de actuar como donadores inmediatos de electrones de la nitrato reductasa, aunque su eficiencia fue sensiblemente menor que la mostrada por los viólogos (Tabla 19).

### 6.4. Efecto de la concentración de FAD sobre la reducción enzimática del nitrato por NADH

En la Fig. 30 se observa como al incrementar la concentración del FAD aumenta paralelamente la reducción enzimática del nitrato por NADH. A concentraciones del orden de 20  $\mu\text{M}$  la actividad detectada fue inapreciable como se ha indicado previamente (1.1).

### 6.5. Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y FAD

La reducción enzimática de nitrato con NADH y FAD fue lineal durante 30 minutos (Fig. 31) al igual que ocurría cuando esta reducción se llevaba a cabo por NADH y BV (6.2).

TABLA 19

EFFECTO DE LOS FLAVIN NUCLEOTIDOS EN LA REDUCCION DE NITRAT  
 TO POR NAD(P)H CON EXTRACTOS ACELULARES DE  
Acinetobacter calcoaceticus

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES	NITRITO FORMADO (nmoles)
NADH	1
NADH, FAD	71
NADH, FMN	29
NADPH	2
NADPH, FAD	40
NADPH, FMN	26

Las condiciones experimentales fueron las mismas de la Tabla 18, excepto que los flavin nucleótidos (1.5 mM) se usaron en lugar de los viológenos. Extracto acelular fué 4,4 mg.

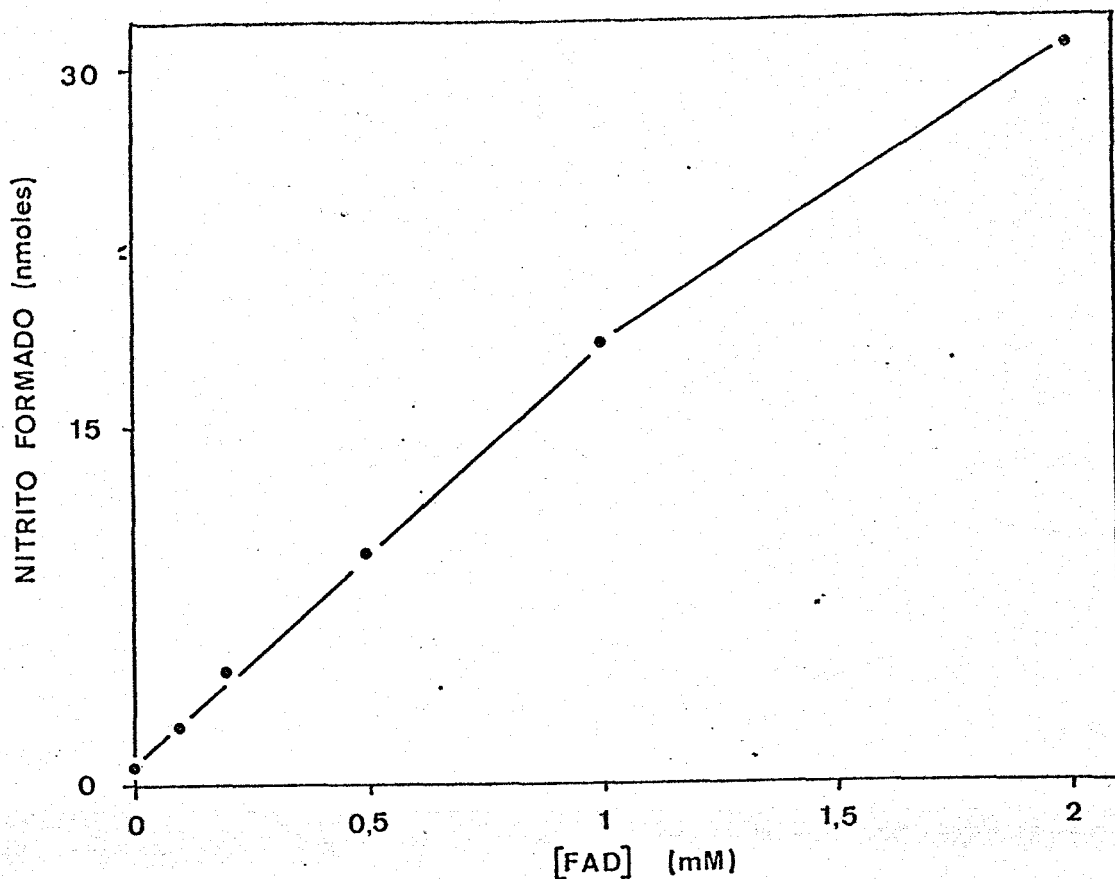


Fig. 30 Efecto de distintas concentraciones de FAD sobre la reducción enzimática de nitrato con NADH. La mezcla de reacción contenía en un volumen de reacción de 2 ml los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tampón Tris-ClH, pH 7.5, 200;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 4; NADH, 0.6; extracto acelular, 3 mg y las concentraciones de FAD que se indican. La reacción se llevó a cabo en vasijas de Warburg bajo atmósfera de argón a  $24^\circ\text{C}$  durante 10 min.

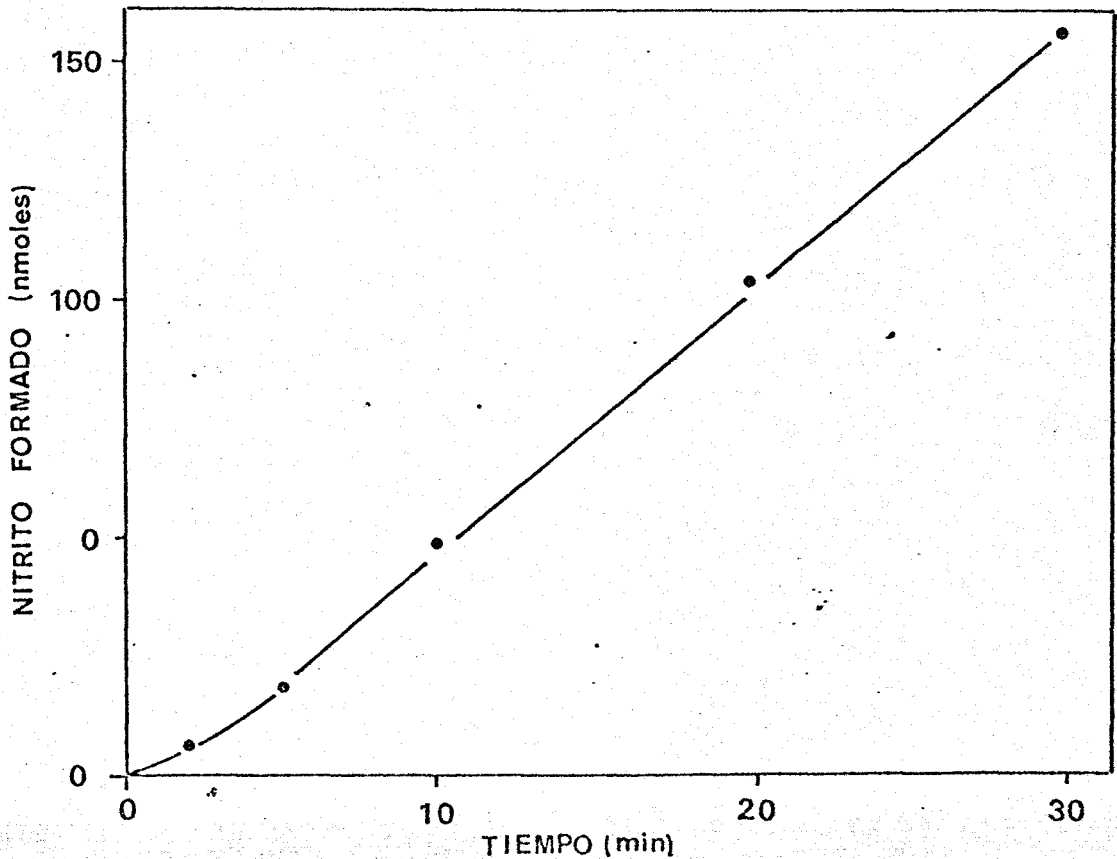


Fig. 31 *Cinética de la reducción enzimática de nitrato mediante NADH y FAD.* Las condiciones experimentales fueron las mismas que las indicadas en la leyenda de la Figura 29, excepto que se utilizó tampón Tris-ClH, pH 7.5 en vez de tampón fosfato y se sustituyó el BV por FAD a la concentración de 1,5 mM. Extracto acelu- lar, 0,5 mg.

#### 6.6. Actividad NAD(P)H-diaforasa en extractos acelulares de Acinetobacter

A la vista de los resultados anteriormente expuestos, se caracterizó, en primera aproximación, la actividad NAD(P)H-diaforasa utilizando distintos aceptores de electrones. Tanto el ferricianuro como el DPIP y la menadiona fueron efectivos aceptores de electrones mientras que el citocromo c parecía prácticamente ineficaz (Tabla 20). Los viológenos fueron también eficaces aceptores, mostrando el BV una eficiencia superior (Tabla 21). Las flavinas también fueron aceptores de la reacción como se muestra posteriormente (6.10.1; 6.11.1).

#### 6.7. Separación de las actividades NAD(P)H-diaforasa y nitrato reductasa de Acinetobacter

Las actividades NAD(P)H-diaforasas y nitrato reductasa se separaron fácilmente por filtración en una columna de Sephadex G-150. En la Fig. 32 se observaron una NADPH-diaforasa pesada que se eluye en primer lugar, a continuación la nitrato reductasa y en último lugar una doble actividad NAD(P)H-diaforasa de peso molecular más bajo. En la Figura 33 se muestra la separación neta de la actividad nitrato reductasa y NADH-diaforasa en gradiente de sacarosa, que en la columna de Sephadex apare

TABLA 20

ACEPTORES DE ELECTRONES PARA LAS NAD(P)H-OXIDORREDUCTASAS  
PRESENTES EN EXTRACTOS ACELULARES DE Acinetobacter calco-  
aceticus

DONADORES Y ACEPTORES DE ELECTRONES	CONCENTRACION (mM)	NAD(P)H OXIDADO (nmoles/ min)
NADH, $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$	0.3	339
NADH, Menadiona	0.1	320
NADH, DPIP	0.2	73
NADH, citocromo <u>c</u>	0.12	2
NADHP, $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$	0.3	385
NADPH, Menadiona	0.1	69
NADPH, DPIP	0.2	83
NADPH, citocromo <u>c</u>	0.12	1

Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. Extracto acelular 1 mg. La Menadiona se disolvió en etanol al 10%.

TABLA 21

LOS VIOLOGENOS COMO ACEPTORES DE ELECTRONES PARA LAS NAD(P)H-  
OXIDORREDUCTASAS PRESENTES EN EXTRACTOS ACELULARES DE  
Acinetobacter calcoaceticus

DONADORES Y ACEPTORES DE ELECTRONES	VIOLOGENOS REDUCIDOS (nmoles/min)
NADH, BV	230
NADPH, BV	172
NADH, MV	26
NADPH, MV	44

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml los siguientes compuestos en  $\mu$ moles: tampón fosfato potásico, pH 7.5, 200; BV o MV, 16; NAD(P)H, 1.2; extracto acelular, 0.4 mg. La reacción se siguió espectrofotométricamente en tubos Thumberg por aparición de viologenos reducidos según se indica en Materiales y Métodos.

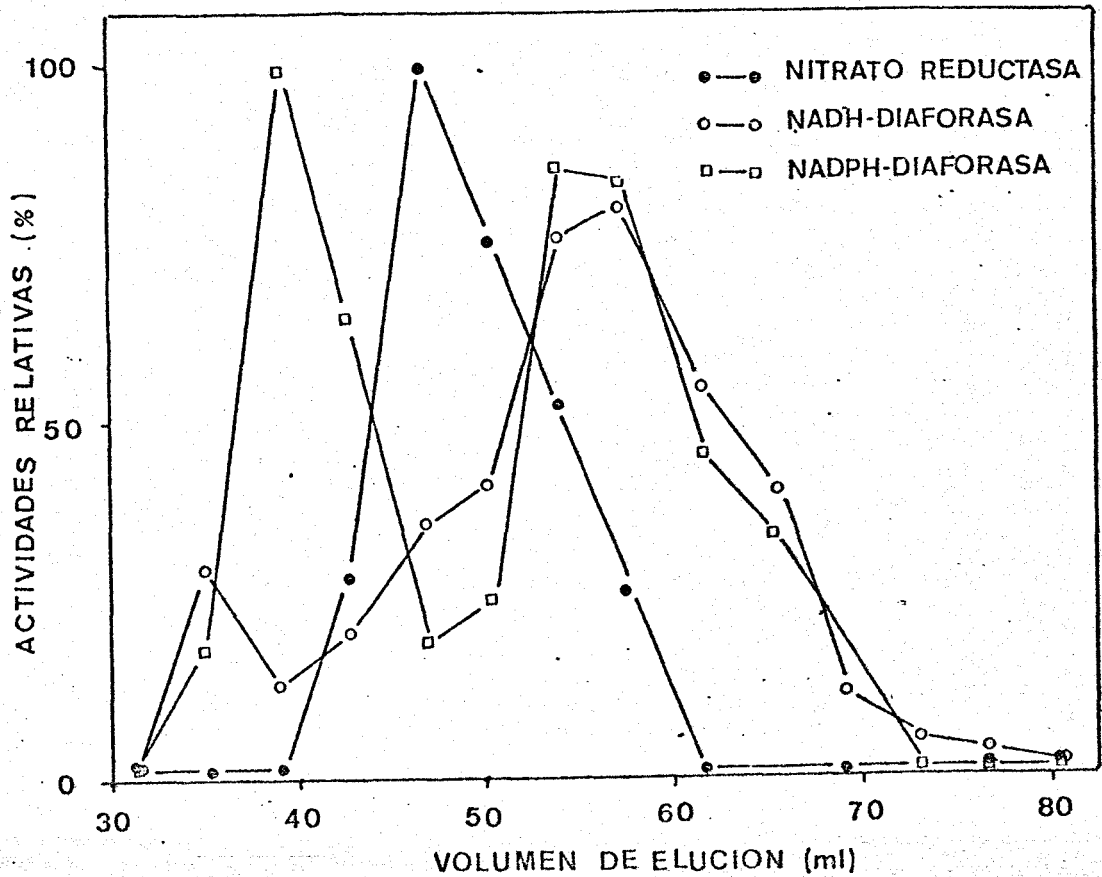


Fig. 32 Separación de actividades NAD(P)H-diaforasas y nitrato reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* por filtración en Sephadex G-150. El extracto acelular se filtró en una columna de Sephadex G-150 (65,5 cm altura x 1,5 cm  $\phi$ ) equilibrada con Tris-ClH, 50 mM pH 7.5; ClK 0,1 M y CNOK 2 mM. La elución se llevó a cabo con el mismo tampón, recogiéndose fracciones de 3,5 ml en las que se determinaron las actividades como se indica en Materiales y Métodos. Las actividades NAD(P)H se ensayaron usando DPIP como aceptor y la nitrato reductasa con MV y ditionito en presencia de CNOK 2 mM.



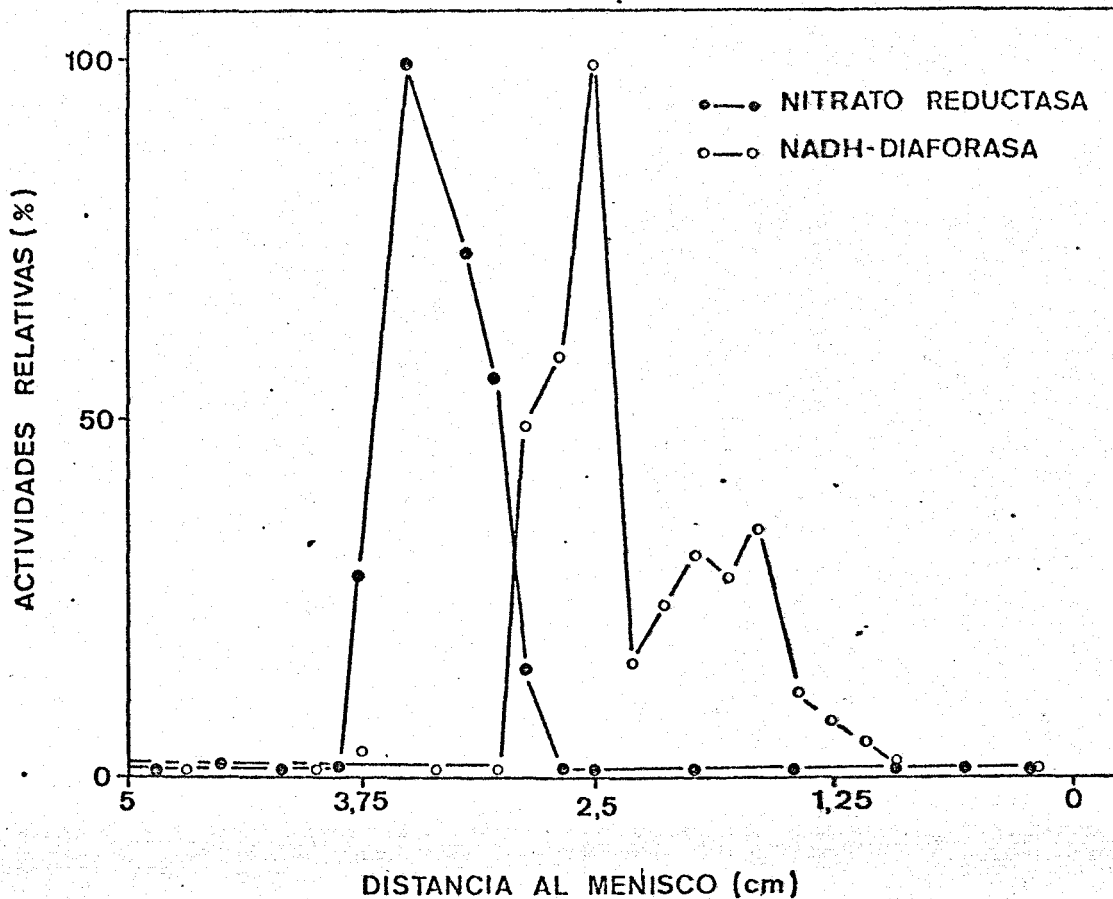


Fig. 33 Separación de las actividades nitrato reductasa y NADH-diaforasa de *Acinetobacter calcoaceticus* mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. 0.2 ml de extracto acelular (0.4 mg de proteína) se centrifugaron a 45.000 r.p.m. en un gradiente lineal de sacarosa (5-20%), durante 13 horas a 2°C, en un tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.5, conteniendo CNOK 2 mM. La actividad nitrato reductasa se determinó en presencia de CNOK 2 mM en alícuotas de 0.1 ml de cada una de las fracciones recogidas, en las condiciones que se indican en Materiales y Métodos. La NADH-diaforasa se determinó utilizando DPIIP como aceptor de electrones.

cia solapadas en cierta extensión.

#### 6.8. Determinación del peso molecular de las NAD(P)H-diaforasas de Acinetobacter

El peso molecular de las NAD(P)H-oxidorreductasas se estimó por filtración en Sephadex G-150 con las correspondientes proteínas standard. La NADPH-diaforasa pesada tenía un peso molecular de 165.000 y la actividad conjunta NAD(P)H-diaforasa ligera, un peso molecular aproximado de 57.000 (Fig. 34). Como se verá más adelante (6.9) la actividad NAD(P)H ligera está constituida por dos proteínas diferentes que se pueden separar por precipitación diferencial con sulfato amónico.

#### 6.9. Aislamiento y purificación parcial de las NAD(P)H-diaforasas de Acinetobacter

Para purificar las NAD(P)H-oxidorreductasas presentes en los extractos acelulares de Acinetobacter se siguió el siguiente esquema de trabajo:

- 1) El extracto acelular obtenido en presencia de 10  $\mu$ M de FAD se saturó con sulfato amónico al 25% y después de centrifugar a alta velocidad en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos se desechó el precipitado.

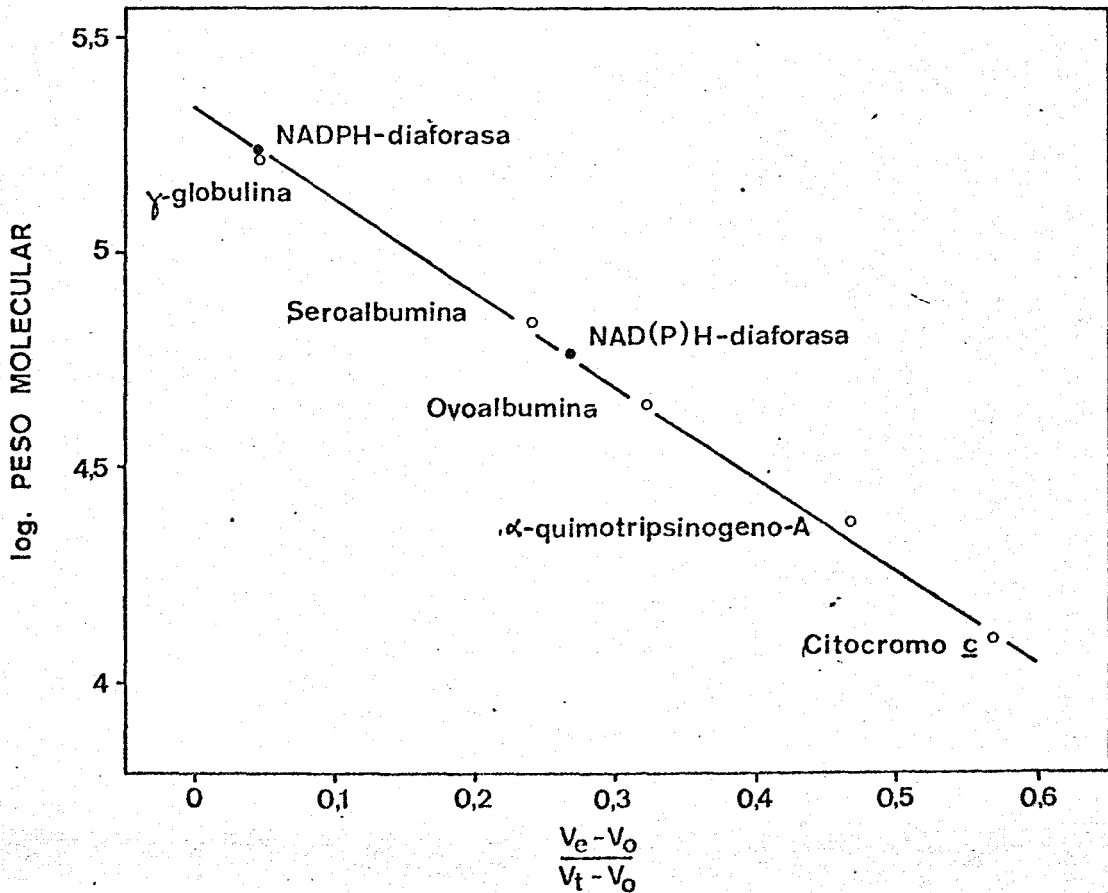


Fig. 34 Estimación del peso molecular de las NAD(P)H-oxidoreduc-tasas de *Acinetocacter calcoaceticus* por filtración en Sephadex G-150. Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en Materiales y Métodos.  $V_e$ = volumen de elución de cada proteína o enzima.  $V_t$ = volumen total de la columna.  $V_o$ = volumen vacio.

2) Al sobrenadante del paso anterior se añadió sulfato amónico hasta 50% de saturación. Después de centrifugar se obtuvo un precipitado que se redisolvió en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. En el sobrenadante de este paso de purificación se encontró la mayor parte de la actividad NAD(P)H-diaforasa ligera.

3) 3 ml de precipitado disuelto se filtró a través de una columna de Sephadex G-150 (33 cm altura x 3 cm  $\phi$ ) calibrada con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5, 10  $\mu$ M en FAD, eluyéndose las proteínas presentes con el mismo tampón.

En la Fig. 35 se muestra la distribución de las dos diaforasas que se obtuvieron en la filtración por gel, la NADPH-diaforasa pesada y la NADH-diaforasa ligera. Estos dos enzimas se separaron fácilmente y mediante este paso se consiguió una purificación de 4 veces respecto al paso anterior.

Se obtuvieron pues, tres actividades diaforasa, una NADPH-diaforasa pesada, una NADH-diaforasa ligera y una NADPH-ligera no exenta de actividad dependiente de NADH. A continuación se expone la caracterización de las dos primeras diaforasas que se obtuvieron en mayor proporción y con un elevado grado de pureza.

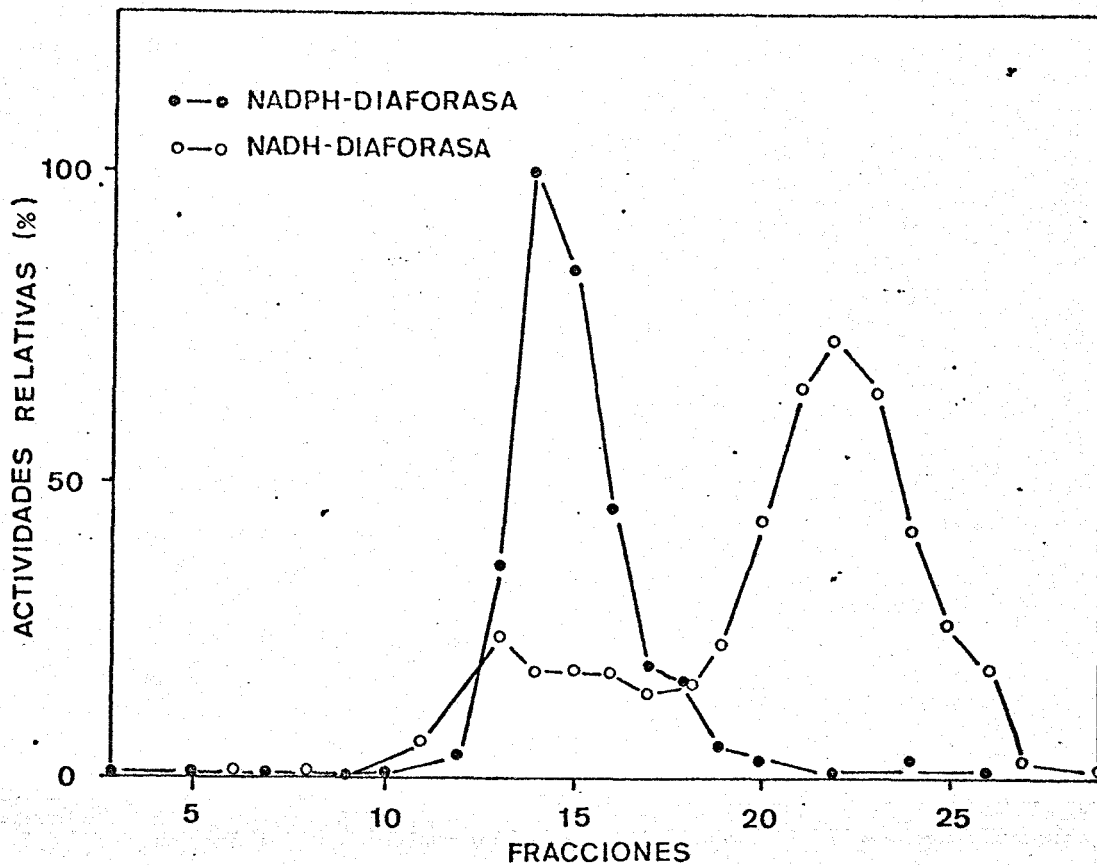


Fig. 35 Separación de NAD(P)H-oxidoreductasa de Acinetobacter calcoaceticus por filtración en gel. Los detalles experimentales se especifican en el texto. Se recogieron fracciones de 5 ml en las que se ensayó la actividad usando DPIP como aceptor de electrones, como se describe en Materiales y Métodos.

## 6.10. Caracterización parcial de la NADPH-diaforasa pesada de Acinetobacter

### 6.10.1. *Aceptores de electrones de la NADPH-diaforasa pesada*

La NADPH-oxidoreductasa pesada usó como eficaces aceptores de electrones ferricianuro y DPIP. En menor grado, la menadiona, los viológenos y las flavinas, fueron efectivos aceptores, mientras que el citocromo c fué prácticamente incapaz de actuar como sustrato de la reacción (Tabla 22).

### 6.10.2. *Reducción enzimática del DPIP mediante la NADPH-diaforasa pesada*

La actividad diaforasa dependiente de NADPH es enzimática, como se muestra en la Tabla 23, donde el enzima se caracterizó usando el DPIP como aceptor. En ausencia de enzima, donador o aceptor o con el enzima hervido, la transferencia de electrones no tuvo lugar.

### 6.10.3. *Determinación de la $K_m$ para el NADPH de la NADPH-diaforasa pesada*

Mediante la representación de los inversos de Lineweaver-Burkse calculo una  $K_m$  aparente de la NADPH-oxidoreductasa pesada para NADPH de 34  $\mu\text{M}$  (Fig. 36).

TABLA 22

ACEPTORES DE ELECTRONES DE LA NADPH-OXIDORREDUCTASA PESADA  
DE Acinetobacter calcoaceticus

ACEPTORES DE ELECTRONES	CONCENTRACION (mM)	NADPH OXIDADO (nmoles/10 min)
Ninguno	-	0
Fe(CN) <sub>6</sub> K <sub>3</sub>	0.3	480
DPIP	0.1	230
Menadiona	0.1	51
BV	8	70
MV	8	34
FAD	0.1	6
FMN	0.1	6
Citocromo <u>c</u>	0.12	trazas

Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Los distintos aceptores de electrones se ensayaron a las concentraciones que se indican. Enzima, 25 µg. Los ensayos se hicieron con una preparación enzimática filtrada por G-25 para eliminar el FAD.

TABLA 23

REDUCCION ENZIMATICA DEL DPIP MEDIANTE LA NADPH-OXIDORREDUC  
TASA PESADA DE Acinetobacter calcoaceticus

SISTEMA	NADPH OXIDADO (nmoles/10 min)
Completo	230
menos enzima	17
menos DPIP	0
menos NADPH	0
Completo, enzima calentado (100°C, 5 min)	26

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describen en Materiales y Métodos.



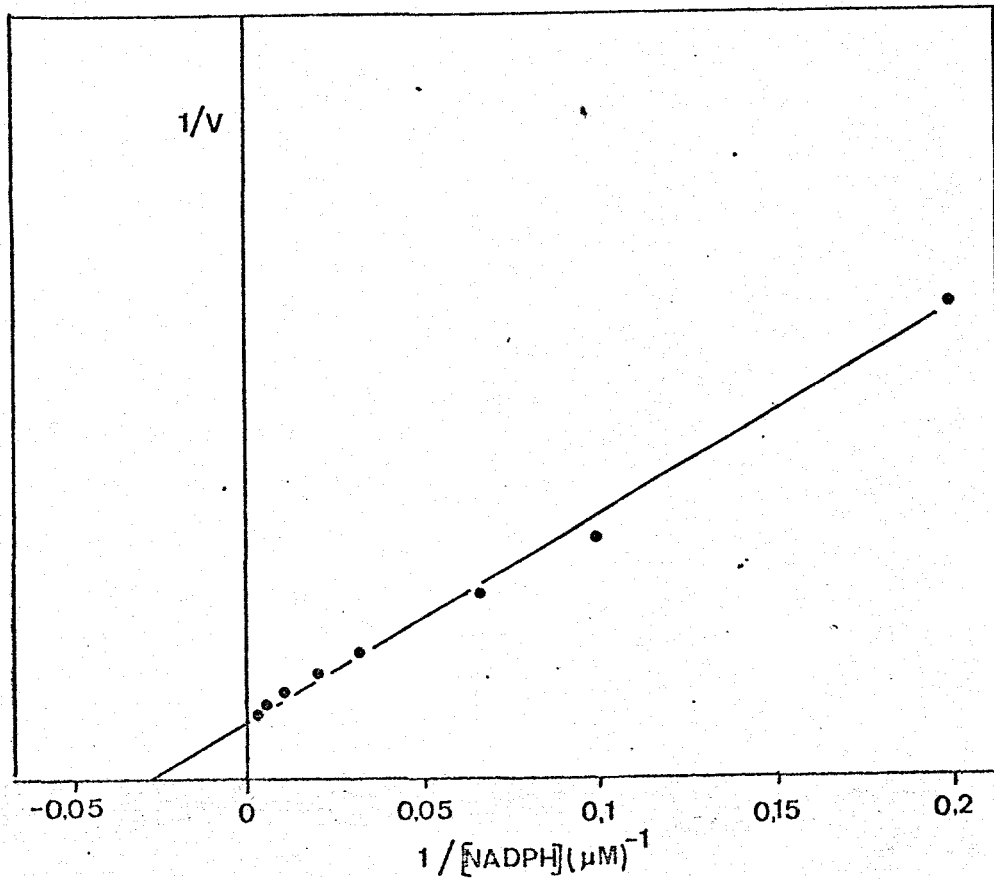


Fig. 36 Determinación de la  $K_m$  para el NADPH de la NADPH-oxido reductasa pesada de Acinetobacter calcoaceticus. Las condiciones del ensayo se han descrito en Materiales y Métodos utilizando como aceptor DPIP.

#### 6.10.4. Efecto de la temperatura sobre la NADPH-diaforasa pesada

Cuando el enzima se calentó en ausencia de FAD a 50°C, 5 min, se observó una inactivación de un 40%. A los 60°C, sin embargo, la inactivación observada fue prácticamente total (Fig. 37).

#### 6.10.5. Efecto de distintos componentes sobre la inactivación térmica de la NADPH-diaforasa

Ni las flavinas ni los viológenos ni el NADPH fueron efectivos protectores contra la inactivación térmica de la NADPH-diaforasa pesada de Acinetobacter calcoaceticus (Tabla 24). La simple preincubación del enzima con NADPH produjo incluso un 60% de inactivación, efecto que será estudiado posteriormente. (6.10.7)

#### 6.10.6. Efecto de las flavinas sobre la NADPH-diaforasa pesada

La actividad de la NADPH-oxidoreductasa no se estimula en presencia de flavinas, FAD o FMN, a concentraciones catalíticas de 5  $\mu$ M.

#### 6.10.7. Inactivación de la NADPH-diaforasa pesada por NADPH

La inactivación observada al preincubar el enzima en presencia de NADPH no pudo ser protegida por FAD o por FMN, como se muestra en la Tabla 25.

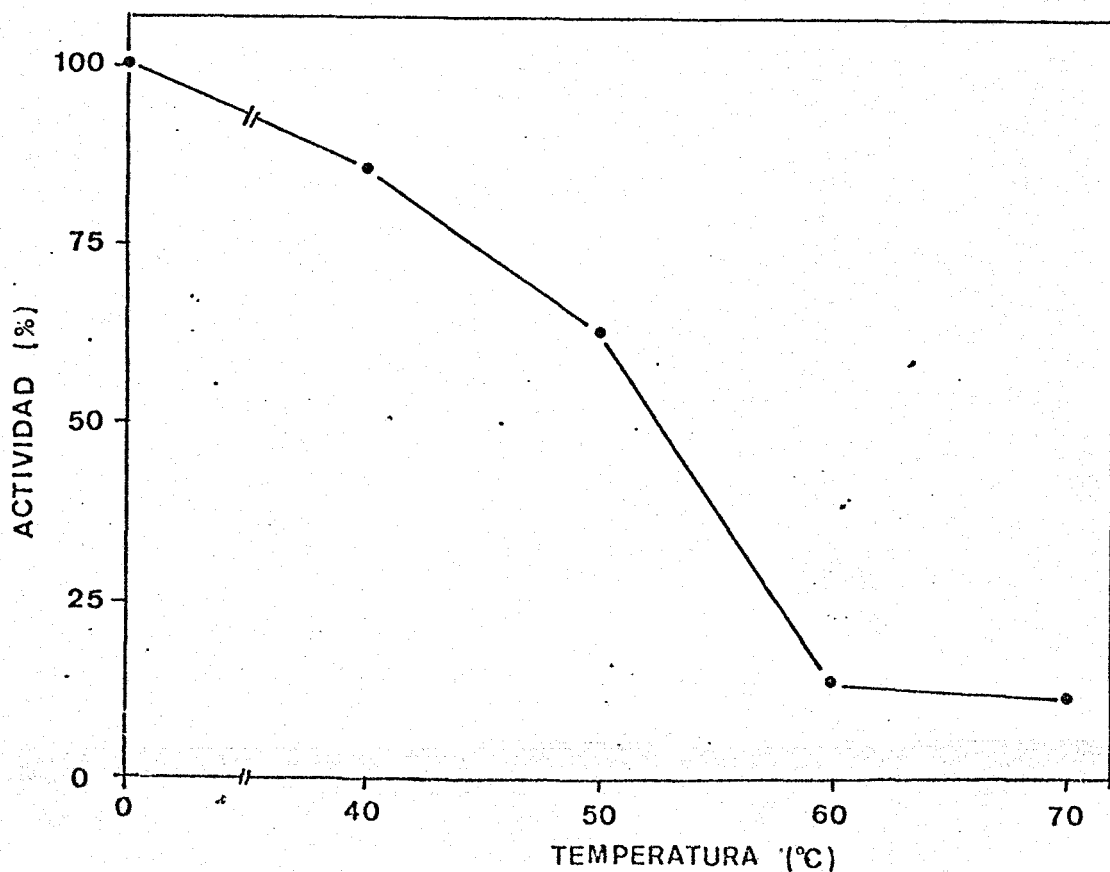


Fig. 37 Efecto del calentamiento sobre la NADPH-oxidoreductasa pesada de Acinetobacter calcoaceticus. El enzima previamente filtrado por Sephadex G-25 para eliminar el FAD, se preincubó a la temperatura indicada durante 5 min en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,5. Las condiciones de ensayo son las mismas que se indican en Materiales y Métodos con DPIP como aceptor de electrones. El 100% de actividad corresponde a 175 nmoles de NADPH oxidado en 10 min.

TABLA 24

EFFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION TER-  
MICA DE LA NADPH-OXIDORREDUCTASA PESADA DE  
Acinetobacter calcoaceticus

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	100
60°C, 5 min	9
NADPH, 1.5 mM	42
FAD, 50 µM, 60°C, 5 min	7
FMN, 50 µM, 60°C, 5 min	8
MV, 40 mM, 60°C, 5 min	7
BV, 40 mM, 60°C, 5 min	8
NADPH, 1,5 mM, 60°C, 5 min	9

El enzima fué preincubado con los distintos compuestos que se indica, previamente quitado el FAD que tenía de la purificación, y calentado según se indica, determinandose la actividad con DPIIP como aceptor de electrones según Materiales y Métodos. El 100% de actividad fué de 123 nmoles de NADPH oxidado en 10 min.

TABLA 25

EFFECTO DEL NADPH SOBRE LA NADPH-OXIDORREDUCTASA PESADA DE  
Acinetobacter calcoaceticus

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	100
NADPH 1 mM	45
NADPH 1 mM, FAD 33 $\mu$ M	48
NADPH 1 mM, FMN 33 $\mu$ M	56

El enzima sin FAD se preincubó a 25°C durante 10 min con los compuestos y a las concentraciones que se indican, de terminandose su actividad con DPIP como aceptor de electrones como se describe en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 135 nmoles de NADPH oxidado en 10 min.

## 6.11. Caracterización parcial de la NADH-diaforasa ligera de Acinetobacter

### 6.11.1. *Aceptores de electrones para la NADH diaforasa ligera*

La NADH-diaforasa ligera (PM= 57.000) utilizó como aceptores de electrones el ferricianuro, menadiona y el DPIP con gran eficacia. Las flavinas, los viológenos y el citocromo c, también aceptan los electrones en la reacción aunque con menor eficacia (Tabla 26).

### 6.11.2. *Reducción enzimática del DPIP mediante la NADH-diaforasa ligera*

En la Tabla 27 se muestra que la reducción de DPIP mediante NADH es un proceso enzimático, ya que dependió del enzima, del NADH y del aceptor y no tuvo lugar cuando el enzima se calentó 5 min, a 100°C.

### 6.11.3. *Protección contra la inactivación térmica de la NADH-diaforasa ligera de Acinetobacter*

Las flavinas tanto el FAD como el FMN y también el NADH protegieron al enzima contra la inactivación térmica (Tabla 28). Contrariamente a lo que ocurría en la NADPH-diaforasa pesada con su donador; el NADH cuando se preincuba con la NADH-diaforasa ligera produce una reactivación de la actividad diaforasa correspondiente.

TABLA 26

ACEPTORES DE ELECTRONES PARA LA NADH-OXIDORREDUCTASA LIGERA  
DE Acinetobacter calcoaceticus

ACEPTORES DE ELECTRONES	CONCENTRACION (mM)	NADH OXIDADO (nmoles/10 min)
Ninguno	-	0
Fe(CN) <sub>6</sub> K <sub>3</sub>	0.3	960
Menadiona	0.1	604
DPIP	0.1	329
FAD	0.1	25
FMN	0.1	12
BV	8	14
MV	8	3
Citocromo <u>c</u>	0.12	10

Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos utilizando los distintos aceptores de electrones a las concentraciones que se indica. Enzima sin FAD, 7.4 µg.

TABLA 27

REDUCCION ENZIMATICA DEL DPIP MEDIANTE LA NADH-OXIDORREDUCTASA LIGERA DE Acinetobacter calcoaceticus

SISTEMA	NADH OXIDADO (nmoles/10 min)
Completo	329
menos enzima	36
menos DPIP	0
menos NADH	0
Completo, enzima calentado (100°C, 5 min)	22

Las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos. Enzima sin FAD, 7.4 µg.



TABLA 28

EFFECTO DE DISTINTOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACIÓN TERMICA  
 MICA DE LA NADH-OXIDORREDUCTASA LIGERA DE  
Acinetobacter calcoaceticus

TRATAMINETO	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	100
50°C, 5 min	20
50°C, 5 min, MV 40 mM	15
50°C, 5 min, BV 40 mM	15
50°C, 5 min, FAD 50 µM	68
50°C, 5 min, FMN 50 µM	71
50°C, 5 min, NADH 1.5 mM	168
NADH 1.5 mM	160

El enzima se preincubó en las condiciones que se indica. La actividad se determinó usando DPIP como acceptor de electrones según se describe en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 50 nmoles de NADH oxidado en 10 min.

#### IV DISCUSSION

Los resultados anteriormente expuesto permiten esbozar el mecanismo enzimático de reducción de nitrato a nitrito en la bacteria Acinetobacter calcoaceticus.

El proceso de reducción asimilativa de nitrato llevado a cabo por esta bacteria, tiene lugar, con la participación de la proteína enzimática nitrato reductasa. El enzima trabaja con donadores de electrones artificiales (viológenos y flavinas) reducidas químicamente con ditionito o con el poder reductor del NAD(P)H, que a través de distintas oxidoreductasas presentes en las células bacterianas transfieren los electrones a este transportador artificial que es el que actúa de donador inmediato en el proceso enzimático de reducción del nitrato. En células toluenizadas se observaron los mismos resultados que en extractos enzimáticos siendo inefectivo el NAD(P)H en ausencia del transportador.

El primer interrogante que plantea la alta eficiencia de los donadores artificiales de electrones en el mecanismo de reducción de nitrato, es el de la posible naturaleza del donador fisiológico inmediato de electrones en el proceso enzimático. El que los viológenos reducidos sean tan eficaces donadores hace pensar que posiblemente un donador de  $E'_0$  alto participe en el proceso. Por otra parte la existencia de ferredoxina en este

organismo así como las evidencias presentadas de la reducción de nitrato llevada a cabo por la ferredoxina de Acinetobacter y de Azotobacter reducidas mediante diversos sistemas auxiliares (cloroplastos iluminados, NADPH-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductasa de espina-cas), sugiere fuertemente que el donador inmediato fisiológico de electrones en esta bacteria es la ferredoxina.

De hecho la ferredoxina participa directamente en la reducción del nitrato en todos los procariontes estudiados hasta la fecha, en algas verde-azuladas (14,34,70,71,80,86), bacterias fotosintéticas (70) y en otros procariontes no fotosintéticos (21,135). (Para una amplia revisión sobre el tema, vease Losada (1976) (64)).

La segunda cuestión a plantear es cuál es el donador de electrones de la ferredoxina en el proceso de reducción mediado por la nitrato reductasa de Acinetobacter. Nuestros resultados indican que el NAD(P)H es capaz de reducir, mediante distintas diaforasa presentes en las células, a un transportador de electrones que a su vez es capaz de llevar a cabo enzimáticamente la reducción de nitrato. Tanto el MV como el BV así como las flavinas son capaces de recibir los electrones del NAD(P)H, participando los viológenos y las flavinas así reducidas en la reducción del nitrato.

La existencia de diaforasas bacterianas con viológenos como aceptores ha sido detectada en Azotobacter vinelandi (79, 80) habiéndose conseguido conectar estos viológenos reducidos enzimáticamente con la actividad nitrato reductasa de Nitrobacter agilis (145) y Micrococcus denitrificans (56,81). Ultimamente, en Azotobacter chroococcum (133,135) se ha conseguido acoplar también la actividad viológeno reductasa presente en esta bacteria con la reducción de nitrato.

Las flavinas reducidas mediante el sistema NAD(P)H-diaforasa pudieron asimismo ser acopladas a la reducción de nitrato en A. calcoaceticus, sustituyendo a los viológenos. Sin embargo, el hecho de que fuera necesarias concentraciones muy altas, así como las características cinéticas de estos aceptores en la reacción de la diaforasa nos inclina a asignar un muy dudoso papel fisiológico a las flavinas en la reducción de nitrato en estas bacterias, al contrario de lo que parece ocurrir en la reducción desasimilativa en ciertas bacterias denitrificantes (23,146).

Al ser los viológenos mediadores necesarios en la reducción de nitrato con el sistema NAD(P)H-diaforasa apunta la posibilidad que un transportador altamente electronegativo sea el aceptor fisiológico de la reacción de la diaforasa. Las ferredoxinas bacterianas con su alto  $E'_0$  (-0,40 V) (66) y su facilidad de ser reducidas en condiciones fisiológicas intracelulares por el par NADH/NAD<sup>+</sup> (77) son los mas firmes candidatos en este proceso. De

hecho la existencia de distintos tipos de NAD(P)H-ferredoxina reductasa que participaría en la reducción de la ferredoxina necesaria para la producción de hidrógeno o fijación de nitrógeno, ha sido demostrada en bacterias anaerobias (46,47,48,49,50,131,132) y aerobias (10).

En Clostridium perfringens se ha conseguido reducir el nitrato con NADH utilizando ferredoxina como transportador de electrones (21) y en nuestro laboratorio se ha visto recientemente que la ferredoxina, reducida mediante diversos sistemas auxiliares, puede actuar de donador inmediato en la reducción de nitrato en A. chroococcum (135).

Aunque, en el momento presente, no se tiene evidencia directa de que la ferredoxina reciba los electrones a través del sistema NADP(H)-diaforasa en Acinetobacter los resultados anteriormente expuestos sugieren claramente tal posibilidad. En este trabajo la ferredoxina de Acinetobacter ha sido fácilmente purificada hasta homogeneidad y parcialmente caracterizada. Su espectro de absorción es muy parecido al de una ferredoxina de A. vinelandii (150) y resultó muy efectiva como intermediario en la fotorreducción del  $\text{NADP}^+$  con cloroplastos de espinaca iluminados y como aceptor de electrones desde el NADPH a través de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-oxidorreductasa de espinacas.

No existe aún evidencia de que la ferredoxina de Acinetobacter pueda reducirse mediante la reacción fosforoclastica del piruvato, actuando así de donador en la reducción de nitrato, como ha sido sugerido para el proceso de fijación de nitrógeno en Anabaena cylindrica (11,17) y Clostridium pasteurianum (12). Experimentos preliminares con células enteras indica que ciertos ácidos carboxílicos (succinato, malato, acetato y piruvato) son capaces de reducir nitrato a nitrito que es excretado al medio, lo cual sugeriría más bien que los equivalentes de NADH obtenidos en la oxidación de estos distintos compuestos podrían ser utilizados como fuentes de poder reductor en la reacción de la nitrato reductasa.

En los extractos acelulares de Acinetobacter calcoaceticus se ha podido detectar al menos tres actividades NAD(P)H-diaforasa físicamente separables de la actividad nitrato reductasa y que ha sido parcialmente caracterizadas en cuanto a su peso molecular, características cinéticas, requerimiento de donadores y aceptores, y ciertas propiedades de regulación, como queda detallado en la Sección Resultados.

Como queda indicado más arriba, los resultados que se presenta en este trabajo apunta a una posible participación de los piridín nucleótidos reducidos en el proceso de reducción de nitrato mediante este sistema diaforasa. En la actualidad nuestro es -

fuerzo se concentra en el esclarecimiento a fondo del posible papel fisiológico de estas diaforasas en el mecanismo molecular de la asimilación de nitrato en bacterias.

La nitrato reductasa de Acinetobacter es una proteína de 96.000 de peso molecular muy similar a la de Azotobacter chroococcum (31). Del estudio de los inhibidores se desprende que muy probablemente grupos -SH participan en su actividad catalítica al igual que ha sido sugerido para otras nitrato reductasas bacterianas. (31). Por otra parte la inhibición por CNK y azida, apuntaba la posibilidad de que ciertos metales pesados estuvieran implicado en la catalisis enzimática de la nitrato reductasa. El cianuro ha sido descrito como inhibidor competitivo de la nitrato reductasa oxidada de plantas superiores y algas verdes (4,106,139) mientras que en condiciones reductoras una inhibición por cianuro de tipo no competitiva ha sido observada con respecto al nitrato en enzima de diversos orígenes (6,28,106,113,134,139).

En Acinetobacter hemos observado una inhibición por cianuro de tipo acompetitiva respecto al nitrato. El significado fisiológico del comportamiento cinético del enzima en presencia de cianuro y el posible papel regulador del cianuro en el proceso de asimilación del nitrato en esta bacteria está aun por aclarar. En Chlorella vulgaris se ha sugerido que la nitrato reductasa se inac-



tiva in vivo por cianuro y condiciones reductoras (29).

El tungsteno ha sido descrito como competidor del molibdeno en procesos fisiológicos mediados por molibdo-enzimas (15,32,43,75,91,126,129,138,149) y el molibdeno es constituyente esencial de todas las nitrato reductasas conocidas (2,15,32,43,75,83,84,91,126,.129,138,149). Los resultados de este trabajo obtenidos estudiando el efecto antagonistas del tungstato frente al molibdato a nivel de crecimiento y a nivel de actividad del enzima demuestra inequívocamente que la nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus es una molibdoproteína. Si el tungsteno compite con el molibdeno a nivel de síntesis de la proteína o simplemente a nivel de transporte, es algo que necesita ulterior y mas detallada investigación. De hecho, experimentos preliminares parecen indicar que en células crecidas en presencia de tungstato parece que existe una apoproteína, carente de actividad ya que es capaz de transformarse en activa por la adición de molibdato al medio de cultivo en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas, como ha sido descrito para la nitrato reductasa respiratoria de Stafilococcus aureus (13), la nitrato reductasa asimilatoria de Chlorella (138) y la sulfito oxidasa y xantino oxidasa de hígado de rata (45).

El hierro ha sido también descrito como un componente esencial para la actividad enzimática de la nitrato reductasa asimilatoria de diferentes orígenes Losada (1976) (64). Un citocromo de tipo b ha sido caracterizado en Neurospora (26,27) y en

Chlorella (121,122,140). En bacterias, ciertas nitrato reductasas respiratorias tienen hierro no-hemínico (24,25,116). Recientemente, se ha caracterizado en Klebsiella, un citocromo de tipo b como participante en la respiración de nitrato por esta bacteria en condiciones anaeróbicas. Pero cuando dicho organismo, en condiciones aeróbicas, utilizan el nitrato, su nitrato reductasa no parece requerir para su actividad ningún tipo de hierro hemínico (54, 136). Resultados similares se ha obtenido en E. coli (38) y en Pseudomonas aeruginosa se ha purificado una nitrato reductasa que al parecer, contiene citocromo de tipo c (23).

Nuestros resultados a nivel fisiológico parecen indicar que el hierro puede jugar un papel en la actividad nitrato reductasa en Acinetobacter, pues al cultivar las células en concentraciones crecientes de hierro, se ha observado un incremento concomitante de los niveles intracelulares del enzima.

El cianato ha sido descrito como un inhibidor competitivo de la nitrato reductasa de plantas superiores y algas (106,121, 139). Recientemente, sin embargo, se ha observado un efecto protector e incluso reactivador de esta sustancia en procesos de inactivación de la nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum. Cuando el enzima de Azotobacter se ensayaba a 30°C se observó una inactivación a los pocos minutos que no existía si el ensayo se llevaba a cabo en presencia de cianato (31).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la nitrato reductasa de Acinetobacter puede inactivarse en el ensayo por la acción conjunta de las fuertes condiciones reductoras y temperatura y que esta inactivación puede ser impedida o revertida si el cianato está presente en el medio. En el proceso de inactivación participa de manera decisiva aunque no exclusiva la temperatura como antes decíamos, ya que el enzima calentado durante 15 min a 30°C en ausencia de los componentes de la mezcla de reacción, presenta una cinética lineal cuando se ensaya a 2°C, tras la preincubación. Esto indica que temperatura y fuertes condiciones reductoras cooperan para producir la inactivación. Posiblemente el calentamiento produce un cambio conformacional en la proteína que la hace susceptible a la acción inactivante del agente reductor. El efecto inactivante de la temperatura en presencia de condiciones reductoras empieza a observarse a partir de los 10°C y es prácticamente total a los 20°C.

Asimismo, la nitrato reductasa de Acinetobacter es inactivada por ditionito en presencia de bajas concentraciones de nitrato. El proceso de inactivación es muy rápido en estas condiciones. Altas concentraciones protegen parcialmente contra la inactivación. El mismo fenómeno ha sido observado en el enzima de Azotobacter chroococcum (31). Ello nos induce a postular un mecanismo de acción

del nitrato a bajas concentraciones parecido al de la temperatura: inducción de un cambio conformacional en la proteína que la hace sensible a la inactivación por las condiciones reductoras.

Al parecer para que la inactivación se produzca las condiciones reductoras han de ser fuertes, pues cuando el enzima se ensaya a 24°C con NAD(P)H, NAD(P)H-diaforasa y BV o FAD no se observa pérdida de actividad.

El cianato, cuando está presente en todas las condiciones antes descritas, protege contra la inactivación e incluso puede revertirla, una vez producida. Además, cuando el enzima se inactivaba a 30°C en presencia de los componentes de la reacción, la inactivación no desaparecía al cambiar la temperatura de 30°C a 2°C, sino que era necesario añadir cianato.

Es curioso hacer notar que las condiciones reductoras fuertes son necesarias también para que el cianato ejerza su efecto reactivador. Lo cual parece indicar que el papel del cianato consiste en interaccionar con el enzima reducido manteniéndolo en una conformación activa. Así la cinética del enzima a 30°C en presencia de cianato fue del tipo Michaelis-Menten, a diferencia de la observada en su ausencia.

Nuestros resultados indican que el carbamil fosfato es capaz de ejercer el mismo efecto que el cianato en la protección y reactivación de la nitrato reductasa de Acinetobacter en el ensayo a 30°C, aunque con una eficiencia menor.

Dada la posible transformación del carbamil fosfato en cianato y la reconocida capacidad del cianato para reaccionar con distintos restos funcionales de los enzimas (30,74,123,124, 125,141) cabría pensar que la protección ejercida por el cianato se produce a través de un mecanismo de carbamilación. Sin embargo la rapidez con que se observa el efecto y la labilidad observada de la unión enzima-cianato, nos inclina a pensar que la protección se produce mediante una interacción directa entre el enzima y el cianato de naturaleza aún no esclarecida.

El MV es capaz de proteger la nitrato reductasa de Acinetobacter contra la inactivación por ditionito y bajas concentraciones de nitrato, pero no puede revertir el proceso si la inactivación ha tenido lugar. Análogos resultados se han obtenido en el enzima de Azotobacter (31). En la nitrato reductasa de bacteroides de Rhizobium japonicum se ha observado también un efecto protector de los viológenos frente a la inactivación producida por ditionito (53), sugiriéndose que el viológeno reducido mantenía al enzima en su forma activa (67).

Por todo ello creemos que la actividad nitrato reductasa está controlada, en Acinetobacter, por un mecanismo de interconversión posiblemente de tipo redox. El enzima es activo cuando se encuentra en su forma oxidada e inactivo cuando está en forma reducida.

Otras nitratos reductasas de diversos orígenes parecen estar reguladas también por mecanismos de interconversión (5,41,44,60,62,69,76,95,107,108,109,112,130).

La regulación de la síntesis de la nitrato reductasa en los organismos hasta ahora estudiados, es tema controvertido y aún no bien aclarado (39). Mientras en algunos organismos el enzima es reprimido por amonio (39,40,61,112) o algún producto del mismo (51). En otros organismos se piensa además que el enzima tiene carácter inducible por sustrato (20,31,33,58,78,95,119,127,128).

Los resultados de este trabajo claramente demuestran que la nitrato reductasa de Acinetobacter se reprime por amonio, producto final de la ruta de asimilación del nitrato. El nitrito es incapaz de reprimir la síntesis de enzima y la represión por amonio tiene lugar aun en presencia de nitrato o nitrito. En este último respecto, el enzima de Acinetobacter difiere del de Azotobacter chroococcum (31) con el que, por otra parte, presenta tantas semejanzas en propiedades, tamaño, contenido en metales y mecanis

mo de interconversión.

La represión observada por amonio se confirma por los experimentos de derrepresión realizados en presencia de kanamicina. Cuando el amonio se eliminó del medio de cultivo, se observó una síntesis de novo de nitrato reductasa en ausencia de nitrato, síntesis que se impedía en presencia de kanamicina.

## V CONCLUSIONES



- 1 La nitrato reductasa de Acinetobacter calcoaceticus es un enzima de 96.000 daltons de peso molecular, que utiliza los viológenos reducidos como donadores artificiales de electrones y es inactivada por reactivos de grupos -SH, así como por CNK. Así mismo se han determinado sus características cinéticas y ciertas propiedades físico-químicas.
- 2 Mediante estudios de competición con tungstato se ha comprobado que la nitrato reductasa de este organismo es una molibdoproteína.
- 3 El hierro parece ser un componente esencial de la nitrato reductasa, ya que los niveles de actividad de esta, se incrementan al aumentar la concentración de hierro en el medio de cultivo.
- 4 Se ha purificado hasta homogeneidad una ferredoxina de Acinetobacter que actúa como donador de electrones para la nitrato reductasa cuando se reduce con un sistema auxiliar de cloroplastos iluminados.
- 5 La nitrato reductasa se inactiva durante su ensayo con viológenos reducidos químicamente por ditionito. El cianato y el carbamil fosfato evitan y revierten dicha inactivación.

- 6 El enzima es inactivado también por ditionito y bajas concentraciones de nitrato del orden de 10  $\mu$ M. A concentraciones mayores de nitrato un efecto protector frente a esta inactivación fué observado.
- 7 El cianato protege y revierte dicha inactivación mientras que el metil viologeno solo muestra un efecto protector.
- 8 Los efectos reactivador y protector del cianato solo se observaron en presencia de fuertes condiciones reductoras.
- 9 La unión del enzima con el cianato es débil y el complejo formado se disocia fácilmente.
- 10 La nitrato reductasa se reprime por amonio a nivel de síntesis.
- 11 Ha sido posible reducir enzimáticamente nitrato con NAD(P)H como donador de electrones y viológenos o flavinas como transportadores en presencia de NAD(P)H-diaforasas presentes en los extractos libres de células.
- 12 Estas diaforasas son enzimas físicamente separables de la nitrato reductasa.

13 Se ha iniciado el estudio de la diaforasa pesada dependiente de NADPH (PM=165.000) y de la diaforasa ligera dependiente de NADH (PM=57.000) habiéndose determinado algunas de sus características enzimáticas y propiedades de regulación.



## VI BIBLIOGRAFIA

- 1 ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91, 222-233 (1964)
- 2 APARICIO, P.J., CARDENAS, J., ZUMFT, W.G., VEGA, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Molybdenum and Iron as constituents of the enzymes of the nitrate reducing system from Chlorella. *Phytochemistry* 10, 1487-1495 (1971)
- 3 ARNON, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphe-noloxidase in Beta vulgaris. *Plant. Physiol.* 24, 1-15 (1949)
- 4 BAREA, J.L.: El sistema reductor de nitrato de Chlamydomonas reinhardii. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1974)
- 5 BAREA, J.L., SOSA, F.M., ORTEGA, T.: Regulación de la NADH-nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardii. Inactivación reversible in vivo e in vitro. *Ann. Edaf. Agrobiol.* 33, 1045-1054 (1974)
- 6 BAREA, J.L., SOSA, F., CARDENAS, J.: Cyanide inactivation of Chlamydomonas reinhardii nitrate reductase under reducing conditions. *Z. Pflanzenphysiol.* (en prensa)
- 7 BARKER, A.V.: Nitrate determination in soil, water and plants. *Massachusetts Agr. Exp. Sta. Bul.* 611, pp 20-22 (1974)

- 8 BAUMANN, P., DOUDOROFF, M., STANIER, R.Y.: A study of the Moraxella group II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). J. Bacteriol. 95, 1520-1541 (1968)
- 9 BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H.: Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495-522 (1969)
- 10 BENEMANN, J. R., YOCH, D.C., VALENTINE, R.C., ARNON, D.I.: The electron transport system in nitrogen fixation by Azotobacter III Requirements for NADPH-supported nitrogenase activity. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 226, 205-212 (1971)
- 11 BOTHE, H., FALKENBERG, B.: Demonstration and possible role of a ferredoxin-dependent pyruvate decarboxylation in the nitrogen-fixing blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant Sci. Letters, 1, 151-156 (1973)
- 12 BURNS, R. C., HARDY, R.W.F.: Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. ed: A. Kleinzeller, G.F. Springer, H. G. Wittmann. Springer-Verlag, Berlin, 1975
- 13 BURKE, K.A., LASCELLES, J.: Nitrate reductase system in Staphylococcus aureus. Wild type and mutants. J. Bacteriol., 123, 308-316 (1975)

- 14 CANDAU, P., MANZANO, C., LOSADA, M.: Bioconversion of light energy into chemical energy through reduction with water of nitrate to ammonia. Nature (en prensa)
- 15 CARDENAS, J., RIVAS, J., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Molybdenum and the nitrate-reducing system from Chlorella. Arch. Mikrobiol., 79, 367-376 (1971)
- 16 CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., PALACIAN, D.: Nitrate reductase from Spinaceaoleracea. Effects of sulphhydryl-groups reagents on the activities of the complex and the inactivation by NADH. Biochem biophys. Res. Comm., 64, 546-552 (1975)
- 17 CODD, G.A., ROWELL, P., STEWART, W.D.P.: Pyruvate and nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga Anabaena cylindrica. Biochem. biophys. Res. Comm., 61, 424-431 (1974)
- 18 COHEN, H.J., JOHNSON, J.L., RAJAGOPALAN, K.V.: Molecular basis of the biological function of molybdenum developmental patterns of sulfite oxidase and xanthine oxidase in the rat. Arch. Biochim biophys, 164, 440-446 (1974)
- 19 CONWAY, D.J.: Microdiffusion analysis and volumetric error, ed: Crosby Lockwood, London, pp 90-132, 1957

- 20 COVE, D.J.: The induction and repression of nitrate reductase in the fungus Aspergillus nidulans. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 113, 51-56 (1966)
- 21 CHIVA, S., ISHIMOTO, M.: Ferredoxin-linked nitrate reductase from Clostridium perfringens. *J. Biochem.*, 73, 1315-1318 (1973)
- 22 DOWNEY, R.J.: Characterization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase of Aspergillus nidulans. *J. Bacteriol.*, 105, 759-768 (1971)
- 23 FEWSON, C.A., NICHOLAS, D.J.D.: Nitrate reductase from Pseudomonas aeruginosa. *Biochim biophys. Acta (Amst.)* 49, 335-349 (1961)
- 24 FORGET, P.: Les nitrate-réductases bactériennes. Solubilization, purification et propriétés de l'enzyme A de Micrococcus denitrificans. *Eur. J. Biochem.*, 18, 442-450 (1971)
- 25 FORGET, P.: The bacterial nitrate reductase. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of Escherichia coli K12. *Eur. J. Biochem.*, 42, 325-332 (1974)
- 26 GARRETT, R.H., NASON, A.: Involvement of a b-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of Neurospora crassa. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 58, 1603-1610 (1967)



- 27 GARRETT, R.H., NASON, A.: Further purification and properties of Neurospora nitrate reductase. J. Biol. Chem., 244, 2870-2882 (1969)
- 28 GARRETT, R.H., GREENBAUN, P.: The inhibition of the Neurospora crassa nitrate reductase complex by metal binding agents. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 302, 24-32 (1973)
- 29 GEWITZ, H.S., LORIMER, G.H., SOLOMONSON, L.P., VENNESLAND, B.: Presence of HCN in Chlorella vulgaris and its possible role in controlling the reduction of nitrate. Nature, 249, 79-81 (1974)
- 30 GRISOLIA, S., HOOD, W.: Chemotrophic basis for and regulation of protein turnover: An irreversible type of elastoplastic enzyme modification. En: Biochemical regulatory mechanism in eukaryotic cells. ed: E. Kun and S. Grisolia; Wiley Interscience, New York, pp 137-203, 1972
- 31 GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E., LOSADA, M.: Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Arch. Mikrobiol., 91, 287-304 (1973)
- 32 GUERRERO, M.G., VEGA, J.M.: Molybdenum and Iron as functional constituents of the enzymes of the nitrate-reducing system of Azotobacter chroococcum. Arch. Microbiol., 102, 91-94 (1975)

- 33 HATTORI, A.: Adaptative formation of nitrate reducing system in Anabaena cylindrica. *Plant Cell Physiol.*, 3, 371-377 (1962)
- 34 HATTORI, A., MYERS, J.: Nitrate and nitrite reduction by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. *Plant Physiol.*, 40, iii (1965)
- 35 HATTORI, A., MYERS, J.: Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. II, Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Cell Physiol.* 8, 327-337 (1967)
- 36 HATTORI, A.: Solubilization of nitrate reductase from the blue-green alga Anabaena cylindrica. *Plant Cell Physiol.*, 11, 975-978 (1970)
- 37 HENDERSON, A.: The saccharolytic activity of Acinetobacter lwoffii and Acinetobacter anitratum. *J. Gen. Microbiol.*, 49, 487-489 (1967)
- 38 HEREDIA, C.F., MEDINA, A.: Nitrate reductase and related enzymes in Escherichia coli. *Biochem. J.* 77, 24-30 (1960)
- 39 HERRERA, J.: Mecanismo de regulación de la síntesis y actividad de la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardtii. Tesis Doctoral, Universidad de Granada (1972)

- 40 HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L., LOSASA, M.: Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem. biophys. Res. Commun., 48, 996-1003 (1972)
- 41 HERRERA, J., NICHOLAS, D.J.D.: Inactivation of nitrate reductase by NADH in Nitrobacter agilis. Biochim Biophys. Acta (Amst.) 368, 54-60 (1974)
- 42 HEWITT, E.J.: Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 73-100 (1975)
- 43 HIGGINS, E.S., RICHERT, D.A., WESTERFIELD, W.W.: Tungstate antagonism of molybdate in Aspergillus niger. Proc. Scient. Exp. Biol. Med., 92, 509-511 (1956)
- 44 JETSCHMANN, K., SOLOMONSON, L.P., VENNESLAND, B.: Activation of nitrate reductase by oxidation. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 275, 276-278 (1972)
- 45 JOHNSON, J.L., RAJAGOPALAN, K.V.: Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on Xanthine oxidase and Sulfite oxidase in the rat. J. Biol. Chem., 249, 859-866 (1974)

- 46 JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., RUPPRECHT, E., OHRLOFF, C., DECKER, K.: Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of Clostridium kluveri. FEBS-Letters, 3, 144-146 (1969)
- 47 JUNGERMANN, K., LEIMENSTOLL, G., RUPPRECHT, E., THAUER, R.K.: Demonstration of NADH-ferredoxin reductase in two saccharolytic Clostridia. Arch. Mikrobiol. 80, 370-372 (1971)
- 48 JUNGERMANN, K., RUPPRECHT, E., OHRLOFF, C., THAUER, R.K., DECKER, K.: Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in Clostridium kluveri. J. Biol. Chem. 246, 960-963 (1971)
- 49 JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., LEIMENSTOLL, G., DECKER, K.: Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic Clostridia. Biochim Biophys. Acta, (Amst.) 305, 269-280 (1973)
- 50 JUNGERMANN, K., KIRCHNIAWY, H., KATZ, N., THAUER, R.K.: NADH, a physiological electron donor in Clostridial nitrogen fixation. FEBS-Letters, 43, 203-206 (1974)
- 51 JYSSUM, K., JONER, P.E.: Regulation of the nitrogen assimilation from nitrate and nitrite in Bacterium anitratum. (B5W) Acta Pathol. Microbiol. Scand., 64, 387-397 (1965)

- 52 KATOH, T.: Nitrate reductase in photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum. Purification and properties of nitrate reductase in nitrate adapted cells. *Plant Cell Physiol.*, 4, 13-28 (1962)
- 53 KENNEDY, I.R., RIGAUD, J., TRINCHANT, J.C.: Nitrate reductase from bacteroids of Rhizobium japonicum. Enzyme characteristics and possible interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 397, 24-35 (1975)
- 54 KNOOK, D.L., VAN'T RIET, J., PLANTA, R.J.: The participation of cytochromes in the process of nitrate respiration in Klebsiella (Aerobacter) aerogenes. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 292, 237-245 (1973)
- 55 KORNBERG, H.L., REEVES, R.E.: Correlation between hexose transport and phosphotransferase activity in Escherichia coli. *Biochem J.*, 126, 1241-1243 (1972)
- 56 LAM, Y., NICHOLAS, D.J.D.: A nitrate reductase from Micrococcus denitrificans. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 178, 225-234 (1969)
- 57 LAZZARINI, R.A., SAN PIETRO, A.: The reduction of cytochrome c by photosynthetic pyridine nucleotide reductase and transhydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 62, 417-420 (1962)

- 58 LEWIS, C.M., FINCHAM, J.R.S.: Regulation of nitrate reductase in the basidiomycete Ustilago maydis. J. Bacteriol., 103, 55-61 (1970)
- 59 LOSADA, M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A.: Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH En: Progress in photosynthesis research, vol. 3 pp 1504-1509 eds. H. Metzner, H. Lanpp, Jr. Tubingen , 1969
- 60 LOSADA, M.: The assimilatory nitrate reducing system and its regulation by ammonia in Chlorella En: 1<sup>st</sup> International Symposium on Metabolic Interconversion of Enzymes. Outlines of the paper, pp 59-64 S. Margherita, Italia (1970)
- 61 LOSADA, M.: La fotosíntesis del nitrógeno nítrico. Real Academia de Ciencias, Madrid, 1972
- 62 LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J. M., PANEQUE, A.: Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant. Sci, Letters. 1, 31-37 (1973)
- 63 LOSADA, M.: Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. En: 3<sup>rd</sup> International Symposium of Metabolic Interconversion of Enzymes. Seattle, U.S.A., (1973)

- 64 LOSADA, M.: Metalloenzymes of the nitrate-reducing system  
J. Mol. Catal., 1, 245-263 (1976)
- 65 LOVENBERG, W., BUCHANAN, B.B., RABINOWITZ, J.C.: Studies  
on the chemical nature of Clostridial ferredoxin. J. Biol.  
Chem., 238, 3899-3913 (1963)
- 66 LOVENBERG, W.: Ferredoxin and Rubredoxin En: Microbial iron  
metabolism; ed: J.B. Neilands p 161, Academic Press Inc. New  
York (1974)
- 67 LOWE, R.H., EVANS, H.J.: Preparation and some properties of  
a soluble nitrate reductase from Rhizobium japonicum. Biochim.  
Biophys. Acta (Amst.) 85, 377-389 (1964)
- 68 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Pro-  
tein measurements with the Folin-phenol reagents. J. Biol. Chem.,  
193, 265-275 (1951)
- 69 MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Rever-  
sible inactivation by NADH and ADP of Chlorella fusca nitrate  
reductase. Biochem. biophys. Res. Comm. 51, 27-33 (1973)
- 70 MALOFEEVA, I.V., KONDRATIEVA, E.N., RUBIN, A.B.: Ferredoxin-  
linked nitrate reductase from the phototrophic bacterium Ec-  
tothiorhodospira shaposhnikovi. FEBS-Letters, 53, 2- (1975)

- 71 MANZANO, C., CANDAU, P., GOMEZ-MORENO, C., RELIMPIO, A.M., LOSADA, M.: Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of Anacystis nidulans. Mol. Cell Biochem. , 10, 161-169 (1976)
- 72 MARTIN, R.G., AMES, B.N.: A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: Application to protein mixture. J. Biol. Chem., 236, 1372-1379 (1961)
- 73 MCGREGOR, C.H., SCHNAITMAN, C.A., NORMANSELL, D.E., HUDGINS, M.G.: Purification and properties of nitrate reductase from E. coli K-12. J. Biol. Chem., 249, 5321-5327 (1974)
- 74 MEANS, G.E., FEENEY, R.E.: Selected techniques for the modification of protein side chains. En: Chemical modification of proteins, pp 84-89 ed: Holden-Day, Inc. San Francisco, 1964
- 75 MEINER, Y.M., WRAY, J.L., FILNER, P.: The effect of tungstate on nitrate assimilation in higher plant tissues. Plant Physiol. 44, 1197-1199 (1969)
- 76 MORENO, C.G., APARICIO, P.J., PALACIAN, E., LOSADA, M.: Interconversion of the active and inactive forms of Chlorella nitrate reductase FEBS-Letters, 26, 11-14 (1972)



- 77 MORTENSON, L.E., NAKOS, G.: Bacterial ferredoxins and/or iron-sulfur proteins as electrons carriers. En: Iron-sulfur proteins, ed: W. Lovenberg p37, Academic Press Inc., New York, 1973
- 78 MORTON, A.G., McMILLAN, A.: The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Expl. Botany*, 5, 232-252 (1954)
- 79 NAGAI, Y., ELLEWAY, R.F., NICHOLAS, D.J.D.: Some properties of an NADH-benzyl viologen reductase from Azotobacter vinelandii. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 153, 766-776 (1968)
- 80 NAIK, M.S., NICHOLAS, D.J.D.: NADH<sub>2</sub>benzyl viologen reductase from Azotobacter vinelandii. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 118, 195-197 (1966)
- 81 NAIK, M.S., NICHOLAS, D.J.D.: Reduction of viologen dyes and a non-heme iron protein by NADH in particles from Azotobacter vinelandii. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 131, 204-207 (1967)
- 82 NASON, A.: Symposium on metabolism of inorganic compounds II. Enzymatic pathway of nitrate, nitrite and hydroxylamine metabolisms. *Bacteriol. Rev.*, 26, 16-41 (1962)

- 83 NICHOLAS, D.J.D., NASON, A.: Molybdenum and nitrate reductase II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* 207, 353-360 (1954)
- 84 NOTTON, B.A., HEWITT, E.J.: Incorporation of radioactive molybdenum into proteins during nitrate reductase formation and effect of molybdenum on nitrate reductase and diaphorase activities on spinach (*Spinacea oleracea L.*). *Plant Cell Physiol.*, 12, 465-477 (1971)
- 85 NOTTON, B.A., HEWITT, E.J.: Molybdenum and tungsten in nitrate reductase. *J. Less-common Metals*, 36, 437-448 (1974)
- 86 OHMORI, K., HATTORI, A.: Induction of nitrate and nitrite reductases in *Anabaena cylindrica*. *Plant Cell, Physiol.*, 11, 873-878 (1970)
- 87 ORNSTON, L.N., STANIER, R.Y.: The conversion of catechol and protocatechnate to  $\beta$ -ketoadipate of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3776-3786 (1966)
- 88 ORTEGA, T., CASTILLO, F., CARDENAS, J.: Photolysis of water coupled to nitrate reduction by *Nostoc muscorum* subcellular particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (en prensa)

- 89 PANEQUE, A., ARNON, D.I.: Photoproduction of hydrogen gas with ascorbate. *Plant Physiol.*, 37, supp 4 (1962)
- 90 PANEQUE, A., LOSADA, M.: Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH and NADPH. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 128, 202-204 (1966)
- 91 PANEQUE, A., VEGA, J.M., CARDENAS, J., HERRERA, J., APARICIO, P.J., LOSADA, M.:  $^{185}\text{W}$ -labelled nitrate reductase from Chlorella. *Plant Cell Physiol.*, 13, 175-178 (1972)
- 92 PAYNE, W.J.: Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 37, 409-452 (1973)
- 93 PICHINOTY, F., D'ORDANO, L.: Inhibition by oxygen of biosynthesis and activity of nitrate reductase in Aerobacter aerogenes. *Nature (London)*., 191, 878-881 (1961)
- 94 PICHINOTY, F.: A propos des nitrate-réductases d'une bactérie dénitrifiante. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 89, 378-381 (1964)
- 95 PICHINOTY, F., METENIER, G.: Contribution a l'étude de la nitrate reductase assimilatrice d'une levure. *Ann. Inst. Pasteur.*, 111, 282-313 (1966)

- 96 PICHINOTY, F., PIECHAUD, M.: Recherche des nitrate-reductases bactériennes A et B: méthods. Ann. Inst. Pasteur. 114, 77-98 (1968)
- 97 PICHINOTY, F., AZOULAY, E., COUCHOUD-BEAUMONT, P., LE MINOR, L., RIGANO, C., BIGLIARDI-ROUVIER, J., PIECHAUD, M.: Récherche des nitrate-réductases bactériennes A et B: results. Ann. Inst. Pasteur, 116, 27-42 (1969)
- 98 PICHINOTY, F.: Les nitrate réductases bactériennes I. Substrats état particulaire et inhibiteurs de l'enzyme A. Arch. Mikrobiol., 68, 51-64 (1969)
- 99 PICHINOTY, F.: Les nitrate-réductases bactériennes II. Propiétés de l'enzyme A envers les donneurs d'electrons. Arch. Mikrobiol., 68, 65-73 (1969)
- 100 PICHINOTY, F.: Les nitrate-réductases bactériennes III. Propiétés de l'enzyme B. Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 875-890 (1969)
- 101 PICHINOTY, F.: Les nitrate-réductases bactériennes IV. Regulation de la biosynthese et de l'activité de l'enzyme B. Arch. Mikrobiol., 71, 116-122 ( )

- 102 PICHINOTY, F.: Les nitrate-réductases bactériennes VIII. Etude préliminaire de l'enzyme de Microccus halodenitricans. Arch. Mikrobiol., 76, 83-90 (1971)
- 103 PICHINOTY, F.: La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux. Bull. de L'Institut Pasteur, 71, 317-395 (1973)
- 104 POMILUIKO, V.P., OCHKIVSKAYA, M.V.: Comparative study of the nitrate reductase activity of Mycrocystis aeruginosa and Chlorella vulgaris under cultural conditions. Hidrobiol. Zh., 6, 98-101 (1970)
- 105 RAMIREZ, J.M., DeL CAMPO, F.F., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Ferredoxin-nitrite reductases from spinach. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 118, 58-71 (1966)
- 106 RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Specific protection against inhibitors of the NADH-nitrate reductase complex from spinach. FEBS-Letters, 17, 226-230 (1971)
- 107 RIGANO, C.: Studies on nitrate reductase from Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 76, 265-276 (1971)

- 108 RIGANO, C., VIOLANTE, V.: Effect of nitrate, ammonia and nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 90, 27-33 (1973)
- 109 RIGANO, C., ALLIOTA, G., VIOLANTE, V.: Presence of high levels of nitrate reductase activity in Cyanidium caldarium grown on glutamate as the sole nitrogen source. Plant Sci. Letters, 2, 277-281 (1974)
- 110 RILEY, P.S., WEAVER, R.E.: Observation of nitrate reduction in some non-saccharolytic strains of Acinetobacter. Appl. Microbiol., 28, 1071-1072 (1974)
- 111 RIVAS, J.: Caracterización del sistema reductor de nitrato de la estirpe M-14 del alga Chlorella fusca y de la levadura Torulopsis nitratophila. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, (1973)
- 112 RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Characterization of the nitrate reducing system of the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 1, 105-113 (1973)

- 113 RIVAS, J., TORTOLERO, M., PANEQUE, A.: Metal components of the nitrate-reducing system from the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 2, 283-288 (1974)
- 114 RIVAS, J., ROLDAN, J.M., VILLALOBO, A., LOSADA, M.: El sistema reductor del nitrato de Acinetobacter calcoaceticus XXXI Congreso Luso-español para el progreso de las ciencias. Resúmenes, p 123, Cádiz (1974)
- 115 ROLDAN, J.M., VILLALOBO, A., RIVAS, J.: Enzimas de la reducción asimilatoria del nitrato en la bacteria Acinetobacter calcoaceticus. XIII Reunión S.E.B. Resúmenes p 78, Madrid (1974)
- 116 ROSSO, J.P., FORGET, P., PICHINOTY, F.: Les nitrate-réductases bactériennes. Solubilization, purification et propriétés de l'enzyme A de Micrococcus halodenitrificans. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 321, 443-455 (1973)
- 117 SHANDON, Operating Instructions for Disc Electrophoresis Apparatus, Shandon Scientific Company Limited, London
- 118 SHIN, M., TAGAWA, K., ARNON, D.I.: Cristallization of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase from spinach leaves. Biochem. Z., 338, 84-87 (1963)

- 119 SILVER, W.S.: Pyridine nucleotide-nitrate reductase from Hansenula anomala, a nitrate reducing yeast. J. Bacteriol., 73, 241-246 (1957)
- 120 SNELL, F.D., SNELL, C.T.: Colorimetric methods of analysis p 804, New York. D. Van Nostrand Company, 1949
- 121 SOLOMONSON, L.P., VENNESLAND, B.: Properties of a nitrate reductase of Chlorella. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 267, 544-557 (1972)
- 122 SOLOMONSON, L.P., LORIMER, G.H., HALL, R.L., BORCHERS, R., BAILEY, J.L.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of Chlorella vulgaris. J. Biol. Chem., 250, 4120-4127 (1975)
- 123 STARK, G.R., SMYTH, D.G.: The use of cyanate for the determination of NH<sub>2</sub>terminal residues in proteins. J. Biol. Chem., 238, 214-226 (1963)
- 124 STARK, G.R.: On the reversible reaction of cyanate with sulfhydryl groups and the determination of NH<sub>2</sub>-terminal cysteine and cystine in proteins. J. Biol. Chem., 239, 1411-1414 (1964)



- 125 STARK, G.R.: Reaction of cyanate with functional groups of proteins. III. Reaction with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 4, 1030-1036 (1965)
- 126 SUBRAMANIAN, K.N., SORGER, G.J.: The role of molybdenum in the synthesis of Neurospora nitrate reductase. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 256, 533-543 (1972)
- 127 SUBRAMANIAN, K.N., SORGER, G.J.: The regulation of nitrate reductase in Neurospora crassa. *Biochem. J.*, 128, 23p (1972)
- 128 SUBRAMANIAN, K.N., SORGER, G.J.: Regulation of nitrate reductase in Neurospora crassa: stability in vivo. *J. Bacteriol.* 110, 538-546 (1972)
- 129 TAKAHASHI, H., NASON, A.: Tungstate as a competitive inhibitor of molybdate in nitrate assimilation and in  $N_2$  fixation by Azotobacter. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 23, 433-436 (1957)
- 130 TAKAHASHI, H., TANIGUCHI, S., EGAMI, F.: Inorganic nitrogen compounds: distribution and metabolism. En: Comparative Biochemistry. vol. 5, pp 91-202 eds: M. Florkin and H. S. Mason, Academic Press, New York, 1963

- 131 THAUER, R.K., JUNGERMANN, K., RUPPRECHT, E., DECKER, K.:  
Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of Clostridium kluveri. Acetyl-coenzyme-A requirement and ferredoxin dependence FEBS-Letters, 4, 108-112 (1969)
- 132 THAUER, R.K., RUPPRECHT, E., OHRLOFF, C., JUNGERMANN, K., DECKER, K.: Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-ferredoxin reductase system in Clostridium kluveri. J. Biol. Chem., 246, 954-959 (1971)
- 133 TORTOLERO, M., PANEQUE, A.: Reducción del nitrato por la nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum con NAD(P)H. XIII Reunión S.E.B. Resúmenes p Madrid (1974)
- 134 TORTOLERO, M.: Reducción enzimática de nitrato a nitrito en Azotobacter chroococcum dependiente de ferredoxina, Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1975)
- 135 TORTOLERO, M., VILA, R., PANEQUE, A.: Ferredoxin-dependent nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Plant. Sci. Letters, 5, 141-145 (1975)
- 136 VAN'T RIET, J., KNOOK, D.L. PLANTA, F.J.: The role of cytochrome b<sub>1</sub> in nitrate assimilation and nitrate respiration in Klebsiella aerogenes FEBS-Letters, 32, 44-46 (1972)

- 137 VAZQUEZ, D.: Inhibitors of protein synthesis . FEBS-Letters, 40, s63-s64 (1974)
- 138 VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J., PANEQUE, A., LO SADA, M.: Role of molibdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant Physiol., 48, 294-299 (1971)
- 139 VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J.: NADH-nitrate reductase de Chlorella: nouvelle contribution a l'étude de ses propriétés. Physiol. Veg., 10, 637-652 (1972)
- 140 VENNESLAND, B., JETSCHMANN, C.: The nitrate reductase of Chlorella pyrenoidosa. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 227, 554-564 (1971)
- 141 VERONESE, F.M., PISZKIEWICZ, SMITH, E.L.: Inactivation of bovine glutamate dehydrogenase by carbamyl-phosphate and cyanate. J. Biol. Chem., 247, 754-759 (1972)
- 142 VILLALOBO, A.: Contribución al estudio de la nitrato reductasa de la bacteria Acinetobacter calcoaceticus. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina, Sevilla (1974)

- 143 VILLALOBO, A., ROLDAN, J.M., HERRERA, J., RIVAS, J.: Nitrate reductase of Acinetobacter calcoaceticus: contribution to the study of some of its properties. VI Congreso S.E.B., Resúmenes, p 76, Sevilla (1975)
- 144 VILLALOBO, A., ROLDAN, J.M., RIVAS, J., CARDENAS, J.; Assimilatory nitrate reductase from Acinetobacter calcoaceticus. Arch. Microbiol. (en prensa)
- 145 WALLACE, W., NICHOLAS, D.J.D.: Properties of some reductase enzymes in the nitrifying bacteria and their relationship to the oxidase systems. Biochem. J., 109, 763-773 (1968)
- 146 WALLACE, W., NICHOLAS, D.J.D.: The biochemistry of nitrifying microorganisms. Biol. Rev., 44, 359-392 (1969)
- 147 WARBURG, O., CHRISTIAN, W.: Isolierung and Kristallisation des Gärferments enolase. Biochem. Z. 310, 384 (1941)
- 148 WHATLEY, F.R., ARNON, D.I.: Photosynthetic phosphorylation in plants. En: Methods Enzymol. Vol. 6, 308-313 (1963)
- 149 WRAY, J.L., FILNER, Ph.: Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. Biochem. J., 119, 715-725 (1970)

- 150 YOCH, D.C., BENEMAN, J.R., VALENTINE, R.C., ARNON, I.: The electron transport system in nitrogen fixation by Azotobacter. II. isolation and function of a new type of ferredoxin. Proc. Nat. Acad. Sci., 64, 1404-1410 (1969)
- 151 YOCH, D.C., ARNON, D.I.: Chromatium nitrogenase activity linked to photochemically generated assimilatory power. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 197, 180-183 (1970)
- 152 ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A., LOSADA, M.: Structural and functional role of FAD in the NADH-reducing system from Chlorella. FEBS-Letters, 9, 157-160 (1970)