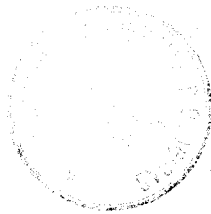


R.4506



INTERRELACIONES ENTRE LOS METABOLISMOS FOTOSINTETICOS
DE CARBONO Y NITROGENO EN LA CIANOBACTERIA Anacystis
nidulans

Trabajo presentado por el Licenciado José María Romero
Rodríguez para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas

Sevilla, Noviembre 1986

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. Miguel García Guerrero
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular

Dr. Catalina Lara Coronado
Profesora Titular de Bioquí-
mica y Biología Molecular

PONENTE

Dr. Miguel García Guerrero

TD
133



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Interrelaciones entre los metalchinos fotosintéticos de carbono y nitrógeno en la cianobacteria *Synechococcus undulatus* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

José M^c Romero Rodríguez


Firmado:

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "José M. Romero Rodríguez", written over a horizontal line.

Sevilla, a 8 de Mayo de 1995

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas...

La realización de este trabajo ha sido financiada en parte por ayudas de la Fundación Ramón Areces y de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Durante los años 1983 a 1986, el aspirante al grado de Doctor ha sido beneficiario de una Beca del Plan de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.



The image contains five handwritten signatures in black ink. The signatures are arranged in a loose, overlapping pattern. The top-left signature is a simple, stylized 'me'. The top-middle signature is a large, bold, sweeping stroke. The top-right signature is a cursive signature that appears to start with 'Julio'. The bottom-left signature is a cursive signature that appears to start with 'Jose'. The bottom-middle signature is a cursive signature that appears to start with 'Luis'.

A Kelen

A mis Padres

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Manuel Losada Villasante por su interés y estímulo en la realización de este trabajo, así como sus aportaciones a algunos de los aspectos tratados en esta Tesis. A los Dres. Catalina Lara Coronado y Miguel García Guerrero, directores de esta Tesis, agradezco profundamente la dedicación y el interés, así como su valiosa aportación de ideas y ayuda tanto científica como humana.

Agradezco a mis compañeros Tomás Coronil y Francisco Madueño la amistad y el ambiente humano con que me han rodeado. A Tomás Coronil le agradezco además su participación directa en la obtención de algunos de los resultados que se presentan en este trabajo. Asimismo, deseo agradecer a los Dres. Antonia Herrero y Enrique Flores su fundamental aportación al inicio de mi formación científica.

Al Dr. Manuel Mancha, del Instituto de la Grasa y sus Derivados, le agradezco las facilidades prestadas para la utilización de un contador de centelleo líquido.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a Javier Rodríguez, cuyo inestimable apoyo ha sido decisivo en la confección de esta Tesis. Finalmente, agradezco a Elisa, Mari Carmen y Kelen su desinteresada colaboración en la labor de mecanografía, así como a Consultores y Desarrollos Informáticos S.L. la generosa prestación de los medios informáticos empleados en el tratamiento del texto.

INDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.....	1
1. <u>INTRODUCCION</u>.....	3
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>.....	21
2.1. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	22
2.1.1. CULTIVO CON NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO... 22	22
2.1.2. PREPARACION DE CELULAS CON BAJOS NIVELES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA.....	23
2.1.3. RECOGIDA DE CELULAS.....	24
2.2. ENSAYO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.....	26
2.2.1. DETERMINACION DE ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS.... 26	26
2.2.1.1. Determinación del desprendimiento de oxígeno dependiente de CO ₂	26
2.2.1.2. Determinación del desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato.....	27
2.2.1.3. Determinación de la fijación fotosin- tética de CO ₂	28
2.2.1.4. Determinación del consumo de iones nitrogenados.....	29
2.2.1.5. Condiciones de iluminación.....	30
2.2.2. DETERMINACION DE TRANSPORTE DE NITRATO.....	30
2.2.3. ESTIMACION DE LA INCORPORACION DE ¹⁴ C A META- BOLITOS SOLUBLES EN ACIDO.....	32
2.2.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA.....	33

2.2.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AMINOACIDOS LIBRES.....	34
2.2.6. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES.....	35
2.3. METODOS ANALITICOS.....	36
2.3.1. DETERMINACION DE NITRATO.....	36
2.3.1.1. Análisis de nitrato en medios de ensayo.....	36
2.3.1.2. Análisis de nitrato intracelular.....	36
2.3.2. DETERMINACION DE NITRITO.....	41
2.3.3. DETERMINACION DE AMONIO.....	41
2.3.4. DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD.....	42
2.3.5. ANALISIS DE AMINOACIDOS POR CLAE DE FASE REVERSA.....	43
2.3.6. DETERMINACION DE CLOROFILA <i>a</i>	44
2.3.7. MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS.....	44
2.3.8. MEDIDA DE pH.....	45
2.3.9. MEDIDA DE ILUMINACION.....	45
2.3.10. MEDIDA DE FLUJO GASEOSO.....	45
2.4. REACTIVOS.....	46
3. <u>RESULTADOS</u>.....	47
3.1. INFLUENCIA DE LA ASIMILACION DE NITROGENO INORGANICO SOBRE LA ASIMILACION DE CARBONO.....	48

3.1.1. REPARTO DE PODER ASIMILATORIO ENTRE ASIMILACION DE NITRATO Y FIJACION FOTOSINTETICA DE CO ₂	48
3.1.2. REPARTO DE PODER ASIMILATORIO ENTRE ASIMILACION DE AMONIO Y FIJACION FOTOSINTETICA DE CO ₂	57
3.1.3. EFECTOS DE LA ENTRADA Y REDUCCION DE NITRATO Y DE LA ASIMILACION DE AMONIO SOBRE LA FIJACION DE CO ₂	62
3.2. INFLUENCIA DE LA FIJACION DE CO ₂ SOBRE LA UTILIZACION DE NITROGENO INORGANICO.....	68
3.2.1. REQUERIMIENTOS CARBONADOS DE LA ASIMILACION DE NITROGENO INORGANICO	68
3.2.2. DEPENDENCIA DE LA UTILIZACION DE NITRATO POR FIJACION ACTIVA DE CO ₂	78
3.2.3. ANTAGONISMO ENTRE LA ASIMILACION DE AMONIO Y LA DE CO ₂ EN LA REGULACION DE LA UTILIZACION DE NITRATO	93
3.3. TRANSPORTE DE NITRATO. IMPLICACION EN EL CONTROL DE LA UTILIZACION DEL ION	107
3.3.1. ACUMULACION INTRACELULAR DE NITRATO.....	107
3.3.2. REGULACION DEL TRANSPORTE DE NITRATO POR AMONIO Y CO ₂	112
4. <u>DISCUSION</u>	117

5. CONCLUSIONES..... 128

6. BIBLIOGRAFIA..... 131

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADP	adenosín 5'-difosfato
ATP	adenosín 5'-trifosfato
β	valor crítico del coeficiente de correlación
CABP	2-carboxiarabinitol-1,5-bisfosfato
c1	clorofila a
CLAE	cromatografía líquida de alta eficacia
DCCI	diciclohexilcarbodiimida
DLG	D,L-gliceraldehido
ΔG	cambio de energía libre
$\Delta \bar{\mu}$	diferencia de potencial electroquímico
$\Delta \psi$	potencial de membrana
E	einstein
$E_{\text{cm}}^{\text{mg/ml}}$	coeficiente de extinción mg/ml para un paso de luz de 1cm
F	constante de Faraday
FCCP	trifluorometoxicarbonilcianuro fenilhidrazona
g	aceleración de la gravedad
GOGAT	glutamato sintasa
GS	glutamina sintetasa
HYL	5-hidroxisisina
Ks	constante de disociación
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, forma reducida

OFA	o-ftaldialdehido
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
r	coeficiente de correlación
R	constante de los gases
T	temperatura absoluta
tampón de ensayo	Tricina NaOH/KOH, pH 8,3
Tricina	(N-2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)-etil glicina)
U	unidad de actividad enzimática
v/v	volumen/volumen
z	carga de un ión

1. INTRODUCCION

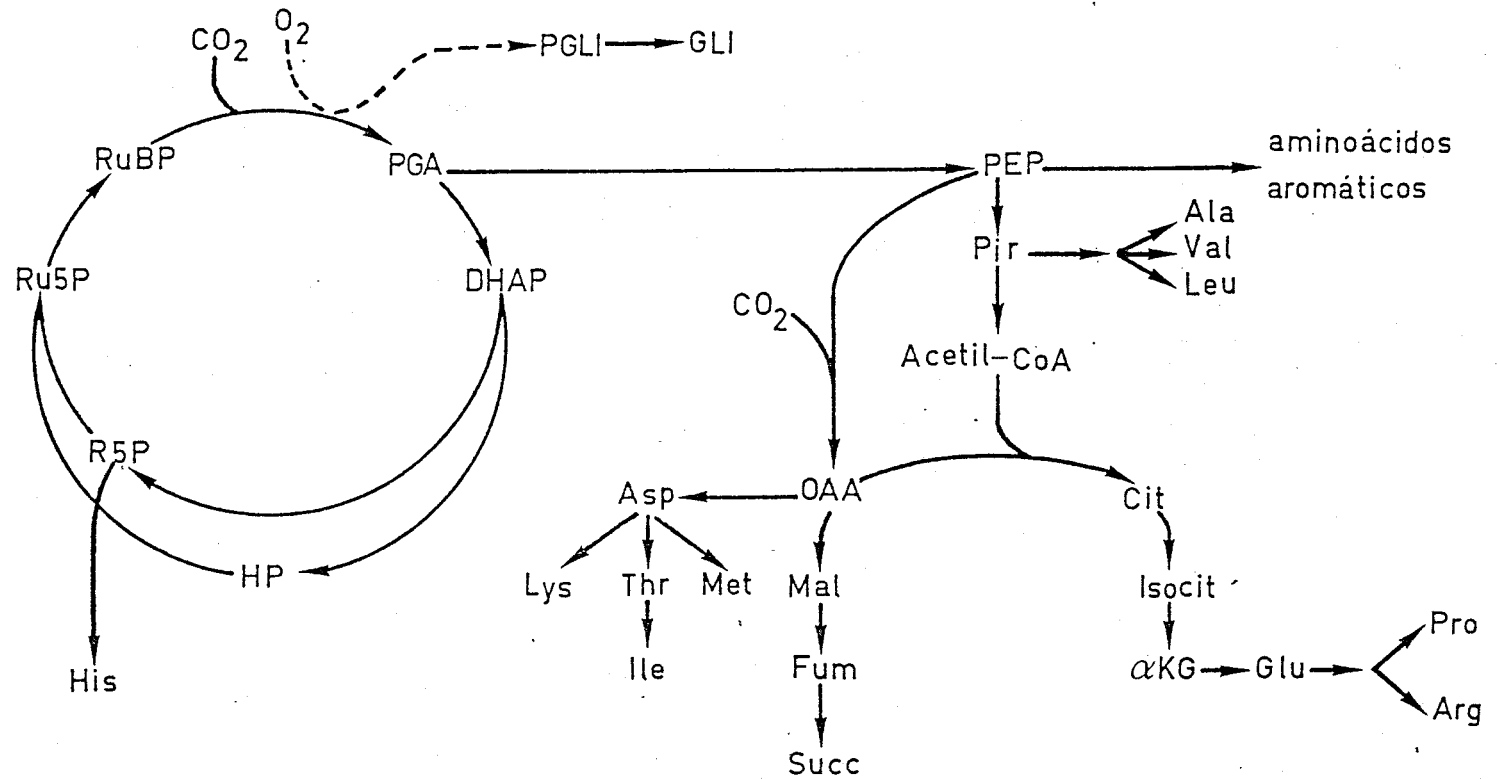
Uno de los aspectos menos conocidos del metabolismo fotosintético es el de las interacciones existentes entre la asimilación del nitrógeno y la del carbono (Guerrero y Lara, 1986). Sin embargo, parece evidente la existencia de una estrecha relación entre estos procesos que asegure la equilibrada asimilación de ambos elementos. En este trabajo se han considerado las interrelaciones existentes entre el metabolismo fotosintético del nitrógeno y del carbono desde dos puntos de vista, a saber: 1) la incidencia de la asimilación de nitrógeno inorgánico sobre la fijación de CO_2 ; y 2) la dependencia de la asimilación de nitrógeno por la fijación de CO_2 . Por un lado, se ha estudiado el reparto entre ambos procesos del poder asimilatorio generado fotosintéticamente, así como las variaciones en el flujo del carbono recién fijado inducidas por la asimilación simultánea de nitrógeno. Por otra parte, se ha investigado el requerimiento carbonado para la asimilación de nitrógeno inorgánico, habiéndose caracterizado en el caso del nitrato como una manifestación de la regulación a que se encuentra sometida la utilización del ión, identificándose el punto de acción del sistema de control implicado.

El material biológico elegido como sistema modelo para efectuar estos estudios ha sido el alga verde-azulada (cianobacteria) unicelular Anacystis nidulans. Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos que se caracterizan especialmente por poseer un aparato fotosintético, similar al de los cloroplastos de eucariotas, capaz de utilizar agua como donador de electrones y realizar, por tanto, fotosíntesis oxigénica (Wolk, 1973;1981; Stanier y Cohen-Bazire,

1977; Fay, 1983). El poder asimilatorio (poder reductor y ATP) generado a expensas de la energía de la luz se utiliza en la asimilación fotosintética especies inorgánicas oxidadas de carbono, nitrógeno y azufre.

La asimilación fotosintética del dióxido de carbono en cianobacterias ocurre, al igual que en cloroplastos, a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin (Pelroy y Bassham, 1972; Wolk, 1973; Jansz y MacLean, 1973; Ihlenfeldt y Gibson, 1975), existiendo en determinadas condiciones una contribución de la fosfoenol piruvato carboxilasa, enzima que cataliza la carboxilación del fosfoenol piruvato a oxaloacetato (Jansz y MacLean, 1973; Colman et al., 1976; Döhler, 1976; 1982). Aunque las cianobacterias poseen los enzimas glucolíticos y la mayoría de los del ciclo de Krebs, con las significativas excepciones de α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa (Smith et al., 1967; Smith, 1973), parece que estas rutas no operan con caracter catabólico, sino que desempeñan funciones biosintéticas, dando lugar a la síntesis de ácidos orgánicos precursores de aminoácidos. Las cianobacterias también fotorrespiran (Lex et al., 1972), aunque los detalles de la correspondiente ruta no se conocen en su totalidad (van Liere y Walsby, 1982; Döhler, 1982). El esquema I muestra el funcionamiento de las rutas implicadas en la asimilación de CO_2 en cianobacterias.

Las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas por las cianobacterias son el nitrato y el amonio y, en algunas estirpes, el nitrógeno molecular. Cuando el nitrógeno disponible se encuentra como nitrato o dinitrógeno, éste es



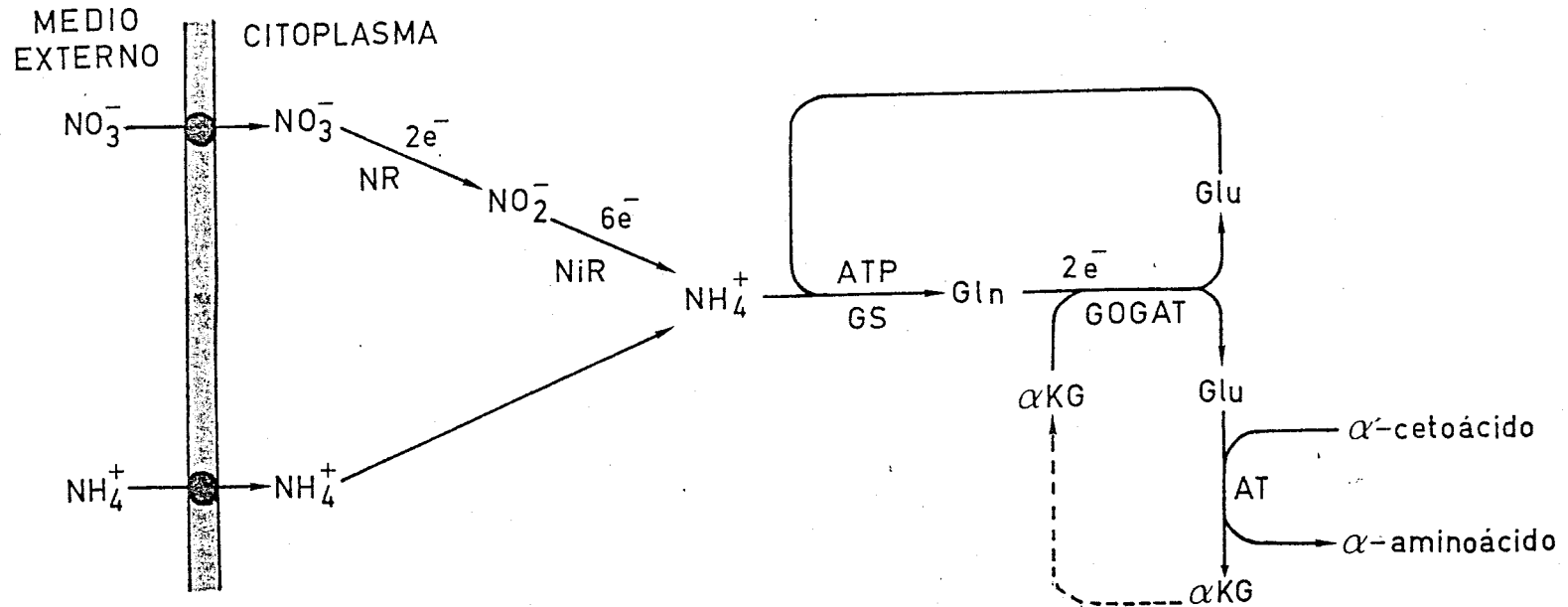
Esquema I. Principales rutas implicadas en la asimilación de CO₂ y vías de síntesis de aminoácidos en cianobacterias

El rayado corresponde a la ruta fotorrespiratoria.

Abreviaturas: PGA, 3-fosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; HP, hexosas-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfato; PGLI, fosfoglicolato; GLI, glicolato; PEP, fosfoenol piruvato; Pir, piruvato; CIT, citrato; Isocit, isocitrato; α-KG, α-cetoglutarato; OAA, oxaloacetato; Mal, malato; Fum, fumararato; Succ, succinato.

reducido intracelularmente hasta el término de amonio. En todos los casos, el amonio, tomado como tal o procedente de la reducción de nitrato o dinitrógeno, se incorpora a esqueletos carbonados a través del ciclo glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Wolk, 1981; Guerrero et al., 1981; Flores et al., 1983b; Guerrero y Lara, 1986). La asimilación de nitrato, que es el proceso cuantitativamente más importante en lo que se refiere a la conversión de nitrógeno inorgánico en orgánico, consta en cianobacterias de tres pasos fundamentales (Esquema II): 1) entrada del nitrato en la célula; 2) reducción del mismo hasta amonio; y 3) incorporación del amonio en esqueletos carbonados.

Poco se conoce sobre la entrada del nitrato en cianobacterias (Gibson, 1984; Guerrero y Lara, 1986), aunque, en base a observaciones indirectas, se ha propuesto la participación de un sistema de transporte activo de nitrato (Ohmori et al., 1977; Zevenboom et al., 1980; Rai et al., 1981; Flores et al., 1983a). La entrada del nitrato al interior celular es un proceso muy desfavorecido si se considera la naturaleza aniónica del nitrato y el hecho de que, al igual que en otros organismos, las cianobacterias generan un potencial de membrana negativo en el interior respecto al exterior celular (Paschinger, 1977; Zdrou y Tromballa, 1981; Peschek et al., 1985). Sin embargo, aún a las bajas concentraciones a las que el nitrato se encuentra presente en medios naturales, generalmente muy inferiores a 1 mM, la utilización de nitrato en cianobacterias transcurre a notable velocidad, habiéndose determinado valores de K_s inferiores a



Esquema II. Rutas de utilización de nitrato y amonio en cianobacterias

Abreviaturas: NR, ferredoxina-nitrato reductasa; NiR, ferredoxina-nitrito reductasa; GOGAT, glutamato sintasa; GS, glutamina sintasa; AT, aminotrasferasas; α -KG, α -cetoglutarato.

30 μM (Zevenboom et al., 1980; Flores et al., 1983a; Meeks et al., 1983; Tischner y Schmidt, 1984). A pesar de que la existencia de un sistema de transporte de nitrato en cianobacterias parece necesaria, no existe prácticamente ninguna evidencia experimental al respecto. Esta falta de datos se debe principalmente a dos factores: 1) la carencia en las cianobacterias de vacuolas de acumulación, lo que hace que el nitrato, una vez dentro de la célula, sea rápidamente metabolizado; y 2) la falta de técnicas lo suficientemente sensibles para la cuantificación de bajas concentraciones de nitrato. Sin embargo, se ha descrito la participación de sistemas de transporte activo de nitrato en otros organismos, tales como diatomeas (Eppley y Rogers, 1970; Cresswell y Syrett, 1979), plantas superiores (Deane-Drumond y Glass, 1983), algas acidófilas (Fuggi, 1985) y bacterias (Betlach et al., 1981; Thayer y Huffaker, 1982).

Hasta el momento, los intentos encaminados a estimar la acumulación intracelular de nitrato en cianobacterias parecen haber fracasado. Incluso la utilización de técnicas extremadamente sensibles como el uso de $^{13}\text{N-NO}_3^-$ y análisis por CLAE de lisados celulares (Thayer y Huffaker, 1980) se han mostrado ineficaces con distintas especies de Anabaena (Meeks et al., 1983). Sin embargo, se ha observado que el consumo de nitrato es sensible al desacoplante CCCP y al inhibidor de ATPasas DCCD en distintas especies de cianobacterias (Ohmori et al., 1977; Rai et al., 1981; Flores et al., 1983a), habiéndose sugerido que la entrada de nitrato es el proceso sensible a estos tratamientos.

Una vez el nitrato se encuentra dentro de la célula, es reducido hasta amonio mediante un proceso que requiere 8 electrones y la participación de dos enzimas, la ferredoxina-nitrato reductasa y la ferredoxina-nitrito reductasa, que catalizan, respectivamente, la reducción de nitrato a nitrito y la reducción de nitrito hasta amonio (Vennesland y Guerrero, 1979; Guerrero et al., 1981; Losada et al., 1981; Flores et al., 1983b). Estudios sobre la reducción de nitrato llevados a cabo con membranas fotosintéticas (Candau et al., 1976; Ortega et al., 1976), y con células tratadas con MSX en ausencia de CO_2 (Flores et al., 1983a,b), indican que el nitrato y el nitrito actúan como reactivos de Hill, habiéndose obtenido estequiometrías de 2 y 1,5 moles de oxígeno desprendidos por mol de nitrato o nitrito reducido, respectivamente. También se ha observado que en células permeabilizadas, el nitrato y el nitrito amortiguan la fluorescencia de la clorofila, lo que indica que puedan actuar como aceptores de electrones del aparato fotosintético (Serrano et al., 1981; 1982). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la naturaleza fotosintética del proceso de utilización de nitrato en condiciones fisiológicas por cianobacterias totalmente funcionales.

La asimilación de amonio extracelular consta solamente de dos pasos: 1) entrada del amonio al interior celular; y 2) incorporación del amonio en esqueletos carbonados. La entrada de amonio en cianobacterias está mediada por un sistema de transporte activo, habiéndose encontrado que células de Anacystis R2 acumulan amonio en su interior a concentraciones 1000 veces superiores a las del medio externo

(Boussiba et al., 1984a).

El amonio, tomado exógenamente o producido en la reducción del nitrato, se asimila mediante su incorporación a esqueletos carbonados. Como se ha mencionado anteriormente, en cianobacterias se ha demostrado la participación del ciclo GS/GOGAT en la asimilación de amonio (Haystead et al., 1973; Stewart y Rowell, 1975; Stewart et al., 1975; Thomas et al., 1975; 1977; Wolk et al., 1976; Meeks et al., 1977; 1978; 1985; Flores et al., 1980; 1983 a, b; Stewart, 1980a,b; Wolk, 1980; Meeks, 1981; Lea et al., 1982; 1984; Ramos et al., 1982; Bergmann, 1984). Mediante la glutamina sintetasa, el amonio es incorporado en la posición amido de la glutamina, desde donde se transfiere a la posición α del α -cetoglutarato, con la participación de la glutamato sintasa, para formar glutamato. La formación neta de una molécula de glutamato requiere el gasto de dos equivalentes de reducción y una molécula de ATP (ver esquema II). La glutamina y, sobre todo, el glutamato actúan como distribuidores de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados mediante reacciones de transamidación y transaminación, respectivamente. En general, todos los grupos α -amino de los aminoácidos van a proceder del glutamato, mientras que otros átomos de nitrógeno presentes en aminoácidos tales como la arginina, histidina o triptófano, van a proceder del grupo amido de la glutamina.

En resumen, a partir de CO_2 , nitrato (amonio o di-nitrógeno) y agua, y a expensas de la energía de la luz, las cianobacterias son capaces de sintetizar los compuestos orgá-

nicos nitrogenados necesarios para su crecimiento.

Puesto que tanto la asimilación de carbono como la de nitrógeno son procesos fotosintéticos, se ha planteado desde hace tiempo la posibilidad de que exista una competencia entre ambos procesos por el poder asimilatorio generado fotosintéticamente. Así, mientras que la reducción de un átomo de N del nitrato a N-orgánico requiere 10 electrones, la reducción de una molécula de CO_2 hasta el nivel de carbohidratos sólo requiere 4 y, al ser la razón C/N en cianobacterias de 5, el requerimiento por poder reductor para la asimilación de carbono es sólo el doble que el de la asimilación de nitrógeno (Losada, 1980; Flores et al., 1983b; Guerrero y Lara, 1986). Estas consideraciones subrayan el importante consumo de poder reductor por parte de la asimilación de nitrato, sugiriendo la posibilidad de que exista competencia por poder asimilatorio generado fotosintéticamente entre este proceso y el de la fijación de CO_2 . No obstante, se observa contradicción entre los resultados obtenidos al intentar verificar la existencia de dicha competencia con distintos organismos fotosintéticos, que incluyen plantas superiores y algas eucarióticas. En plantas superiores, algunos autores han descrito competencia por poder asimilatorio entre la fijación de CO_2 y la asimilación de nitrógeno inorgánico (Anderson y Done, 1978; Feirson, 1985), mientras que otros autores proponen la inexistencia de tal competencia (Grant y Canvin; 1970; Rathnam, 1978; Robinson y Baysdorfer, 1985). En algas verdes, la situación es similar, habiéndose mostrado que, a saturación de luz y de sustratos, la velocidad de desprendimiento de oxígeno por células de Chlorella se incre-

menta tras la adición de nitrato, no alterandose la velocidad de fijación de CO_2 (Van Niel, 1953). Estos resultados, confirmados asimismo en Scenedesmus (Larsson et al., 1982), demuestran claramente el carácter fotosintético de la asimilación de nitrato, y la inexistencia de competencia por poder asimilatorio con la fijación de CO_2 a alta intensidad luminosa. Sin embargo, otros autores no han obtenido resultados comparables para otras especies de algas (Bongers, 1958; Grant y Turner, 1969; Thomas et al., 1976), donde la adición de nitrato inhibe generalmente la fijación de CO_2 , lo que se ha interpretado como manifestación de la competencia antes aludida. Parece, sin embargo, claro que dicha competencia por poder asimilatorio debe existir en condiciones de limitación de luz cuando el aparato fotosintético no funciona a máxima capacidad, tal como se ha demostrado en protoplastos de espinacas (Rathnam, 1978) y en células intactas de Scenedesmus (Larsson et al., 1985). En el caso de cianobacterias se dispone de escasos datos al respecto (Guerrero y Lara, 1986).

La asimilación de amonio muestra un comportamiento diferente a la utilización de nitrato con respecto a la fijación de CO_2 . Con la excepción del alga verde Scenedesmus (Larsson et al., 1985), el amonio estimula la fijación de CO_2 en diferentes organismos independientemente de la intensidad luminosa. Este efecto estimulador de la fijación de CO_2 se ha descrito para la cianobacteria Anabaena cylindrica (Lawrie et al., 1976; Ohmori, 1981), así como para algas verdes y células aisladas de plantas superiores (Kanazawa et al., 1972; Rehfield y Jensen, 1973; Woo y Calvin, 1980; Bassham et al.,

1981). Algunos autores han sugerido que la estimulación por amonio de la fijación de CO_2 podría deberse a una activación de la fosfoenol piruvato carboxilasa (Kanazawa et al., 1972; Platt et al., 1977; Paul et al., 1978), mientras que otros proponen una estimulación del ciclo reductivo de las pentosas fosfato, como consecuencia de una alcalinización del estroma del cloroplasto inducida por el amonio (Tillberg et al., 1977). La asimilación de amonio induce, respecto a células asimilando nitrato, cambios en la distribución del carbono recién fijado, tanto en algas verdes (Kanazawa et al., 1972; Platt et al., 1977; Paul et al., 1978; Woo et al., 1980), como en cianobacterias (Lawrie et al., 1976, Coronil, 1985).

Además de las interacciones entre la asimilación del carbono y del nitrógeno anteriormente reseñadas, en la asimilación de cualquier forma de nitrógeno inorgánico se presenta un obligado requerimiento metabólico por productos de la fijación de CO_2 a nivel del ciclo GS/GOGAT. Este requerimiento se manifiesta como una dependencia de la utilización de amonio por CO_2 (Boussiba et al., 1984). La utilización de nitrato en algas verdes y cianobacterias es, asimismo, estrictamente dependiente de la disponibilidad de CO_2 en el medio (Warburg y Negelein, 1920; Hattori, 1962; Eisele y Ullrich, 1977; Losada et al., 1981; Flores et al., 1983b,c). La dependencia de la utilización de nitrato por CO_2 es tanto metabólica como reguladora. Así, en células de Anacystis nidulans se ha encontrado una estrecha correlación entre la tasa de asimilación de nitrato y la disponibilidad de CO_2 , de manera que la concentración de CO_2 que permite una velocidad semimáxima de utilización de nitrato ($3,7 \mu\text{M}$) es muy similar

a la Km para el CO₂ del desprendimiento de oxígeno dependiente de CO₂ (4 µM) (Flores et al., 1983c).

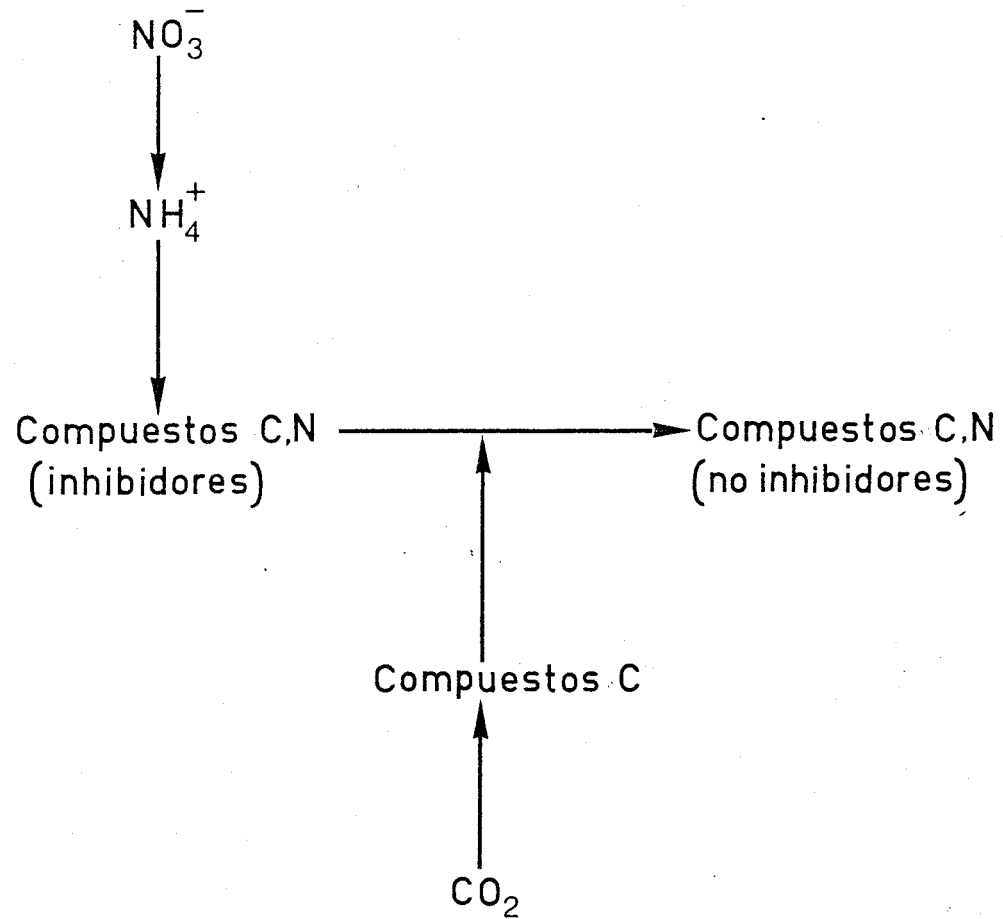
Esta dependencia por CO₂ es un efecto relacionado con la razón C/N que presentan las células, ya que células deficientes en nitrógeno (con una razón C/N incrementada), tanto de algas eucarióticas como de cianobacterias, son capaces de utilizar nitrato en ausencia de CO₂ (Stevens y Van Baalen, 1973; Syrett, 1982; Flores et al., 1983c). Aparentemente, los carbohidratos acumulados durante el período de deficiencia en N, sustituyen a los compuestos derivados de la fijación de CO₂ en su efecto positivo sobre la utilización de nitrato. Indicaciones sobre la naturaleza del requerimiento por CO₂ de la asimilación de nitrato se han obtenido en células de A. nidulans estudiando el efecto de la MSX sobre la dependencia por CO₂ de la utilización de nitrato. Así, en células tratadas con MSX la utilización de nitrato se hace independiente de la disponibilidad de CO₂. Así, en ausencia total de CO₂ tales células consumen nitrato, que es reducido hasta amonio y excretado al medio (Flores et al., 1983a,b,c). Este comportamiento relaciona el requerimiento por CO₂ de la asimilación de nitrato con la inhibición a corto plazo que ejerce el amonio sobre el proceso. Tanto en algas eucarióticas como en cianobacterias, se ha observado que, cuando células asimilando activamente nitrato se suplementan con amonio, la utilización de nitrato se ve rápida y severamente dificultada. Al igual que ocurre en algas verdes (Cramer y Myers, 1949; Syrett y Morris, 1963; Thacker y Syrett, 1972; Syrett y Leftley, 1976; Pistorius et al., 1978; Tischner y Lorenzen, 1979), esta inhibición es reversible en el caso de

las cianobacterias, de forma que, una vez que el amonio se agota del medio, el nitrato vuelve a ser utilizado a las mismas velocidades mostradas antes de la adición de amonio (Ohmori et al., 1977; Flores et al., 1980, 1983b). Este efecto a corto plazo del amonio sobre la utilización de nitrato se encuentra mediado por productos de su asimilación por el ciclo GS/GOGAT. Así, el tratamiento con inhibidores de la asimilación de amonio, tales como la L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX) y la 5-hidroxisilisina (HYL), que inhiben la GS, y la azaserina, que inhibe la GOGAT y otras glutamina-amido transferasas, previene a la utilización de nitrato de la inhibición por amonio (Flores et al., 1980; 1983b; Flores, 1982). Por otro lado, la inhibición por amonio de la utilización de nitrato no afecta a corto plazo a la nitrato reductasa, por lo que se ha propuesto que el efecto se ejerce a nivel de la entrada de nitrato, tanto para cianobacterias (Ohmori et al., 1977; Flores et al., 1980; 1983b) como para algas eucariotas (Guerrero et al., 1981; Syrett, 1981; Ullrich, 1983), habiéndose demostrado para el caso de la diatomea Phaeodactylum tricornutum un efecto negativo del amonio sobre la acumulación intracelular de nitrato (Cresswell y Syrett, 1979).

Puesto que la inhibición de la asimilación de amonio elimina tanto el efecto negativo del amonio como la dependencia por CO_2 de la utilización de nitrato, se ha sugerido que existe una relación entre estos dos efectos. De hecho, se ha propuesto que el CO_2 actúa como un antagonista del amonio en su efecto sobre la asimilación de nitrato. Cuando células de A. nidulans expuestas a amonio en ausencia de CO_2

se tratan con MSX, éstas recuperan inmediatamente la capacidad de utilizar nitrato en el caso de que se les suministre CO₂, mientras que la recuperación de dicha capacidad en ausencia de CO₂ requiere al menos 40 min (Flores et al., 1983c). En base a estos resultados se ha desarrollado un modelo para la regulación de la utilización de nitrato, que implica la participación concertada de productos de la asimilación de amonio y de la fijación de CO₂ en el control del proceso (Flores et al., 1983b,c). De acuerdo con este modelo, la utilización de nitrato estaría afectada negativamente por productos de la asimilación de nitrato vía amonio. La concentración intracelular de estos compuestos inhibidores estaría determinada, de un lado, por el aporte de amonio a partir del cual se formarían, y de otro, por el aporte de productos de la fijación de CO₂, los cuales se combinarían con los derivados de amonio para originar compuestos C-N no inhibidores (Esquema III). La operación de tal sistema de regulación permitiría una modulación efectiva de la utilización de nitrato, no sólo por productos de su propia asimilación, sino también de acuerdo con la disponibilidad de compuestos carbonados (Flores et al., 1983b,c).

En este trabajo se presentan una serie de experiencias encaminadas a profundizar en el conocimiento de las interrelaciones entre el metabolismo fotosintético del carbono y del nitrógeno en la cianobacteria Anacystis nidulans. En primer lugar, se ha puesto de manifiesto la naturaleza fotosintética de la asimilación de nitrato en condiciones fisiológicas. Asimismo, se han determinado las bases del reparto entre la asimilación de nitrógeno y la fijación de CO₂ del



Esquema III. Modelo propuesto para la participación del amonio y del CO_2 en el establecimiento de los niveles intracelulares de metabolitos inhibidores de la utilización de nitrato

poder asimilatorio generado fotosintéticamente, caracterizándose los efectos que la asimilación de nitrógeno induce sobre la fijación global de CO_2 y sobre el flujo del carbono recién fijado. En segundo lugar, se ha caracterizado la naturaleza del requerimiento por CO_2 de la utilización de nitrato, así como el papel antagónico de CO_2 y amonio en el sistema de regulación que controla la utilización de nitrato. Finalmente, se ha puesto de manifiesto la existencia de un sistema de transporte de nitrato de naturaleza endergónica en células de A. nidulans, mostrándose que el transporte de nitrato es el punto donde se ejerce el control por amonio y CO_2 del proceso global de asimilación de nitrato.

Parte de este trabajo se ha presentado a distintas Reuniones y Congresos, y ha dado lugar a las publicaciones que a continuación se relacionan:

- Lara C, Romero JM, Flores E, Guerrero MG y Losada M (1984) En "Advances in Photosynthesis Research" (C. Sybesma, ed.) Vol. 2, pp. 715-718. Martinus Nijhoff/Dr. Junk, The Hague.
- Romero JM, Lara C y Guerrero MG (1985) Arch. Biochem. Biophys. **237**:396-401.
- Lara C y Romero JM (1986) Plant Physiol. **81**:686-688.
- Romero JM y Lara C (1986) Plant Physiol. En prensa.
- Lara C, Romero JM, Coronil T y Guerrero MG (1986) En "Inorganic Nitrogen Metabolism" (WR. Ullrich, ed.), Springer, Berlin. En prensa.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ORGANISMO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El organismo utilizado para la realización de este trabajo ha sido la cianobacteria Anacystis nidulans, estirpe 1042-1, recientemente reclasificada como Synechococcus leopoliensis (Schlösser, 1982), procedente de la Colección de Cultivo de Algas de la Universidad de Göttingen (R.F.A.).

2.1.1. CULTIVO CON NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO

A. nidulans se cultivaba fotoautotróficamente en condiciones asépticas en un medio sintético que contenía, en un litro de agua destilada, los siguientes nutrientes: KNO_3 , 20 mmol; MgSO_4 , 0,5 mmol; CaCl_2 , 0,1 mmol; NaCl , 2 mmol; Na_2MoO_4 , 4 μmol ; K_2HPO_4 , 12 mmol; NaHCO_3 , 10 mmol; 1 ml de una disolución de FeSO_4 0,5 M y EDTA 0,5 M, preparada según Arnon et al. (1974); y 1 ml de una disolución de micronutrientes que contenía por litro de agua destilada: H_3BO_3 , 46 mmol; MnCl_2 9 mmol; ZnSO_4 , 0,77 mmol; CuSO_4 , 0,32 mmol. El medio de cultivo conteniendo todos sus componentes, excepto fosfato y bicarbonato, se esterilizaba en autoclave, durante 20 min a 2 atm de presión (121 °C). La disolución conteniendo fosfato y bicarbonato se esterilizaba por separado en las mismas condiciones y, una vez enfriada a temperatura ambiente, se añadía al resto del medio de cultivo.

Un volumen de 35 ml de este medio, contenido en un tubo de 23 mm de diámetro por 200 mm de largo tapado con algodón graso, se inoculaba en condiciones asépticas con una

cantidad de células conteniendo aproximadamente 10-15 $\mu\text{g cl}$. La suspensión celular se incubaba en un baño termostatzado a 40 °C, con iluminación continua proporcionada por lámparas fluorescentes ($160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa, 400-700 nm) y burbujeo con una mezcla gaseosa estéril de aire:CO₂ (95:5, v/v), que proporcionaba al cultivo agitación y la fuente de carbono. En estas condiciones, el tiempo de generación era de unas 4 h. Todos los experimentos presentados en este trabajo se han realizado con células cultivadas en las condiciones anteriormente descritas, excepto la serie de experimentos presentados en el apartado 3.3., en los que las células se cultivaban en las condiciones descritas en el apartado 2.1.2.

2.1.2. PREPARACION DE CELULAS CON BAJOS NIVELES DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA

La obtención de células de A. nidulans con bajos niveles de actividad nitrato reductasa se realizaba en condiciones asépticas según el procedimiento de Herrero y Guerrero (1986), partiendo de cultivos crecidos en medio con amonio carente de molibdeno. Este medio es básicamente igual al descrito en el apartado 2.1.1., excepto que el nitrato se sustituye por amonio (20 mM, concentración final) y no se suplementa con Na₂MoO₄.

Una cantidad de células equivalente a 5-10 $\mu\text{g cl}$, cultivadas en medio de amonio carente de molibdeno, se transfería a medio de nitrato en el que el Na₂MoO₄ se había susti-

tuido por Na_2WO_4 (10 mM, concentración final). Tras 8 h de incubación en condiciones standard de cultivo, se suplementaba la suspensión celular con amonio (20 mM, concentración final). Este cultivo se dejaba crecer durante 40-45 h, y, una vez transcurrido dicho período de tiempo, las células se recogían por filtración (ver apartado 2.1.3.), y se lavaban con medio de cultivo carente de nitrógeno y molibdeno y suplementado con Na_2WO_4 10 mM. Las células así lavadas se resuspendían en medio de nitrato carente de molibdeno y suplementado con volframio, y se incubaban en condiciones de cultivo durante 3 h, transcurridas las cuales, se volvían a recoger y lavar, para finalmente ser incubadas durante 1 h en medio carente de nitrógeno y molibdeno y suplementado con volframio. Tras este tratamiento, las suspensiones celulares alcanzaban densidades celulares equivalentes a 40-45 $\mu\text{g cl ml}^{-1}$, mostrando las células muy bajos niveles de actividad nitrato reductasa.

2.1.3. RECOGIDA DE CELULAS

Para los experimentos descritos en este trabajo, excepto para los presentados en el apartado 3.3., se utilizaron células de cultivos en fase exponencial tardía, (24-36 h de crecimiento), que contenían alrededor de 20-25 $\mu\text{g cl}$ por ml de medio. Las células se recogían por centrifugación a baja velocidad (1.500-2.000xg durante 5-10 min) a temperatura ambiente, o por filtración asistida por vacío empleando filtros Millipore tipo HA de 0,45 μm de diámetro de poro. En todos los casos las células se lavaban con tampón Tricina

NaOH/KOH pH 8,3 (al que en adelante denominaremos tampón de ensayo), 25 mM, en el que se resuspendían finalmente.

2.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

2.2.1. DETERMINACION DE ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS

Se han determinado actividades fotosintéticas en células intactas de A. nidulans utilizando CO_2 y nitrato como aceptores de electrones.

2.2.1.1. Determinación del desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2

El desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 , que refleja el flujo fotosintético de electrones desde el agua al CO_2 , se ha determinado mediante técnicas polarográficas y manométricas.

Las determinaciones polarográficas de producción de oxígeno dependiente de CO_2 se llevaron a cabo en un electrodo de oxígeno Hansatech DW (Delieu y Walker, 1972). Los ensayos se realizaron a 40 °C, con agitación e iluminación continuas. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: NaHCO_3 , 10 μmol ; tampón de ensayo, 25 μmol ; y una cantidad de células equivalente a 10 μg cl. Tras 3 min de incubación en la oscuridad para equilibrar la temperatura, seguido de 1-2 min en la luz, se iniciaba la reacción añadiendo el NaHCO_3 .

Las determinaciones manométricas de desprendimiento

de O_2 dependiente de CO_2 se realizaban en vasijas de Warburg calibradas, con un volumen aproximado de 14 a 15 ml, acopladas a sus correspondientes manómetros. En el compartimento principal se disponía la suspensión celular, que contenía, en un volumen final de 2,75 ml: tampón de ensayo, 68,75 μ mol; y una cantidad de células equivalente a 27,5 μ g cl. En el pocillo central se disponía un papel de filtro (1 cm de ancho por 10 de largo) plegado e impregnado con 0,25 ml de tampón $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0,5 M, pH 9,6. Este tampón determina una concentración de CO_2 disuelto en la suspensión celular de 0,2 mM (Guerrero et al., 1.974). Los ensayos se llevaban a cabo a 40 °C con agitación continua. Tras 5-10 min de incubación en la oscuridad con los manómetros cerrados a fin de equilibrar la temperatura y la tensión de CO_2 , se iniciaba la determinación encendiendo la luz.

2.2.1.2. Determinación del desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato

El desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato, que refleja el flujo fotosintético de electrones desde el agua al nitrato, se ha determinado mediante técnicas polarográficas y manométricas, en condiciones de fijación simultánea de CO_2 .

Las determinaciones polarográficas de desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato se llevaban a cabo en un electrodo de oxígeno, como se describe en el apartado anterior. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final

de 1 ml: KNO_3 , 0,25 μmol ; NaHCO_3 , 10 μmol ; tampón de ensayo, 25 μmol ; y una cantidad de células equivalente a 10 $\mu\text{g cl}$. La reacción se iniciaba tras 3 minutos de incubación en la oscuridad para equilibrar la temperatura, encendiendo la luz y añadiendo NaHCO_3 . Una vez alcanzada una velocidad constante de desprendimiento de oxígeno dependiente de NaHCO_3 (2-3 min de reacción) se añadía el KNO_3 . Se considera desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato al incremento en la producción de oxígeno registrado tras la adición de nitrato.

Las determinaciones manométricas se llevaban a cabo en vasijas de Warburg calibradas, en las condiciones descritas en el apartado anterior, suplementando la suspensión celular con 0,7 μmol de KNO_3 .

2.2.1.3. Determinación de la fijación fotosintética de CO_2

La fijación fotosintética de CO_2 por células de A. nidulans se determinó midiendo la incorporación de ^{14}C suministrado como [^{14}C]bicarbonato a compuestos orgánicos estables en ácido.

Los experimentos se llevaron a cabo, a 40 °C, en tubos de ensayo abiertos, con agitación e iluminación continuas. El medio de ensayo contenía en un volumen de 1ml: tampón de ensayo 25 μmol ; [^{14}C] NaHCO_3 , 10 μmol (actividad específica 4 ó 8 Ci mol^{-1}); una cantidad de células equivalente a 10 $\mu\text{g cl}$; y, en su caso, 0,25 μmol de KNO_3 .

ó NH_4Cl . La reacción se iniciaba iluminando y añadiendo simultáneamente $[\text{C}^{14}]\text{NaHCO}_3$ y, en su caso, KNO_3 ó NH_4Cl y se desarrollaba durante 12-18 min. A intervalos regulares de tiempo se tomaban alícuotas de 20 μl , que se disponían en viales de centelleo conteniendo 80 μl de HCl 0,5 N. La mezcla se secaba con una lámpara de infrarrojos a fin de eliminar el carbono inorgánico marcado no fijado por las células, y, después de añadir 0,5 ml de agua, se analizaba el ^{14}C incorporado por centelleo líquido.

2.2.1.4. Determinación del consumo de iones nitrogenados

La utilización de nitrato y amonio por células de *A. nidulans* se estimó siguiendo la desaparición de estos iones del medio de ensayo.

Los ensayos de consumo de nitrato se realizaban, a 40 °C, en matraces erlenmeyers de 10 ml abiertos al aire con agitación e iluminación continuas. El medio de ensayo contenía, en un volumen final de 4 ml: tampón de ensayo, 100 μmol : KNO_3 , 1 μmol ; una cantidad de células equivalente a 40 μg cl; y, en su caso, 40 μmol de NaHCO_3 . Los experimentos se iniciaban iluminando y añadiendo simultáneamente KNO_3 , y, en su caso, NaHCO_3 , y se desarrollaban durante 20-30 min. A intervalos regulares de tiempo se tomaban alícuotas de 0,4 ml y, después de eliminar las células por centrifugación o filtración, se analizaba el nitrato remanente en el medio de ensayo.

Los ensayos de consumo de amonio se realizaban en las mismas condiciones que las correspondientes al consumo de nitrato, excepto que la suspensión celular se suplementaba con 1 ó 2 μmol de NH_4Cl . El amonio remanente se analizaba, asimismo, en el medio de ensayo una vez eliminadas las células por centrifugación o filtración.

2.2.1.5. Condiciones de iluminación

En las determinaciones de consumo de iones, fijación de CO_2 , y actividades fotosintéticas por técnicas manométricas descritos en esta sección, las vasijas conteniendo las suspensiones celulares se iluminaban con lámparas incandescentes que proporcionaban sobre el fondo de las vasijas hasta $260 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm). En los experimentos realizados en el electrodo de oxígeno se iluminaba con un proyector de diapositivas que proporcionaba hasta $1.400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sobre la superficie externa de la cámara del electrodo. Salvo que se especifique lo contrario, la intensidad de luz incidente es de $1.400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los experimentos realizados en el electrodo de oxígeno y de $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los restantes.

2.2.2. DETERMINACION DE TRANSPORTE DE NITRATO

La acumulación intracelular de nitrato en células de A. nidulans se estimó determinando el contenido en nitrato de lisados celulares en medio ácido obtenidos por centrifuga-

ción de las células a través de silicona. Para ello se utilizaron tubos de centrifuga de 3 mm de diámetro conteniendo tres fases distintas (Heldt, 1980): 1) una inferior de alta densidad con un medio para lisar las células; 2) una de silicona líquida, de densidad intermedia; y 3) una fase superior consistente en una suspensión de células en medio de ensayo. Al centrifugar, las células pasan a través de la capa de silicona, que impide el paso del medio de ensayo en el que éstas se encontraban. Las células entran en contacto con la fase inferior, lisándose y liberando su contenido. Los restos celulares insolubles en ácido (paredes celulares, membranas, proteínas, etc.) sedimentan en el fondo del tubo.

Se han ensayado distintas siliconas y mezclas de las mismas, así como diferentes medios de lisis con distintas densidades, que permitan la estabilidad de las tres fases. Como fase intermedia se ha elegido una mezcla de silicona Versilube F-50 (Aldrich) y silicona 14615-3 (Jansen Química) en una proporción 2:1. Con respecto al medio de lisis, el que ha resultado más idóneo, tanto por su eficacia para lisar las células como por no interferir en los ensayos analíticos de nitrato, ha sido una solución 2 M de H_3PO_4 .

En los tubos de centrifuga (polietileno, 0,4 ml de volumen total) se disponían las siguientes capas: en el fondo del tubo, 20 μ l de H_3PO_4 2 M; sobre ésta, 80 μ l de la mezcla de siliconas arriba indicada; y, finalmente, 300 μ l de una suspensión de células en medio de ensayo, que contenía, en un volumen final de 0,3 ml: tampón de ensayo, 7,5 μ mol; KNO_3 , 15 nmol; $NaHCO_3$; y una cantidad de células equivalente

a 10 $\mu\text{g cl.}$ Para el caso de las células tratadas con wolframio, este medio de ensayo se suplementaba con Na_2WO_4 10 mM.

Los tubos preparados para el ensayo se disponían en una centrífuga Beckman microfuge 11. Los ensayos se iniciaban iluminando ($1.400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tras la adición de nitrato, y se desarrollaban durante diferentes intervalos de tiempo, finalizándose por centrifugación rápida ($10.000\times g$ durante 90 s). El nitrato presente en la fase inferior del tubo se analizaba por CLAE de intercambio iónico.

Las concentraciones intracelulares de nitrato en A. nidulans se han estimado asumiendo un volumen acuoso interno de $0,092 \mu\text{l } \mu\text{g}^{-1}\text{cl}$ (Shelp y Canvin, 1984).

2.2.3. ESTIMACION DE LA INCORPORACION DE ^{14}C A METABOLITOS SOLUBLES EN ACIDO

La incorporación de ^{14}C a metabolitos solubles en ácido por células de A. nidulans se determinó en las mismas condiciones descritas para la fijación fotosintética de CO_2 (apartado 2.2.1.3.).

Los experimentos se desarrollaban durante 18 min, tras los cuales se tomaba una alícuota de la suspensión celular para analizar el ^{14}C total incorporado por las células (véase apartado 2.2.1.3.), y se añadía a la suspensión celular remanente ácido clorhídrico a una concentración final

de 0,2 N. Las muestras se mantenían a 4 °C durante 10-15 min con agitación eventual, y se centrifugaban (12.000xg, durante 20 min) a 4 °C. En estas condiciones de acidez, además de detenerse instantáneamente los procesos metabólicos, las células se lisan, precipitando las proteínas y restos celulares de alto peso molecular durante la centrifugación, mientras que los compuestos solubles en ácido, entre ellos intermediarios de la fijación de CO₂, ácidos orgánicos y aminoácidos, quedan en el sobrenadante. El ¹⁴C incorporado en esta fracción celular se determinaba en alícuotas de este sobrenadante por centelleo líquido.

2.2.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA

Los niveles de actividad nitrato reductasa de la cianobacteria A. nidulans se han determinado en ensayos in situ con células permeabilizadas mediante tratamiento con tolueno (Herrero et al., 1981). Este tratamiento consistía en mezclar una suspensión celular (1 ml) conteniendo de 2 a 5 µg cl por ml con tolueno (20 µl) mediante agitación vigorosa durante 2 min. Una alícuota de la suspensión celular permeabilizada se añadía inmediatamente a la mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 1 ml (Manzano, 1977): tampón NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 10,5, 100 µmol; KNO₃, 20 µmol; metil viológeno, 4 µmol; y 10 µmol de Na₂S₂O₄ añadido en 0,1 ml de NaHCO₃ 0,3 M. Tras incubar a 30 °C durante 5 min, la reacción se detenía por oxidación del ditionito mediante agitación vigorosa y se procedía a determinar el nitrito formado previa eliminación de las células por centrifugación

(10.000xg, durante 2 min). Los valores de nitrito encontrados se corregían para el nitrito presente en un control en el que la alícuota de la suspensión celular se añadía a la mezcla de reacción tras haber oxidado el ditionito. Una unidad de actividad enzimática corresponde a un μmol de nitrito formado por min.

2.2.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN AMINOACIDOS LIBRES

Los niveles intracelulares de aminoácidos libres en células de A. nidulans se estimaron en extractos celulares obtenidos por tratamiento con ClH.

Los ensayos se realizaban a 40 °C, en matraces erlenmeyers de 10 ml abiertos al aire con agitación e iluminación continuas. El medio de ensayo contenía en un volumen de 4 ml: tampón de ensayo, 100 μmol ; NH_4Cl , 1 μmol ; una cantidad de células equivalente a 40 μg cl; y, en su caso, 40 μmol de NaHCO_3 . A los tiempos indicados en cada caso, se tomaban alícuotas de 0,9 ml que se mezclaban, a 4 °C, con 0,1 ml de HCl 2 N, y, tras vigorosa agitación se centrifugaban en frío (12.000xg, durante 30 min). El contenido en aminoácidos de alícuotas del sobrenadante se determinaba por CLAE de fase reversa.

2.2.6. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES

En los experimentos realizados en presencia de inhibidores metabólicos, las células se incubaban en presencia del inhibidor durante un período de tiempo determinado antes de la adición del sustrato, manteniéndose el citado inhibidor durante el ensayo.

Los tratamientos con inhibidores de la asimilación de amonio (MSX, HYL y azaserina) se llevaban a cabo incubando, a 40 °C, la suspensión celular con la cantidad adecuada del inhibidor, durante 15 min en condiciones de agitación e iluminación continuas. Los tratamientos con inhibidores de la fijación de CO₂ (DLG y CABP), se realizaban incubando durante 15 min en la oscuridad en las condiciones anteriormente descritas.

En los casos de tratamiento de una misma suspensión celular con inhibidores de la asimilación de amonio y de la fijación de CO₂, se procedía en primer lugar, y a menos que se indique lo contrario, a inhibir la asimilación de amonio y posteriormente la fijación de CO₂.

En todos los casos, se realizaban controles con células sin ningún tratamiento sometidas al mismo régimen de luz-oscuridad.

2.3. METODOS ANALITICOS

2.3.1. DETERMINACION DE NITRATO

2.3.1.1. Análisis de nitrato en medios de ensayo

El nitrato se determinó por medidas de absorbencia a 210 nm en solución ácida (Cawse 1.967). Un volumen de 0,75 ml de muestra conteniendo hasta 250 nmol de nitrato se suplementaba con 0,05 ml de ácido amidosulfúrico al 10% (p/v) para eliminar cualquier traza de nitrito presente en la disolución. Tras incubar 2 min a temperatura ambiente y agitar vigorosamente, se añadían 0,2 ml de ácido perclórico al 20% (p/p). La concentración de nitrato se estimaba midiendo la absorbencia de la disolución a 210 nm empleando un coeficiente de extinción milimolar de 7,4.

2.3.1.2. Análisis de nitrato intracelular

El análisis cuantitativo del nitrato intracelular se ha realizado por CLAE de intercambio iónico. Para ello se ha utilizado un equipo de cromatografía líquida Waters compuesto de bomba, inyector, columna termorregulada a 25 °C, y detector espectrofotométrico de flujo continuo operando a 210 nm. La separación cromatográfica de aniones se realizó en una columna analítica de intercambio iónico Whatman Partisil-10 SAX (3,9 x 250 mm). Entre la bomba y el inyector

se colocó una precolumna de las mismas características que la columna analítica, pero rellena de material pelicular, al objeto de saturar la fase móvil con la fase estacionaria y evitar el desgaste del material de la columna analítica (Atwood et al., 1979). Entre el inyector y la columna analítica se colocó otra precolumna (3,9 x 40 mm) rellena del mismo material pelicular, al objeto de retener las posibles impurezas de las muestras.

La separación cromatográfica se realizó mediante una modificación del método de Thayer y Huffaker (1982). Como eluyente, y después de ensayar distintos tampones de diferente composición y pH, se ha elegido una solución de tetrahidrofurano al 2% en H_3PO_4 50 mM, ajustada a pH 1,9 con una solución concentrada de NaOH. Cuando el flujo es de 1 ml min^{-1} , el nitrato eluye con un tiempo de retención de 15 min, tal como se muestra en la Figura 1. En estas condiciones, el nitrato se separa perfectamente de los ácidos orgánicos, aminoácidos, ésteres fosfato, y otros compuestos aniónicos presentes en los extractos celulares, los cuales eluyen con tiempos de retención inferiores a 13 min (Fig. 2). La Figura 2 muestra la separación cromatográfica de los componentes de una muestra de 10 μl de un extracto celular obtenido por centrifugación a través de sílica. Es interesante reseñar que la solución de lisis (H_3PO_4 , 2M) no interfiere con el nitrato, ya que eluye con el frente cromatográfico.

El nitrato se cuantificó, previa calibración con soluciones patrón, atendiendo al área de los picos detectados. La respuesta del sistema era lineal (Fig. 3), al

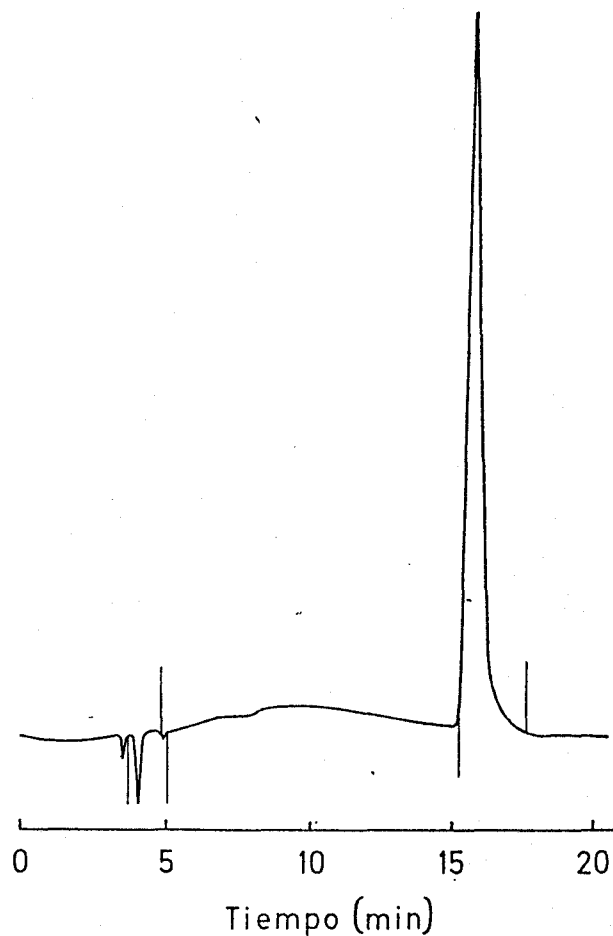


Figura 1. Análisis de nitrato por CLAE de intercambio iónico

El análisis se realizó utilizando como eluyente una solución de tetrahidrofurano al 2% en H_4PO_3 , 50 mM, pH 1,9, que se bombeaba a un flujo de 1 ml min^{-1} tal como se describe en el texto. El trazo representa la absorción a 210 nm.

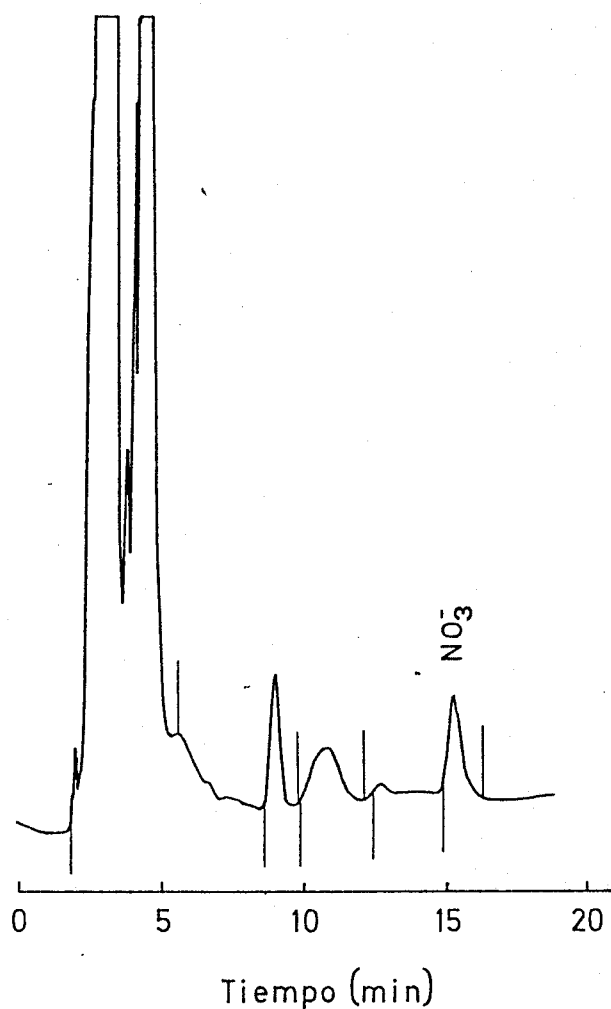


Figura 2. Análisis de nitrato por CLAE de intercambio iónico en un extracto ácido de células de A. nidulans centrifugadas a través de sílica

Se aplicaron 10 μ l de extracto celular ácido al sistema cromatográfico en las condiciones descritas en el texto y en la Figura 1. El trazo representa la absorción a 210 nm.

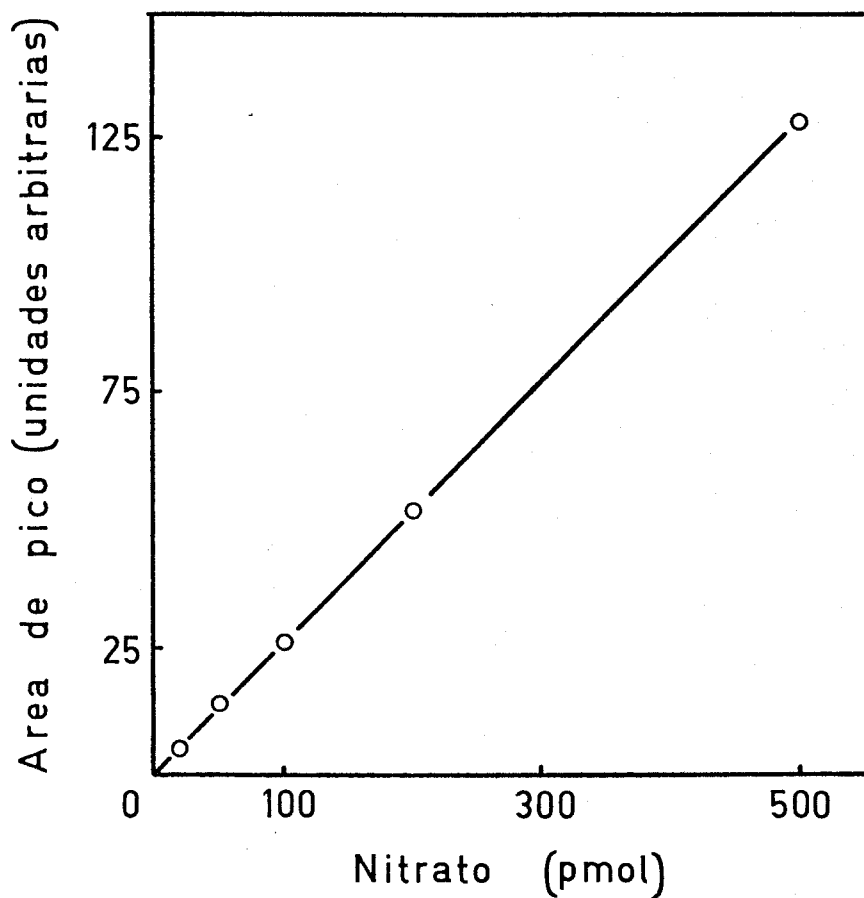


Figura 3. Recta de calibrado para la determinación de nitrato por CLAE de intercambio iónico

Muestras de volúmenes entre 2,5 y 20 μ l de soluciones patrón de KNO_3 disueltas en H_3PO_4 2 M se cromatografiaron en las condiciones descritas en la Figura 1.

menos, entre 20 y 5000 pmol, obteniéndose una correlación de 1 ($\beta < 0,001$) entre la cantidad de nitrato aplicada y el área del pico correspondiente.

2.3.2. DETERMINACION DE NITRITO

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1.949). A 1 ml de muestra conteniendo hasta 30 nmol de nitrito se le añadía 1 ml de una disolución de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 2,4 N y 1 ml de una disolución de N-(1-naftil)etilendiamina diclorhidrato al 0,02% (p/v) en agua. La mezcla se agitaba vigorosamente y, tras 10 min a temperatura ambiente, se determinaba espectrofotométricamente la concentración de complejo coloreado utilizando un coeficiente de extinción milimolar a 540 nm de 55.

2.3.3. DETERMINACION DE AMONIO

El amonio se determinó enzimáticamente midiendo la oxidación de NADPH catalizada por la glutamato deshidrogenasa en la reacción de síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, con cantidades limitantes de éste último (Bergmeyer, 1.974). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón trietanolamina, pH 8, 100 μ mol; α -cetoglutarato, 10 μ mol; ADP, 1,2 μ mol, NADPH, 0,2-0,25 μ mol; y una alícuota de muestra conteniendo hasta 100 nmol

de amonio. La reacción se iniciaba por adición de 5 μ l de una preparación de glutamato deshidrogenasa (6 U) de muy bajo contenido en amonio y se desarrollaba durante 15 min a temperatura ambiente. La concentración de NADPH en la mezcla de reacción, antes y después de desarrollarse ésta, se determinaba espectrofotométricamente a 340 nm usando un coeficiente de extinción milimolar de 6,2. Los valores de oxidación de NADPH en presencia de amonio añadido se corregían con blancos a los que no se añadía amonio.

2.3.4. DETERMINACION DE RADIOACTIVIDAD

La determinación de radioactividad de ^{14}C se realizó con un contador de centelleo líquido Beckman modelo 2.800.

Las muestras, colocadas en viales de centelleo de 20 ml, y tratadas como se indica en los apartados 2.2.1.3. y 2.2.3., se mezclaban con 10 ml de solución centelleadora (cocktail 2.200, Scharlau). En ocasiones se utilizaban viales de 7 ml a los que se añadían sólo 5 ml de solución centelleadora.

El contador se calibró por el método del número H (Beckman, 1982), estimando la eficiencia en el contaje de una serie de standards que contenían la misma cantidad de ^{14}C y cantidades variables de tetracloruro de carbono, un agente amortiguador de centelleo. Los valores obtenidos se corregían con blancos a los que no se añadía ^{14}C .

2.3.5. ANALISIS DE AMINOACIDOS POR CLAE DE FASE REVERSA

Para el análisis cuantitativo de aminoácidos se empleó un equipo de cromatografía líquida Waters compuesto por dos bombas, inyector automático, columna termorregulada a 45 °C, controlador y formador de gradientes, unidad de proceso de datos y detector fluorimétrico de flujo continuo. La separación cromatográfica se realizó utilizando columnas analíticas de fase reversa Novapack C18 (3,9 x 150 mm) con relleno de partículas esféricas de sílica microporosa (5 µm), y dos precolumnas rellenas de material microporoso de la misma composición que el de la columna analítica, a fin de saturar la fase móvil con la fase estacionaria y retener las posibles impurezas de las muestras (Coronil, 1985).

Los aminoácidos se analizaron con este equipo previa derivatización precolumna con o-ftaldialdehído (OPA) y β-mercaptoetanol (Coronil, 1985), detectándose los OPA-derivados por fluorescencia ($\lambda_{excitación}$, 340 nm; $\lambda_{emisión}$, 425 nm).

La reacción de derivatización se realizó previa neutralización de la muestra (que contenía HCl 0,2 N, pH aproximado 0,7) con un volumen igual de tampón borato saturado (aproximadamente 0,4 M) a pH 10. A esta mezcla, de pH aproximadamente 9, se añadió un volumen de reactivo de derivatización que contenía una mezcla de solución metanólica de OPA 10 mM y tampón borato saturado, pH 10 (75:25) conteniendo β-mercaptoetanol 21,5 mM. La reacción de derivatización se desarrollaba, a 35 °C, durante 90 s en la oscuridad, tras lo cual se aplicaban 20 µl conteniendo entre 50 y 400 pmol de

2.3.8. MEDIDA DE pH

El pH de las disoluciones se determinó con un pH-metro Radiometer modelo PHM82 provisto de salida digital.

2.3.9. MEDIDA DE ILUMINACION

La densidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) expresada en $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, al que en esta memoria se denomina "intensidad luminosa" por razones prácticas, se estimó con un medidor-integrador Li-cor quantum/radiometer/photometer, provisto con una célula sensora de fotones LI-190 SB.

2.3.10. MEDIDA DE FLUJO GASEOSO

Para preparar la mezcla de aire y CO_2 en las proporciones adecuadas se utilizó un medidor de flujo gaseoso Kromschroeder (España) modelo NB-2 para el aire, y un medidor Gilmon modelo F 1.110 (U.S.A.) para el CO_2 .

2.4. REACTIVOS

ADP, DLG, HYL, β -mercaptoetanol, MSX, OPA y Tricina se adquirieron a Sigma Chemical Co., St. Louis (U.S.A.). L-glutamato deshidrogenasa y NADPH eran productos de Boehringer, Mannheim (R.F.A.). Azaserina y metil viológeno procedían de Serva, Heidelberg (R.F.A.); cocktail 2200, metanol y tetrahidrofurano de Scharlau, Barcelona (España); [^{14}C]NaHCO₃ de Amersham (Reino unido); Versilube F-50 de Aldrich-Chemie, Steinheim (R.F.A.) y silicona 14615-3 de Jansen Chimica, Beerse (Bélgica). Todos los demás productos empleados procedían de Merck (R.F.A.), de Sigma (U.S.A.) o de Scharlau (España), siendo grado analítico, excepto los solventes empleados en CLAE que eran de calidad especial para CLAE.

Todas las disoluciones acuosas se realizaron con agua destilada, excepto las empleadas como solventes para CLAE, que se prepararon con agua bidestilada y filtrada a través de cartuchos Norganic (Millipore, Mildford, Ma. U.S.A.).

CABP no es un producto disponible comercialmente y se consiguió por una gentileza del Prof. G.H. Lorimer (Dupont, Delaware, U.S.A.).

3. RESULTADOS

3.1. INFLUENCIA DE LA ASIMILACION DE NITROGENO INORGANICO SOBRE LA ASIMILACION DE CARBONO

Se ha estudiado la incidencia de la asimilación fotosintética de nitrógeno inorgánico sobre la asimilación de carbono en Anacystis nidulans, determinando la velocidad de fijación de CO_2 en presencia y ausencia de nitrógeno. Los ensayos se han llevado a cabo a distintas intensidades luminosas, con lo que se consigue modificar la tasa de generación de poder asimilatorio. Entre los efectos observados inducidos por nitrógeno inorgánico destacan básicamente cambios cuantitativos en la fijación fotosintética de CO_2 y cambios cualitativos en la distribución del carbono recién fijado entre distintas fracciones celulares.

3.1.1. REPARTO DE PODER ASIMILATORIO ENTRE ASIMILACION DE NITRATO Y FIJACION FOTOSINTETICA DE CO_2

La fijación fotosintética de CO_2 , que requiere 4 electrones por átomo de carbono asimilado a nivel de carbohidratos, está acoplada estequiométricamente a la fotólisis del agua, desprendiéndose 1 mol de oxígeno por mol de CO_2 fijado. Por otra parte, la asimilación fotosintética de nitrato, que requiere 10 electrones por átomo de nitrógeno asimilado a nivel de grupo α -amino, también se encuentra acoplada a la fotólisis del agua, con una estequiometría teórica de 2,5 mol de oxígeno desprendido por mol de nitrato. Tanto la fijación de CO_2 como la asimilación de nitrato pueden, pues, seguirse a través del desprendimiento asociado de oxígeno que presen-

tan. La Figura 4 muestra la estimulación del desprendimiento de oxígeno inducida por la adición de nitrato a células de A. nidulans asimilando activamente CO₂.

El desprendimiento de oxígeno dependiente de CO₂ en células intactas de A. nidulans, determinado en presencia de concentraciones saturantes de bicarbonato, mostraba una típica curva de saturación por la luz, alcanzando velocidades máximas a intensidades de luz incidente sobre la cámara del electrodo de oxígeno del orden de $600 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 5). En estas condiciones, y en un amplio intervalo de intensidades luminosas, la adición de nitrato inducía una estimulación de la producción de oxígeno (Fig. 5), alcanzándose la saturación por luz del desprendimiento de oxígeno dependiente de la asimilación conjunta de CO₂ y nitrato a intensidades luminosas muy similares a las que saturaban la fijación de CO₂. Estos resultados sugieren que, cuando el CO₂ es el único aceptor de electrones presente en el medio, el flujo no-cíclico de electrones no está limitado por la luz, sino por la capacidad del ciclo reductivo de las pentosas fosfato para emplear el poder asimilatorio en la fijación de CO₂. La presencia de un segundo reactivo de Hill, como es el nitrato, liberaría al flujo no-cíclico de electrones de esta limitación, estimulándose la producción de oxígeno, cuya velocidad quedaría ahora limitada por el flujo de fotones.

En la Figura 5 puede observarse también que la estimulación inducida por nitrato del desprendimiento de oxígeno, en condiciones de fijación activa de CO₂, no es constante en el margen de intensidades luminosas ensayadas, sino que se

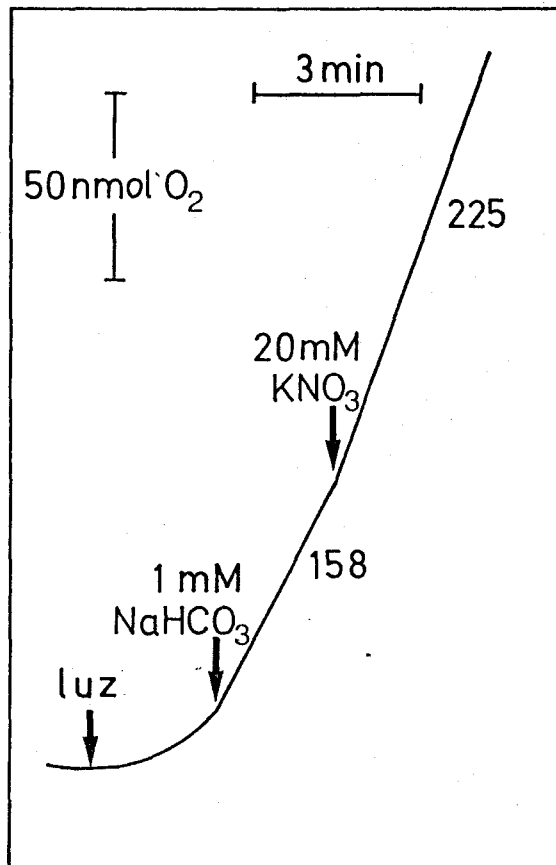


Figura 4. Desprendimiento extra de oxígeno dependiente de nitrato en células intactas de *A. nidulans* asimilando activamente CO₂

Los experimentos se realizaron en un electrodo de oxígeno Hansatech DW conteniendo una cantidad de células equivalente a 10 µg cl en 1 ml de tampón de ensayo. El desprendimiento extra de oxígeno dependiente de nitrato se estimaba como la diferencia entre la velocidad alcanzada en presencia de NaHCO₃ y KNO₃, y la alcanzada en presencia de sólo NaHCO₃. Los números sobre el trazo indican la velocidad de desprendimiento de oxígeno en µmol mg⁻¹(cl)h⁻¹.

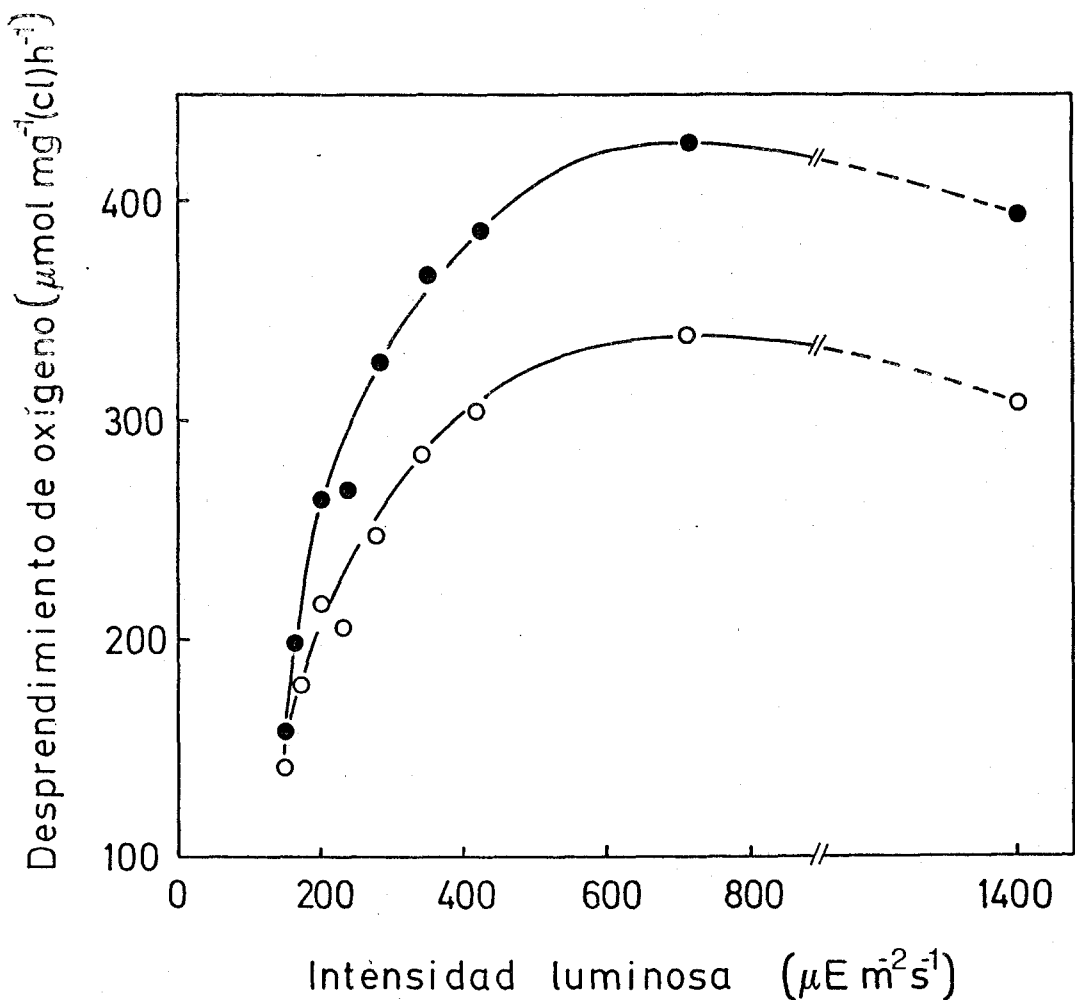


Figura 5. Desprendimiento fotosintético de oxígeno dependiente de bicarbonato y nitrato por células de A. nidulans en función de la intensidad luminosa

Los experimentos se realizaron en un electrodo de oxígeno Hansatech DW conteniendo $10 \mu\text{g Cl}$ y $10 \mu\text{mol}$ de NaHCO_3 en 1 ml de tampón de ensayo. A cada intensidad luminosa se estimó la velocidad de desprendimiento de oxígeno antes (O) y después de añadir $0,25 \text{ mM}$ de KNO_3 (●).

incrementa con la intensidad luminosa. En la Tabla I se muestra que, de hecho, la razón entre oxígeno extra desprendido y nitrato asimilado es menor de 1 a baja intensidad luminosa, aumentando dicha razón a valores superiores a 2 y cercanos al valor teórico de 2,5 en condiciones de saturación de luz. Este comportamiento indica que a saturación de luz la estimulación del flujo no-cíclico de electrones inducida por la asimilación de nitrato puede ser suficiente para generar el poder asimilatorio que requiere este último proceso, mientras que, a intensidades luminosas limitantes, la producción adicional de poder asimilatorio no bastaría para cubrir los requerimientos del consumo de nitrato que está teniendo lugar.

Los resultados sugieren que, especialmente a intensidades luminosas bajas, existe una competencia por poder asimilatorio fotosintético entre la fijación de CO_2 y la asimilación de nitrato. Esta competencia debería manifestarse como una inhibición por nitrato de la fijación de CO_2 , cuyo grado sería dependiente de la intensidad luminosa.

En la Figura 6 se muestran las cinéticas de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células intactas de A. nidulans a distintas intensidades de luz incidente. La velocidad de fijación de CO_2 aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose velocidades máximas a valores de alrededor de $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. (Es preciso aclarar que la aparente discrepancia existente entre el valor de la intensidad de luz que satura la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ (Fig. 6) y el de la que satura el desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 (Fig. 5) se debe a considerables diferencias en las condiciones experimentales en que se lle-

TABLA I

Desprendimiento de oxígeno acoplado a la asimilación de nitrato en células de A. nidulans en función de la intensidad luminosa

Intensidad luminosa ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Nitrato consumido ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})$)	Oxígeno extra desprendido ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})$)	Razón O_2/NO_3^-
57	9,45	8,36	0,88
92	14,18	12,00	0,85
204	17,45	36,73	2,10
260	21,45	51,73	2,39

Los experimentos se realizaron en vasijas de Warburg en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (apartado 2.2.1.2.). El oxígeno extra desprendido se estimó como la diferencia entre el oxígeno producido durante 20 min en las vasijas que contenían CO_2 y nitrato a concentraciones saturantes, y el producido en las que contenían sólo CO_2 . La razón O_2/NO_3^- representa el cociente entre el O_2 extra desprendido y el NO_3^- consumido.

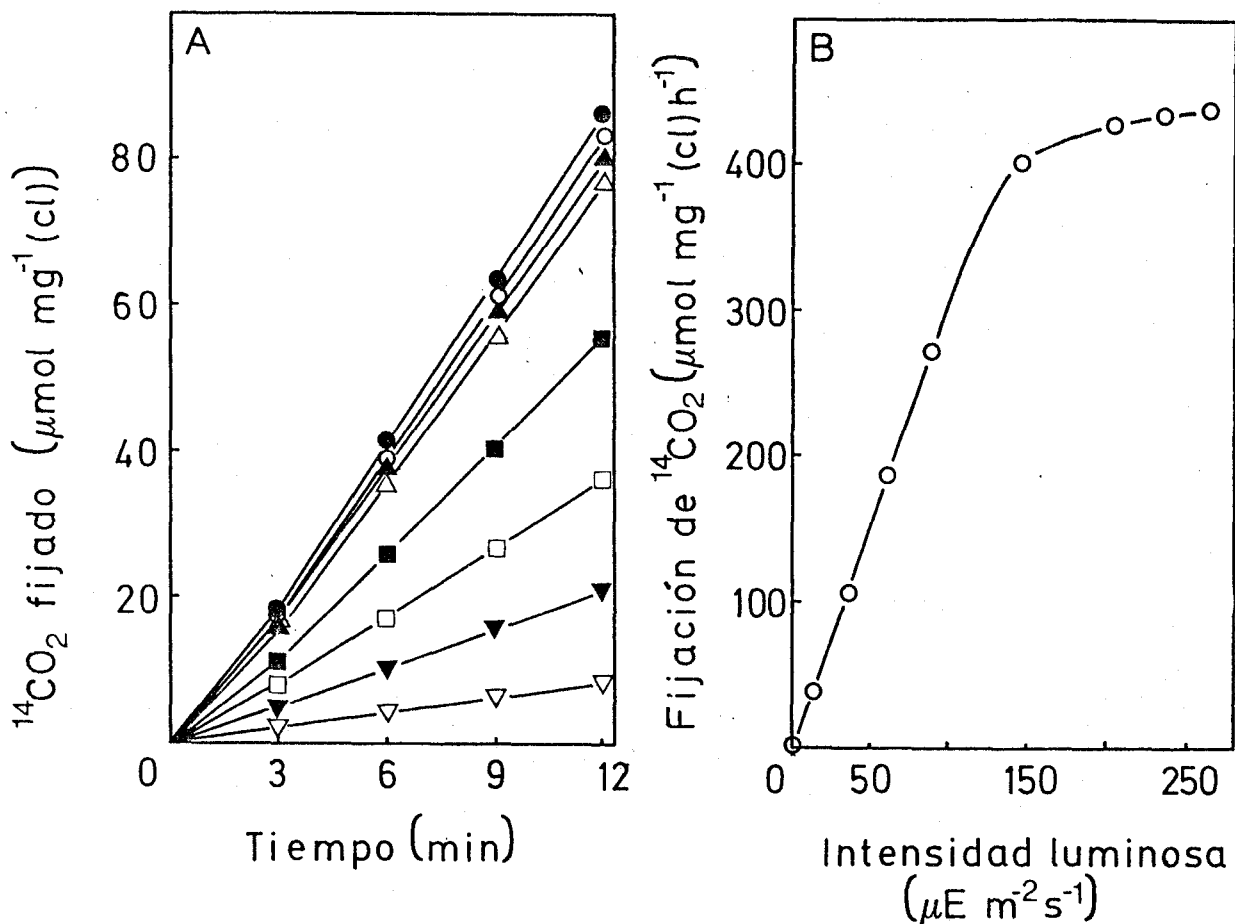


Figura 6. Fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células de *A. nidulans* en función de la intensidad luminosa

A) cinéticas de incorporación de ^{14}C a material celular estable en ácido a distintas intensidades luminosas. B) perfil de saturación por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$.

Los experimentos se desarrollaron con suspensiones conteniendo una cantidad de células equivalente a $10 \mu\text{g cl}$ y $10 \mu\text{mol}$ de $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ en 1 ml de tampón de ensayo, e iluminadas con 16 (∇), 36 (\blacktriangledown), 56 (\square), 92 (\blacksquare), 140 (Δ), 204 (\blacktriangle), 237 (\circ) y $260 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (\bullet) de radiación fotosintéticamente activa. Los experimentos se iniciaron encendiendo la luz y añadiendo simultáneamente $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ a las suspensiones celulares.

varon a cabo estas experiencias, refiriéndose las intensidades de luz indicadas a la incidente sobre el fondo de matraces erlenmeyer y sobre la pared externa de la cámara de un electrodo de oxígeno, respectivamente). En presencia de nitrato añadido, y por tanto, en condiciones de asimilación simultánea de nitrato y CO_2 , se registraron variaciones en los valores de velocidad de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ para las distintas intensidades luminosas (Fig. 7A), resultando la presencia de nitrato en una alteración del perfil de saturación por luz de la fijación de CO_2 (Fig. 7B). A intensidades luminosas limitantes, las velocidades de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ fueron inferiores a las registradas en ausencia de nitrato añadido, mientras que a intensidades luminosas saturantes, las velocidades observadas fueron prácticamente iguales a las obtenidas en ausencia de nitrato (Fig. 7B).

La disminución en la velocidad de fijación de CO_2 inducida por nitrato a intensidades de luz limitante demuestra, junto con los resultados presentados en la Figura 5 y la Tabla I, una competencia entre la fijación fotosintética de CO_2 y la asimilación de nitrato. En estas condiciones, la utilización de nitrato consumiría poder asimilatorio fotosintético en cantidades superiores a las proporcionadas por el flujo no-cíclico de electrones, en detrimento de la fijación de CO_2 , que resultaría disminuida. Asimismo, el que a saturación de luz la asimilación de nitrato induzca una estimulación del desprendimiento de oxígeno (Fig. 5) sin afectar a la velocidad de fijación de CO_2 (Fig. 7) es, sin duda, clara evidencia de que la reducción de nitrato in vivo es un proceso de naturaleza fotosintética.

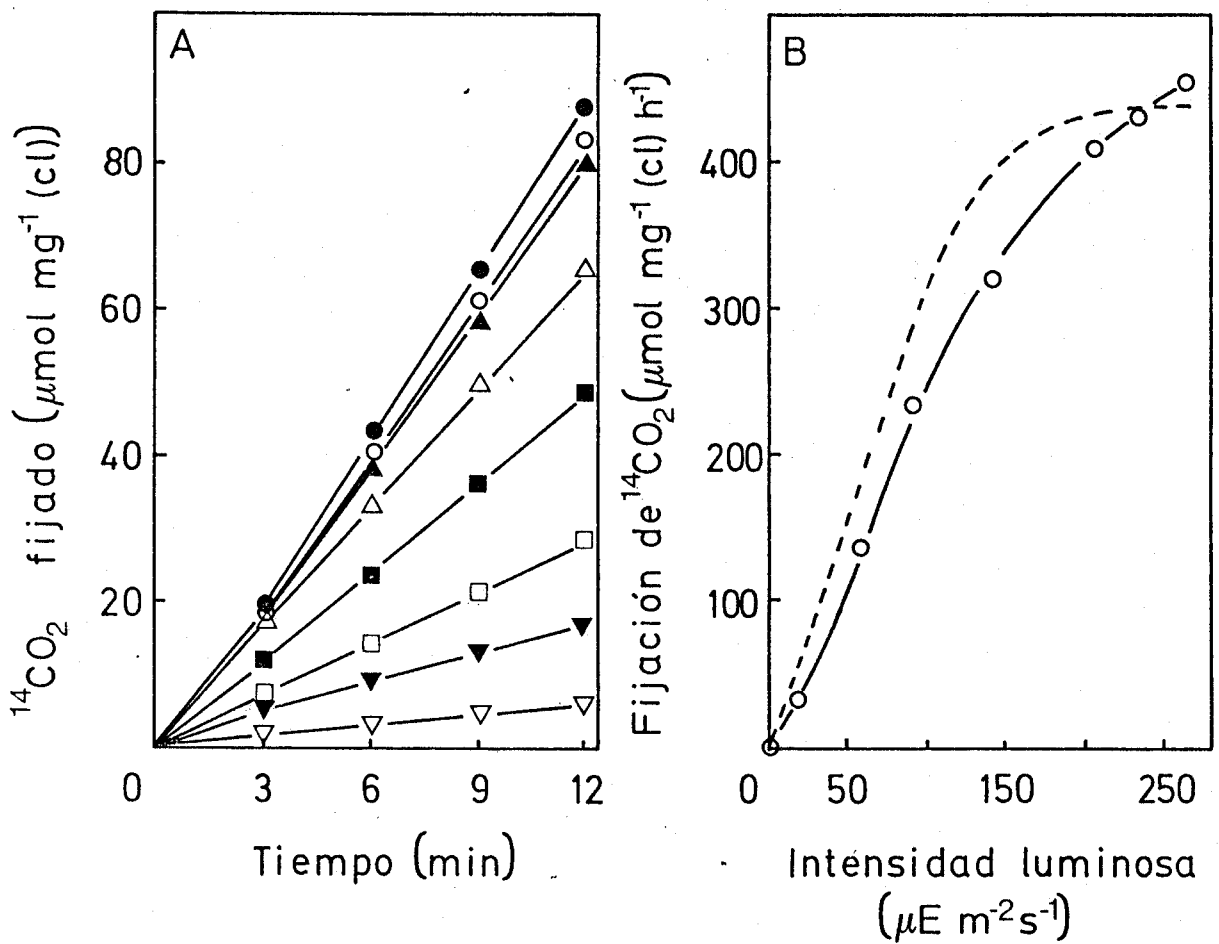


Figura 7. Efecto de la utilización de nitrato sobre la dependencia por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células intactas de A. nidulans

A) cinéticas de incorporación de ^{14}C a material celular estable en ácido a distintas intensidades luminosas en condiciones de asimilación simultánea de nitrato. B) perfil de saturación por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en ausencia (---) y presencia (—) de nitrato.

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 6, excepto que las suspensiones celulares se suplementaron a $t=0$ con 0,25 mM de KNO_3 . Las suspensiones se iluminaron con 16 (∇), 36 (\blacktriangledown), 56 (\square), 92 (\blacksquare), 140 (Δ), 204 (\blacktriangle), 237 (\circ) y 260 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (\bullet) de radiación fotosintéticamente activa.

Además de variaciones cuantitativas en la fijación de CO_2 , el nitrato induce también cambios cualitativos en la distribución del carbono recién fijado. La Tabla II muestra que, en condiciones de limitación de luz para la fijación de CO_2 , la asimilación simultánea de nitrato afectaba drásticamente a la distribución del carbono recién fijado, ya que se incrementó el marcaje en la fracción soluble en ácido (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc.) en detrimento del marcaje incorporado en la fracción insoluble en ácido (proteínas y glucógeno, principalmente). A saturación de luz, en cambio, la distribución del carbono fijado no se afectaba significativamente por la asimilación de nitrato (Tabla II).

En resumen, en células intactas de A. nidulans la asimilación de nitrato afecta la fijación de CO_2 , tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, a intensidades de luz no saturantes, condiciones en las que se observa una disminución en la velocidad de fijación de CO_2 , así como un flujo preferencial de carbono hacia metabolitos solubles. Estos efectos no se manifiestan, sin embargo, a saturación de luz.

3.1.2. REPARTO DE PODER ASIMILATORIO ENTRE ASIMILACION DE AMONIO Y FIJACION FOTOSINTETICA DE CO_2

La asimilación de amonio en cianobacterias es también un proceso fotosintético que consume dos electrones y un ATP por nitrógeno asimilado. A fin de determinar la incidencia de la asimilación de amonio sobre la fijación de CO_2 en A. nidulans, se ha ensayado su efecto sobre la fijación de

TABLA II

Efecto del nitrato sobre la distribución del carbono recién fijado por células de A. nidulans en diferentes condiciones de iluminación

Incorporación de ^{14}C en la fracción soluble en ácido (% del total)

Fuente de nitrógeno	Intensidad luminosa saturante (a)	Intensidad luminosa limitante (b)
Ninguna	21±1	13±1
KNO_3	20±2	32±1

La fijación de $^{14}\text{CO}_2$ se desarrolló durante 18 min en condiciones idénticas a las de la Figura 6. La reacción se inició iluminando y añadiendo $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ y en su caso, 0,25 mM de KNO_3 . Los valores representan las medias y las desviaciones típicas para un mínimo de seis experimentos.

(a) 235 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

(b) 57 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

$^{14}\text{CO}_2$ y sobre la distribución del carbono recién fijado, en función de la intensidad luminosa.

En A. nidulans, la adición de amonio a células asimilando CO_2 inducía una estimulación de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ a lo largo del intervalo de intensidades luminosas ensayadas. Esta estimulación era dependiente de la intensidad luminosa, siendo máxima (del orden del 10%) a intensidades saturantes de luz (Fig. 8). El amonio inducía también una alteración cualitativa en la distribución del carbono recién fijado entre distintas fracciones de metabolitos. La Tabla III muestra que, tanto a intensidades luminosas limitantes como saturantes para la fijación de CO_2 , la adición de amonio a células intactas de A. nidulans alteraba el patrón de distribución del carbono, induciendo aumentos en el marcaje de la fracción soluble en ácido en detrimento de la insoluble en ácido, lo cual indica un flujo preferencial de carbono hacia metabolitos solubles en ácido.

Parece por tanto que, a diferencia de los efectos observados con el nitrato, el amonio, a todas las intensidades luminosas ensayadas, estimula la fijación de CO_2 , sin que se manifieste ningún tipo de competencia por poder asimilatorio, favoreciendo asimismo el flujo de carbono hacia metabolitos solubles en ácido.

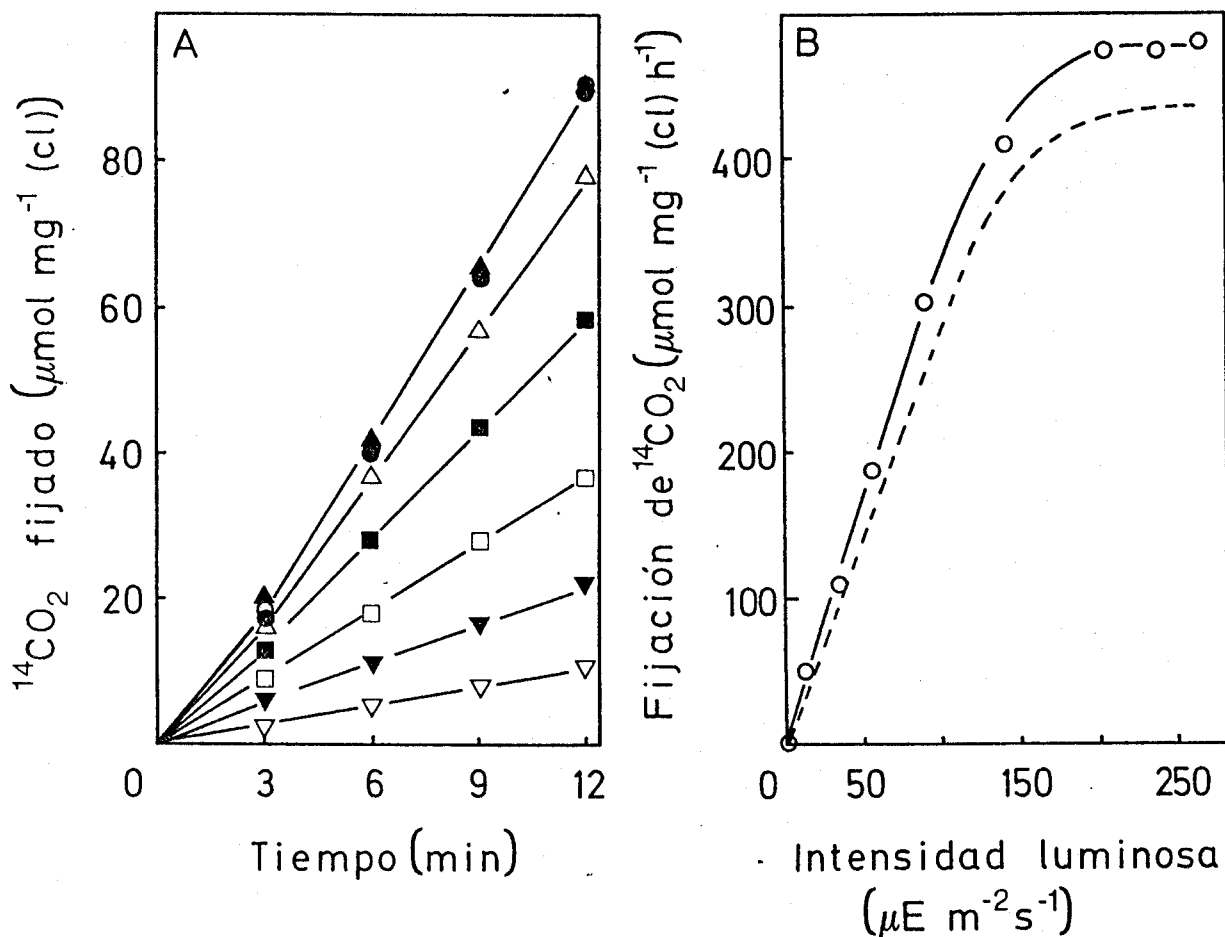


Figura 8. Efecto de la utilización de amonio sobre la dependencia por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células de A. nidulans

A) cinéticas de incorporación de ^{14}C a material celular estable en ácido a distintas intensidades luminosas en condiciones de asimilación simultánea de amonio. B) perfil de saturación por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en ausencia (-----) y presencia (——) de amonio.

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 6, excepto que las suspensiones celulares se suplementaron a $t=0$ con 0,25 mM de NH_4Cl . Las suspensiones se iluminaron con 16 (∇), 36 (\blacktriangledown), 56 (\square), 92 (\blacksquare), 140 (\triangle), 204 (\blacktriangle), 237 (\circ) y 260 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (\bullet) de radiación fotosintéticamente activa.

TABLA III

Efecto del amonio sobre la distribución del ^{14}C recién fijado por células de A. nidulans en diferentes condiciones de iluminación

Incorporación de ^{14}C en la fracción soluble en ácido (% del total)

Fuente de nitrógeno	Intensidad luminosa saturante (a)	Intensidad luminosa limitante (b)
Ninguna	21±1	13±1
NH ₄ Cl	30±3	46±1

Los experimentos se desarrollaron durante 18 min en condiciones idénticas a las de la Figura 6. La reacción se inició iluminando y añadiendo [^{14}C]NaHCO₃ y, en su caso, 0,25 mM de NH₄Cl. Los valores representan las medias y las desviaciones típicas para un mínimo de seis experimentos.

(a) 235 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

(b) 57 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

3.1.3. EFECTOS DE LA ENTRADA Y REDUCCION DE NITRATO Y DE LA ASIMILACION DE AMONIO SOBRE LA FIJACION DE CO₂

Los resultados presentados en los apartados 3.1.1. y 3.1.2. indican la existencia de un efecto diferencial sobre la fijación de CO₂ de la asimilación de nitrato y de amonio. Con objeto de caracterizar estas diferencias y distinguir entre los efectos debidos a la reducción de nitrato hasta amonio y los debidos a la incorporación de éste último a esqueletos carbonados, se ha ensayado el efecto de ambas fuentes de nitrógeno sobre la fijación de CO₂ en condiciones de bloqueo de la asimilación de amonio con inhibidores específicos. Para ello se ha utilizado la L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX), un efectivo inactivador de la glutamina sintetasa, primer enzima implicado en la incorporación de amonio a esqueletos carbonados por el ciclo GS/GOGAT. En células tratadas con MSX el nitrato consumido es reducido a amonio y excretado estequiométricamente al medio (Flores et al., 1980;1983b).

El tratamiento de células de A. nidulans con MSX no afectó significativamente a la curva de saturación por luz de la fijación fotosintética de CO₂ (Fig. 9). Sin embargo, la MSX eliminó la estimulación por amonio de la fijación de CO₂ e incluso el ligero efecto positivo del nitrato (Tabla IV). Este comportamiento indica que el efecto estimulador del amonio está mediado por su incorporación a esqueletos carbonados, no siendo un efecto del ión amonio per se.

La distribución del carbono recién fijado en presen

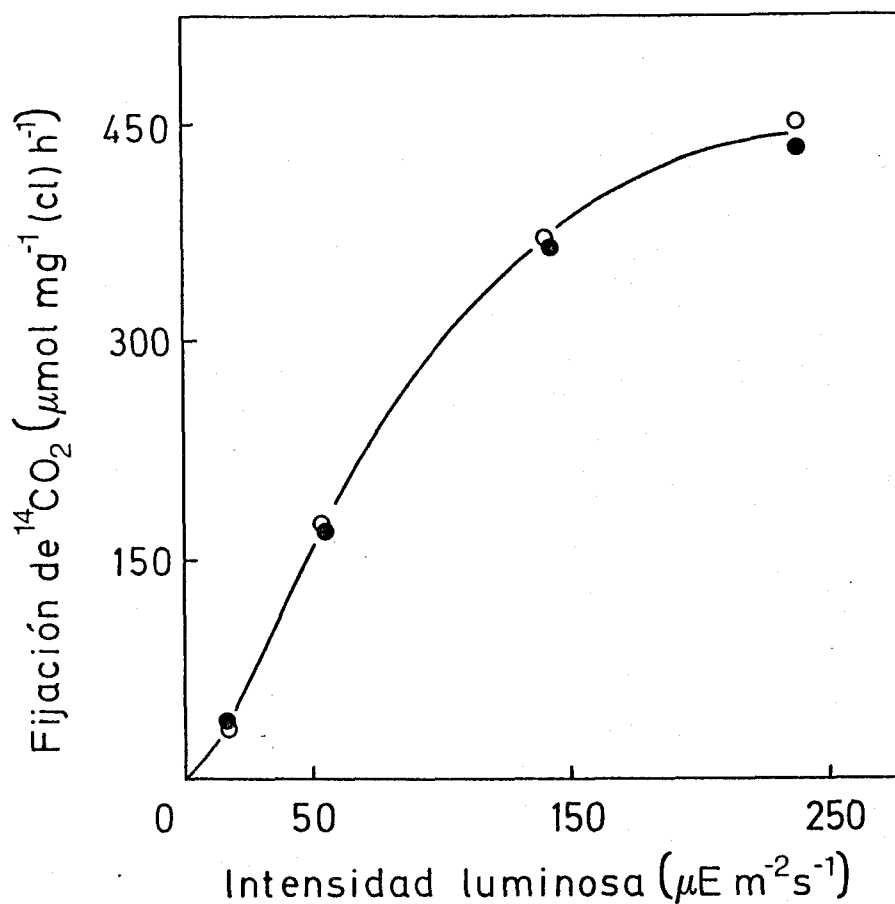


Figura 9. Efecto de la MSX sobre la fijación de ¹⁴CO₂ por células de A. nidulans en función de la intensidad luminosa

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 6, excepto que las células se preincubaron 15 min a la luz en ausencia (O) o presencia (●) de MSX 1 mM.

TABLA IV

Efecto de la MSX sobre la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células de A. nidulans en ausencia o presencia de nitrógeno inorgánico

Fuente de nitrógeno	Fijación de $^{14}\text{CO}_2$ ($\mu\text{mol mg}^{-1} (\text{cl})\text{h}^{-1}$)	
	-MSX	+MSX
Ninguna	414	402
KNO_3	422	389
NH_4Cl	459	402

Los experimentos se desarrollaron a una intensidad luminosa de $235 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en idénticas condiciones a las de la Figura 6, excepto que las suspensiones celulares se preincubaron durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX.

cia y ausencia de nitrógeno inorgánico también resultó afectada por el tratamiento con MSX. Los resultados de la Tabla V muestran que la inhibición de la asimilación de amonio por MSX eliminó el incremento en el nivel de metabolitos solubles en ácido inducido por amonio, tanto a intensidad luminosa limitante como saturante, evitando, asimismo, el incremento inducido por nitrato en condiciones de limitación de luz. Por tanto, puede adscribirse el aumento en el nivel de metabolitos solubles en ácido observado en presencia de nitrógeno a la incorporación a esqueletos carbonados del amonio, procedente de la reducción de nitrato o tomado directamente del medio.

Los resultados sugieren que cuando células de A. nidulans utilizan nitrato como fuente de nitrógeno, la fijación fotosintética de CO_2 estaría afectada negativamente por la competencia con la reducción de nitrato y positivamente por la asimilación del amonio resultante. La velocidad de fijación de CO_2 en presencia de nitrato quedaría pues determinada por el balance entre ambos efectos. A intensidades luminosas saturantes, en que la estimulación del flujo no-cíclico de electrones promovida por el nitrato es máxima, el efecto positivo inducido por amonio contribuiría también a compensar el efecto negativo del nitrato. Por el contrario, a limitación de luz, la competencia por electrones que se establece con la asimilación de nitrato prevalecería sobre el efecto positivo de la asimilación de amonio, resultando en

TABLA V

Efecto de la MSX sobre la distribución del carbono recién fijado por células de A. nidulans en ausencia o presencia de nitrógeno inorgánico

Incorporación de ^{14}C en la fracción soluble en ácido (% del total)		
Fuente de nitrógeno	Intensidad luminosa saturante (a)	Intensidad luminosa limitante (b)
Ninguna	26±2	19±2
NO_3K	22±2	18±1
NH_4Cl	22±3	21±1

Las condiciones fueron idénticas a las de las Tablas II y III, excepto que las células se preincubaron durante 15 min a la luz en presencia de MSX 1 mM.

(a) $235 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

(b) $57 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

una menor tasa de fijación de CO₂.

3.2 INFLUENCIA DE LA FIJACION DE CO₂ SOBRE LA UTILIZACION DE NITROGENO INORGANICO

La utilización de cualquier forma de nitrógeno inorgánico presenta en cianobacterias un requerimiento estricto por luz y CO₂. La dependencia de la luz se deriva del requerimiento por poder asimilatorio generado fotosintéticamente que presentan los correspondientes procesos asimilatorios (ver apartado 3.1.). El requerimiento por CO₂ se derivaría de las diferentes interacciones existentes entre los metabolismos del nitrógeno y carbono, tales como la demanda metabólica de carbono orgánico, principalmente de α -cetoácidos en el ciclo GS/GOGAT y reacciones subsiguientes de transaminación y transamidación, y/o un control carbonado del metabolismo del nitrógeno que equilibraría, en última instancia, la razón C/N del organismo.

A fin de profundizar en el conocimiento de la regulación de la asimilación de nitrógeno inorgánico se han determinado los requerimientos de carbono para la asimilación de nitrato y amonio, y se ha estudiado el papel que desempeñan productos derivados de la fijación de CO₂ en la regulación de la utilización de nitrato como antagonistas del efecto negativo del amonio sobre la utilización de nitrato.

3.2.1. REQUERIMIENTOS CARBONADOS DE LA ASIMILACION DE NITROGENO INORGANICO

Tanto la utilización de nitrato como la de amonio

por células de A. nidulans son estrictamente dependientes de la disponibilidad de CO₂. La Tabla VI muestra que células intactas de A. nidulans no fueron capaces de consumir nitrato ni amonio en ausencia de CO₂, mientras que consumieron ambos iones a velocidades moderadas en atmósferas de aire (equivalentes a 10 µM de CO₂ disuelto) y máximas a concentraciones saturantes de bicarbonato.

A fin de determinar si los requerimientos por CO₂ para la asimilación de nitrato y amonio son o no idénticos en términos cuantitativos, se ha determinado la velocidad de ambos procesos en función de la capacidad de generación de poder asimilatorio fotosintético a distintas intensidades luminosas y de la disponibilidad de CO₂.

La Fig. 10 muestra la curva de saturación por luz de la utilización de nitrato por células de A. nidulans a concentraciones atmosféricas de CO₂ (10 µM) y a saturación de bicarbonato (10 mM). En aire, la utilización de nitrato alcanzaba velocidades máximas (14 µmol mg⁻¹(cl) h⁻¹) a intensidades luminosas del orden de 50-60 µE m⁻²s⁻¹. A concentraciones saturantes de bicarbonato, la utilización de nitrato presentaba velocidades máximas de 65 µmol mg⁻¹(cl) h⁻¹, alcanzándose la saturación por luz a intensidades luminosas de 250 µE m⁻²s⁻¹ (Fig. 10). En estas condiciones de saturación de sustratos, en las que la disponibilidad de CO₂ no es un factor limitante, la velocidad de utilización de nitrato se correlacionaba perfectamente, para cada intensidad luminosa ensayada, con la correspondiente de fijación de CO₂ (r = 0,996, β < 0,001).

TABLA VI

Dependencia por CO_2 de la utilización de nitrógeno inorgánico por células de A. nidulans

Condiciones	Consumo de nitrato ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$)	Consumo de amonio
Aire menos CO_2	0,0	0,0
Aire	9,6	11,7
Aire más NaHCO_3	64,0	55,0

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces erlenmeyers de 10 ml conteniendo una cantidad de células equivalente a 10 μg cl por ml de tampón de ensayo. Los ensayos se iniciaron encendiendo la luz ($260 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y añadiendo KNO_3 (0,25 mM) o NH_4Cl (0,25 mM), y en su caso NaHCO_3 (10 mM). La ausencia de CO_2 se consiguió gaseando continuamente las suspensiones celulares, dispuestas en matraces erlenmeyers cerrados, con una corriente de aire pasado por una solución de KOH al 20 %, desde 30 min antes de iniciar el experimento.

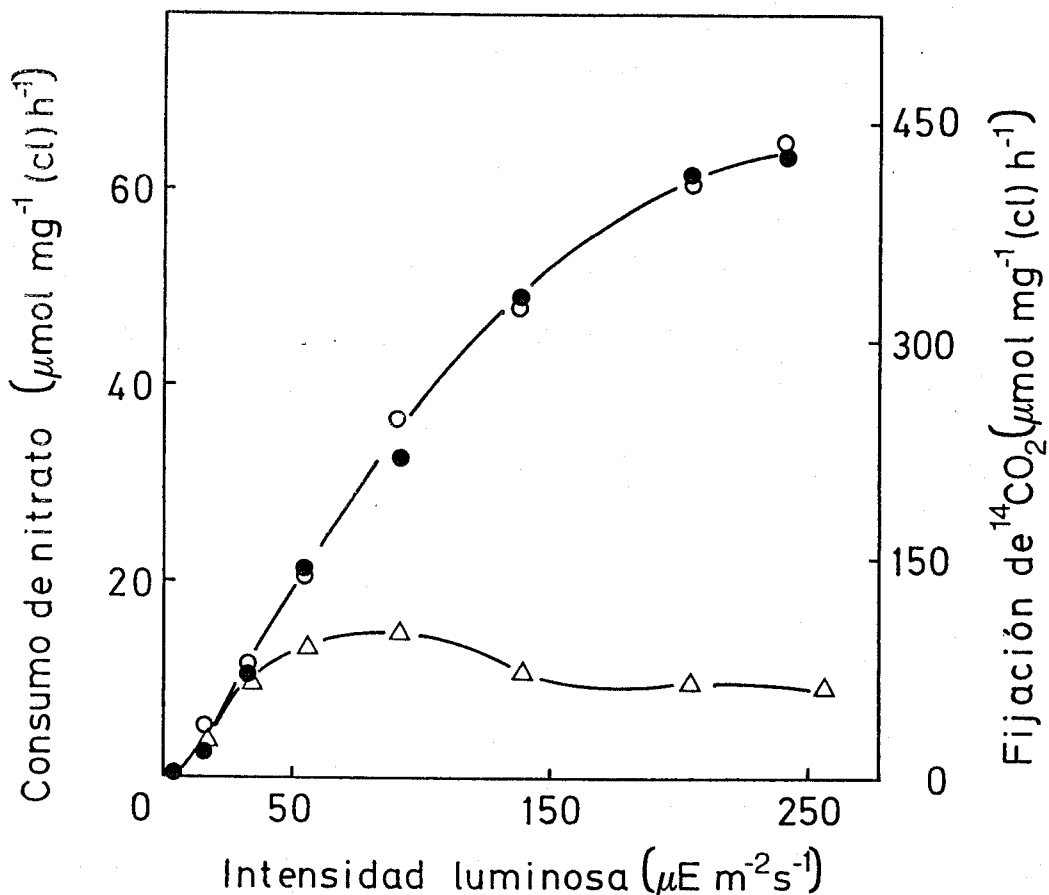


Figura 10. Efecto de la intensidad luminosa sobre la utilización de nitrato por células de A. nidulans en condiciones de limitación y saturación de CO_2

Los experimentos se realizaron en matraces erlenmeyers conteniendo suspensiones con una cantidad de células equivalente a $10 \mu\text{g cl}$ por ml de tampón de ensayo a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa. Los ensayos se iniciaron encendiendo la luz y añadiendo KNO_3 ($0,25 \text{ mM}$), y, en su caso, NaHCO_3 (10 mM). Los símbolos abiertos representan velocidades de utilización de nitrato en ausencia (Δ) y presencia (\circ) de bicarbonato. Los símbolos cerrados representan velocidades de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en presencia de nitrato.

La utilización de amonio en A. nidulans se comportaba, sin embargo, de un modo distinto que la utilización de nitrato en relación a la intensidad luminosa y la fijación de CO₂ (Fig. 11). Así, a niveles atmosféricos de CO₂ (10 µM), la utilización de amonio alcanzó la saturación por luz a bajas intensidades luminosas (10-15 µE m⁻²s⁻¹), siendo también bajas las velocidades máximas alcanzadas (12 µmol mg⁻¹(cl) h⁻¹). En condiciones de saturación de bicarbonato, la utilización de amonio se estimulaba notablemente (Fig.11), alcanzando la saturación por luz a intensidades luminosas de 70-80 µE m⁻²s⁻¹ con velocidades de 50-55 µmol mg⁻¹(cl)h⁻¹. Por el contrario, la fijación de CO₂ en presencia de amonio se saturó a intensidades luminosas de 200 µE m⁻² s⁻¹, no observándose correlación entre las velocidades de fijación de CO₂ y las de consumo de amonio (Fig.11).

Estos resultados indican que, cualitativamente, tanto la utilización de nitrato como la de amonio en Anacystis son dependientes de la fijación de CO₂, de forma que a concentraciones atmosféricas de CO₂ (10 µM) ambas se encontrarían limitadas por la disponibilidad de compuestos carbonados, cuya síntesis queda restringida a bajas concentraciones de CO₂. Sin embargo, en estas condiciones de limitación de CO₂, ya se observan diferencias entre los perfiles de saturación por luz de la utilización de nitrato y de amonio, alcanzando la asimilación de amonio la saturación por luz a intensidades inferiores que la asimilación de nitrato. En condiciones de saturación de bicarbonato, estas diferencias fueron más marcadas, encontrándose un estricto acoplamiento entre las velocidades de fijación de CO₂ y de asimilación de nitrato, que

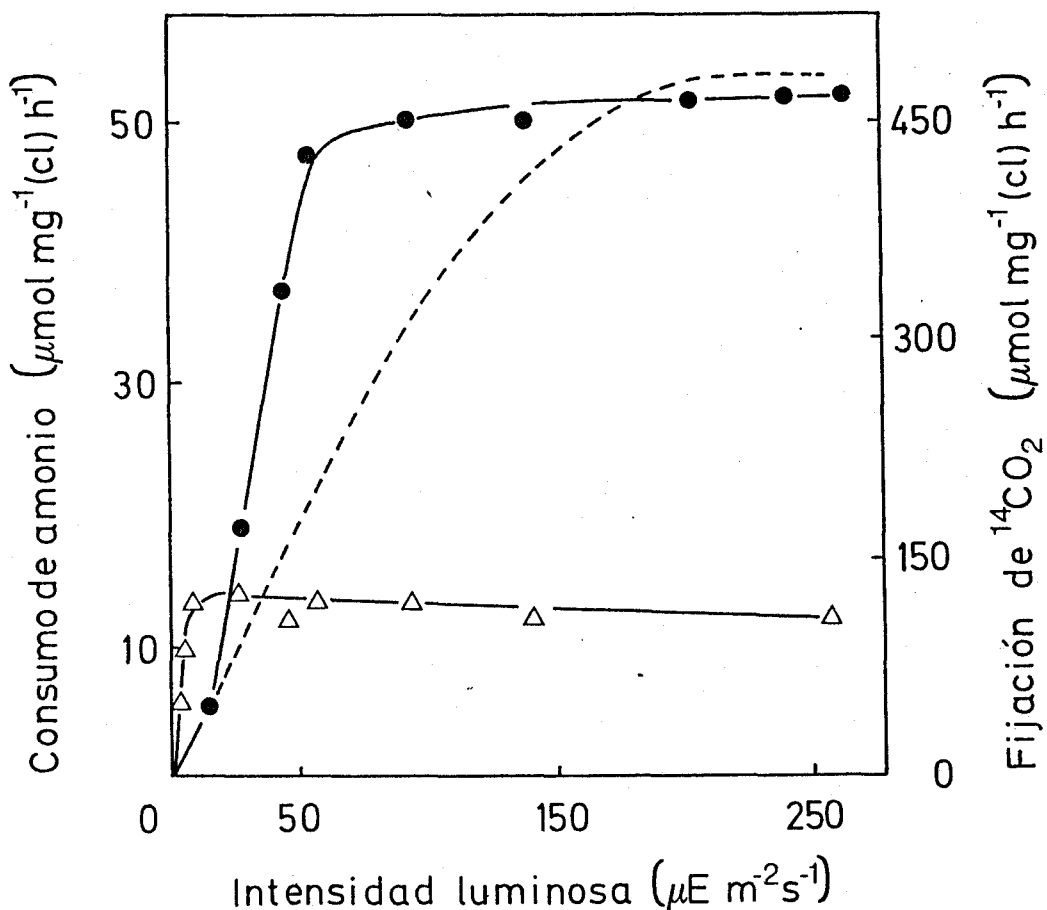


Figura 11. Efecto de la intensidad luminosa sobre la utilización de amonio por células de *A. nidulans* en condiciones de limitación y saturación de CO_2

Las condiciones fueron las mismas que las de la Figura 10, excepto que en lugar de KNO_3 se añadió NH_4Cl 0,25 mM. Las líneas continuas representan velocidades de utilización de amonio en ausencia (Δ) y presencia (\bullet) de bicarbonato añadido. La línea discontinua representa el perfil de saturación por luz de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en presencia de amonio, correspondiente a la Figura 8B.

no se observaba en el caso de la asimilación de amonio, la cual se saturaba por luz a intensidades luminosas a las que la velocidad de fijación de CO_2 era de sólo un tercio de la máxima alcanzable.

A fin de estudiar si las diferencias observadas entre los perfiles de saturación por luz de la asimilación de nitrato y amonio se debían sólo a una mayor demanda de poder asimilatorio por parte de la utilización de nitrato, se ha estudiado la dependencia por luz del consumo de nitrato en células tratadas con MSX. La MSX inhibe efectivamente la asimilación de amonio sin afectar a la fijación de CO_2 (véase apartado 3.1.3., Fig. 9). En respuesta al tratamiento de las células con MSX, el perfil de saturación por luz de la utilización de nitrato cambiaba, saturándose el proceso a intensidades luminosas muy bajas ($70-80 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), mostrando velocidades máximas similares a las de células sin tratar (Fig.12).

Considerados conjuntamente, los datos indican que en células de A. nidulans la dependencia por luz observada para la asimilación de nitrato no es sólo una consecuencia del requerimiento del proceso por poder asimilatorio. Tanto el transporte y la reducción de nitrato, cuyos requerimientos por luz se desprenden de los resultados obtenidos en células tratadas con MSX (Fig. 12), como la asimilación de amonio (Fig. 11), se saturan a intensidades luminosas muy inferiores a las necesarias para saturar la utilización de nitrato (Fig. 10). Parece, por tanto, que el factor limitante en la utilización de nitrato por células normales de A. nidulans es

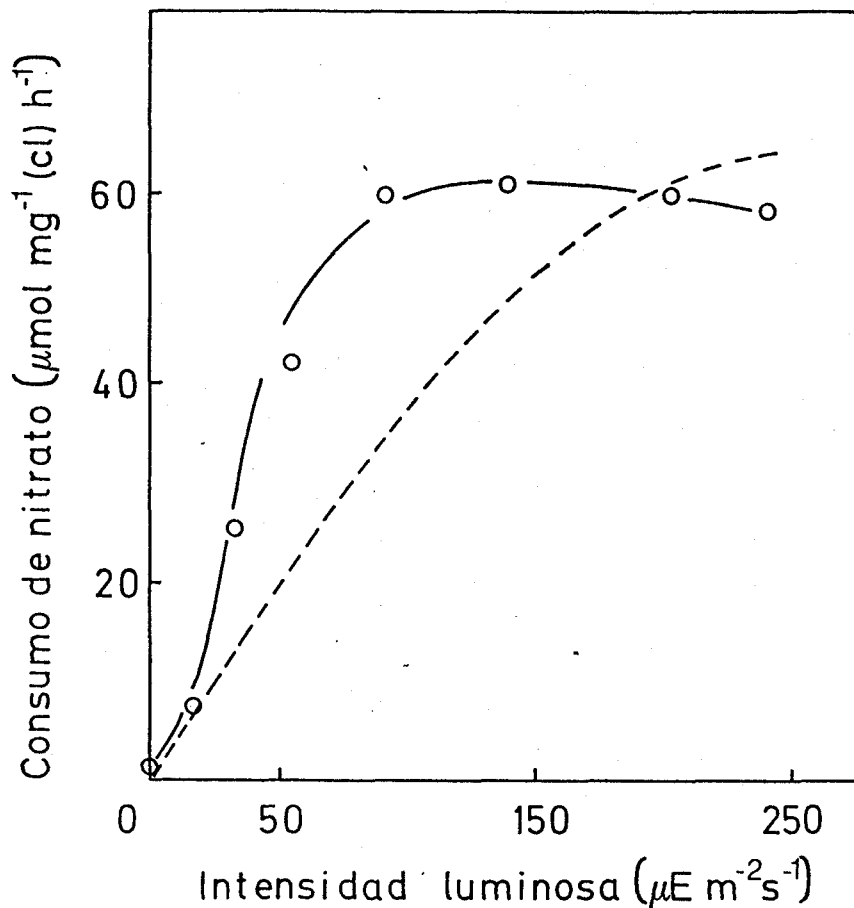


Figura 12. Efecto de la MSX sobre la dependencia por luz del consumo de nitrato por células de *A. nidulans*

Los ensayos se realizaron en condiciones idénticas a las de la Figura 10, excepto que las células se preincubaron durante 15 min a la luz en presencia de MSX 1 mM. Los ensayos se iniciaron por adición de KNO_3 (0,25 mM). La línea discontinua representa el perfil de saturación por luz de la utilización de nitrato en ausencia de MSX.

la disponibilidad de productos de la fijación fotosintética de CO_2 , reflejando el perfil de saturación por luz de la utilización de nitrato el requerimiento lumínico de la fijación de CO_2 .

En resumen, los resultados indican que la utilización de amonio muestra una dependencia moderada por fijación de CO_2 , derivada exclusivamente del requerimiento por esqueletos carbonados para su asimilación. Por el contrario, la dependencia de la asimilación de nitrato respecto a la fijación de CO_2 es mucho más estricta, indicando que, además del requerimiento por esqueletos carbonados, existe un efecto adicional, posiblemente de carácter regulatorio, de la fijación de CO_2 sobre el proceso. La existencia de este efecto adicional de la fijación de CO_2 sobre la utilización de nitrato está también apoyada por los resultados presentados en la Tabla VII. De forma análoga a lo observado en la Tabla VI para el consumo de nitrato, el desprendimiento de oxígeno asociado a la utilización de nitrato en células normales sin tratar es dependiente de la disponibilidad de CO_2 . Sin embargo, el tratamiento con MSX que no afectaba al desprendimiento de oxígeno dependiente de bicarbonato, inducía un desprendimiento extra de oxígeno dependiente de nitrato máximo e independiente de la disponibilidad de CO_2 (Tabla VII). Estos resultados indican, una vez más, que el tratamiento de células de A. nidulans con MSX elimina el acoplamiento entre la utilización de nitrato y la fijación de CO_2 , sugiriendo un papel regulador del CO_2 sobre el proceso.

TABLA VII

Efecto de la MSX sobre el desprendimiento de O_2 dependiente de nitrato por células de A. nidulans en función de la disponibilidad de CO_2

NaHCO ₃ añadido (mM)	Desprendimiento de O_2 ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$)			
	Dependiente de CO_2		Dependiente de NO_3^-	
	-MSX	+MSX	-MSX	+MSX
0	0	0	0	106
0,5	221	216	36	103
10,0	335	327	113	108

Los experimentos se realizaron en idénticas condiciones a las reseñadas en la Figura 4, excepto que las células se preincubaron durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX 1 mM.

3.2.2. DEPENDENCIA DE LA UTILIZACION DE NITRATO POR FIJACION ACTIVA DE CO₂

Con objeto de confirmar si el requerimiento por CO₂ de la asimilación de nitrógeno inorgánico es debido a productos de su asimilación fotosintética se ha ensayado el efecto de inhibidores del ciclo reductivo de las pentosas fosfato sobre la fijación de CO₂ y la utilización de nitrato.

La ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) es el enzima que cataliza la primera reacción del ciclo reductivo de las pentosas fosfato. Estudios *in vitro* con el enzima purificado han demostrado que la RuBisCO es inhibida efectivamente por el de 2-carboxiarabinitol-1,5-bisfosfato (CABP), un análogo del intermediario de la reacción de carboxilación (2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato), con una K_s de 0,3 pM (Pierce et al., 1980; Lorimer, 1983). La inhibición es estable y altamente específica (Miziorko, 1979). El tratamiento de células de A. nidulans con CABP, aún a concentraciones de 50 mM en el medio de ensayo, no afectó significativamente a la velocidad de fijación de ¹⁴CO₂ (Fig. 13), posiblemente por la dificultad de este compuesto bisfosforilado, que presenta 5 cargas negativas al pH del ensayo, para entrar en la célula.

Ante esta dificultad, se utilizó otro inhibidor de la fijación de CO₂, el D,L-gliceraldehido (DLG). Estudios en cloroplastos aislados han puesto de manifiesto que el DLG inhibe la fijación de CO₂ a nivel de la fase de regeneración del aceptor de CO₂ (Stokes y Walker, 1972; Bamberger y Avron,

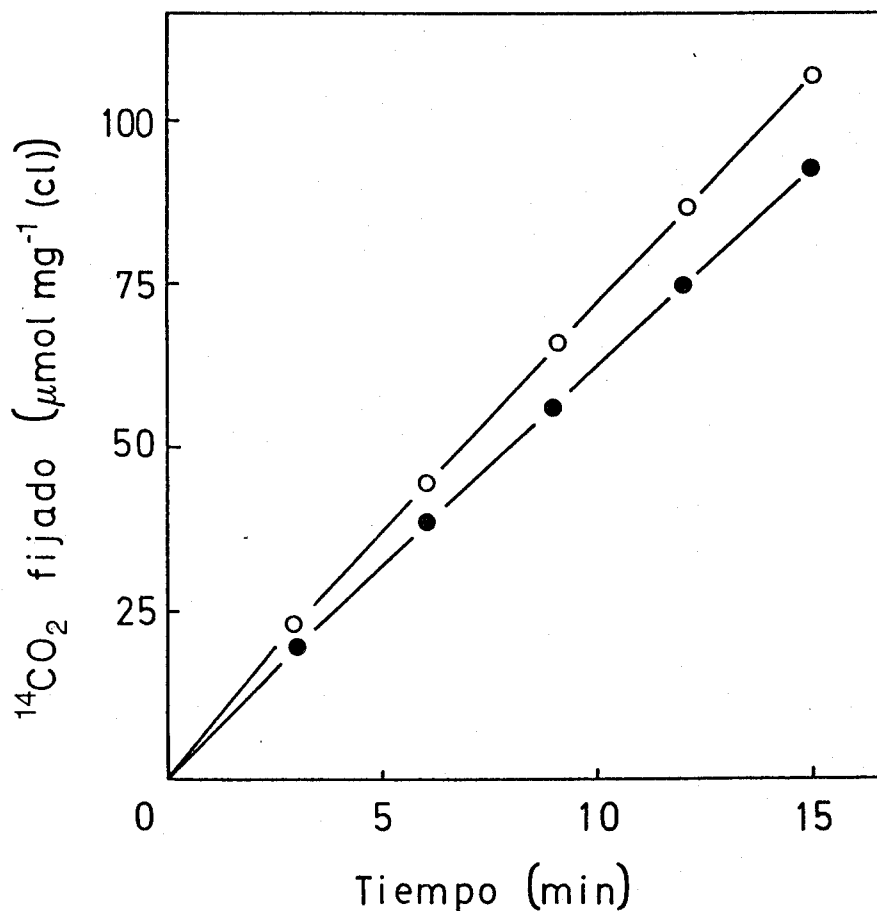


Figura 13. Efecto del CABP sobre la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ por células de A. nidulans

Los experimentos se realizaron con suspensiones conteniendo $10 \mu\text{g cl}$ en 1 ml de tampón de ensayo iluminadas con $260 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa. Los ensayos se iniciaron encendiendo la luz y añadiendo $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ (10 mM), previa incubación de las células durante 15 min en la oscuridad en ausencia (O) o presencia (●) de CABP 50 mM .

1975), posiblemente por actuar como sustrato de las enzimas aldolasa y transcetolasa (Horecker et al., 1953; Tung et al., 1954), induciendo una alteración del flujo de carbono hacia compuestos no metabolizables. El DLG no afecta, por otra parte, al flujo fotosintético de electrones ni a la fotofosforilación. El tratamiento de células de A. nidulans con DLG resultó en una inhibición del desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 (Fig. 14). Concentraciones crecientes de DLG indujeron una inhibición gradual del proceso, alcanzándose una inhibición casi completa a concentraciones de DLG de 20 mM (Fig. 14). El tratamiento con concentraciones crecientes de DLG indujo también una progresiva inhibición del desprendimiento extra de oxígeno dependiente de nitrato alcanzándose en este caso la máxima inhibición del desprendimiento extra de oxígeno (80%) concentraciones de DLG de 10-30 mM (Fig. 15). Estos resultados indican que la inhibición selectiva de la fijación de CO_2 induce una inhibición concomitante de la utilización de nitrato.

El tratamiento con MSX, de la misma manera que eliminaba la dependencia por bicarbonato del desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato (Tabla VII), evitó también el efecto negativo del DLG sobre el proceso, sin afectar a la inhibición del DLG sobre el desprendimiento de oxígeno dependiente de bicarbonato (Tabla VIII). Parece, por tanto, que la inhibición de la asimilación de amonio libera a la asimilación de nitrato del requerimiento por productos de la fijación de CO_2 .

Con objeto de profundizar en esta hipótesis de tra-

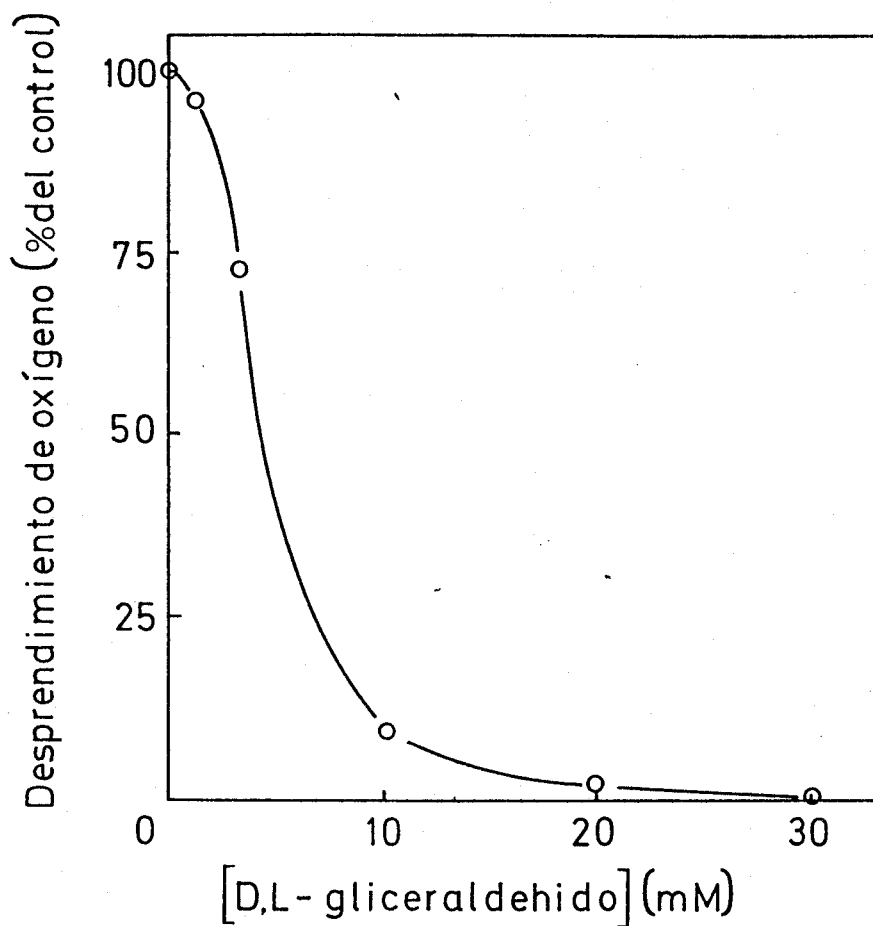


Figura 14. Efecto del DLG sobre el desprendimiento de oxígeno dependiente de CO_2 en células de *A. nidulans*

Los experimentos se desarrollaron como se describe en la Figura 4, excepto que las células se preincubaron durante 15 min en la oscuridad con las concentraciones indicadas de DLG. El 100% corresponde a una velocidad de desprendimiento de oxígeno de $217 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

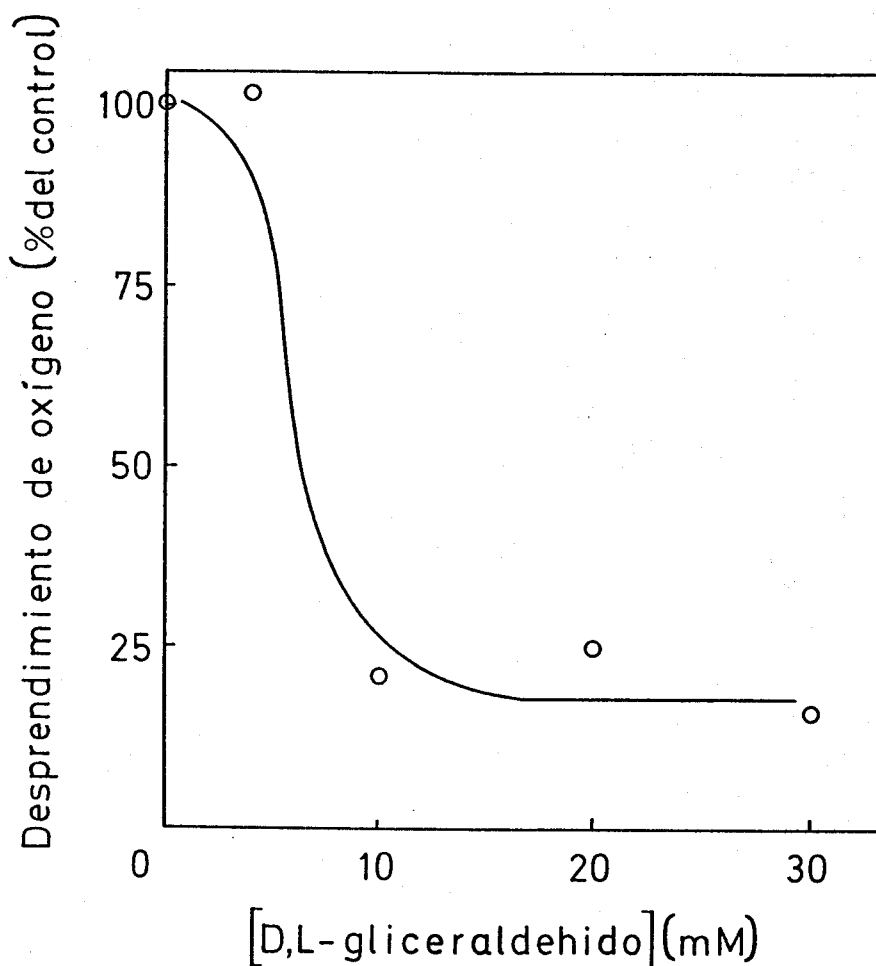


Figura 15. Efecto del DLG sobre el desprendimiento extra de oxígeno dependiente de nitrato en células de A. nidulans

Los experimentos se desarrollaron como se describe en la Figura 4, excepto que las células se preincubaron durante 15 min en la oscuridad con las concentraciones indicadas de DLG. El 100% corresponde a una velocidad de desprendimiento de oxígeno de $73 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

TABLA VIII

Efecto de la MSX sobre la inhibición por DLG del desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato por células de A. nidulans

Tratamiento	Desprendimiento de O ₂ (μmol mg ⁻¹ (cl)h ⁻¹)	
	Dependiente de CO ₂	Dependiente de NO ₃ ⁻
Ninguno	158	67
DLG	0	18
MSX, DLG	0	63

Los ensayos se desarrollaron en las condiciones descritas en la Figura 4. Las suspensiones celulares se incubaron durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX 1 mM, y posteriormente durante 15 min en la oscuridad en ausencia o presencia de DLG 30 mM.

bajo se ha ensayado el efecto del DLG y de la MSX sobre la fijación de CO_2 , estimada como incorporación de $[\text{C}^{14}]\text{NaHCO}_3$ a compuestos celulares estables en ácido, y sobre el consumo de nitrato. A concentraciones saturantes de bicarbonato, la fijación de $^{14}\text{CO}_2$, calculada en su fase lineal, resultaba inhibida en un 50% por el DLG a concentración 15 mM, obteniéndose inhibiciones prácticamente completas (95%) para 30 mM de DLG (Fig. 16). La inhibición por DLG de la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ resultó ser más acusada durante los 3 primeros minutos, incrementándose posteriormente la velocidad del proceso y manteniéndose constante hasta el final del experimento (Fig. 16B). Este comportamiento indica que el DLG es un efectivo inhibidor de la fijación de CO_2 en cianobacterias, actuando de igual forma que en cloroplastos, esto es, prolongando el período de inducción del ciclo reductivo de la pentosas fosfato por impedir la regeneración del aceptor de CO_2 , cuyos niveles determinan, en última instancia, la velocidad de fijación de CO_2 . El efecto más marcado del DLG sobre la velocidad inicial de asimilación de CO_2 explica que la inhibición observada sobre el desprendimiento de oxígeno dependiente de bicarbonato fuera más drástica que la estimada sobre la incorporación de ^{14}C en condiciones de equilibrio dinámico, puesto que los ensayos de desprendimiento de oxígeno se realizaron a tiempos cortos.

Paralelamente a la inhibición de la fijación de CO_2 , el tratamiento de células de Anacystis con concentraciones crecientes de DLG provocó una inhibición gradual de la utilización de nitrato (Fig. 17). La inhibición del consumo de nitrato resultó ser más drástica que la producida sobre la fijación de CO_2 (comparar la Fig. 16A con la 17A), de forma

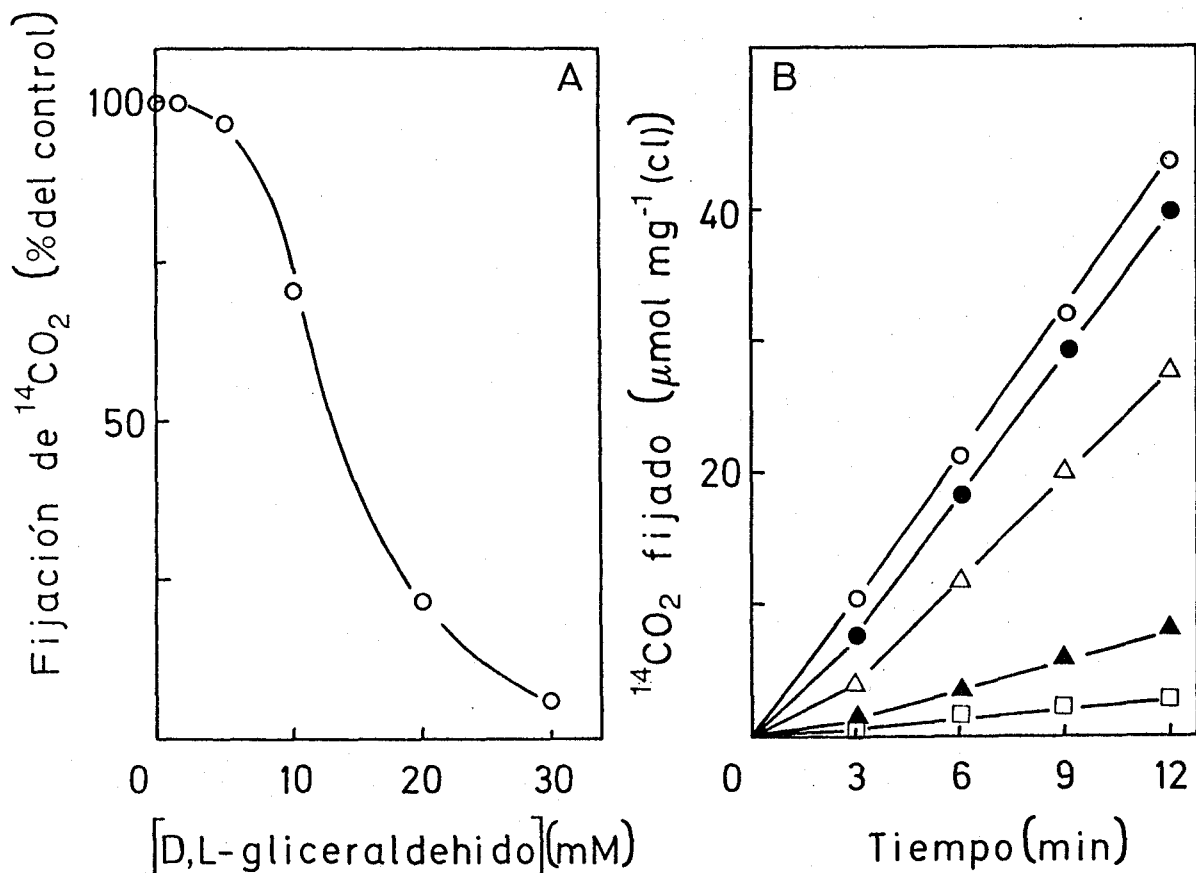


Figura 16. Efecto del DLG sobre la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en células de *A. nidulans*

A) Efecto sobre la velocidad de fijación de $^{14}\text{CO}_2$. B) Efecto sobre las cinéticas de incorporación de ^{14}C .

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 6, excepto que la intensidad luminosa fué de $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y las células se preincubaron durante 15 min en la oscuridad en ausencia (○) o presencia de DLG 5 mM (●), 10 mM (△), 20 mM (▲) y 30 mM (□). En A) el 100% corresponde a una velocidad de incorporación de ^{14}C de $220 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

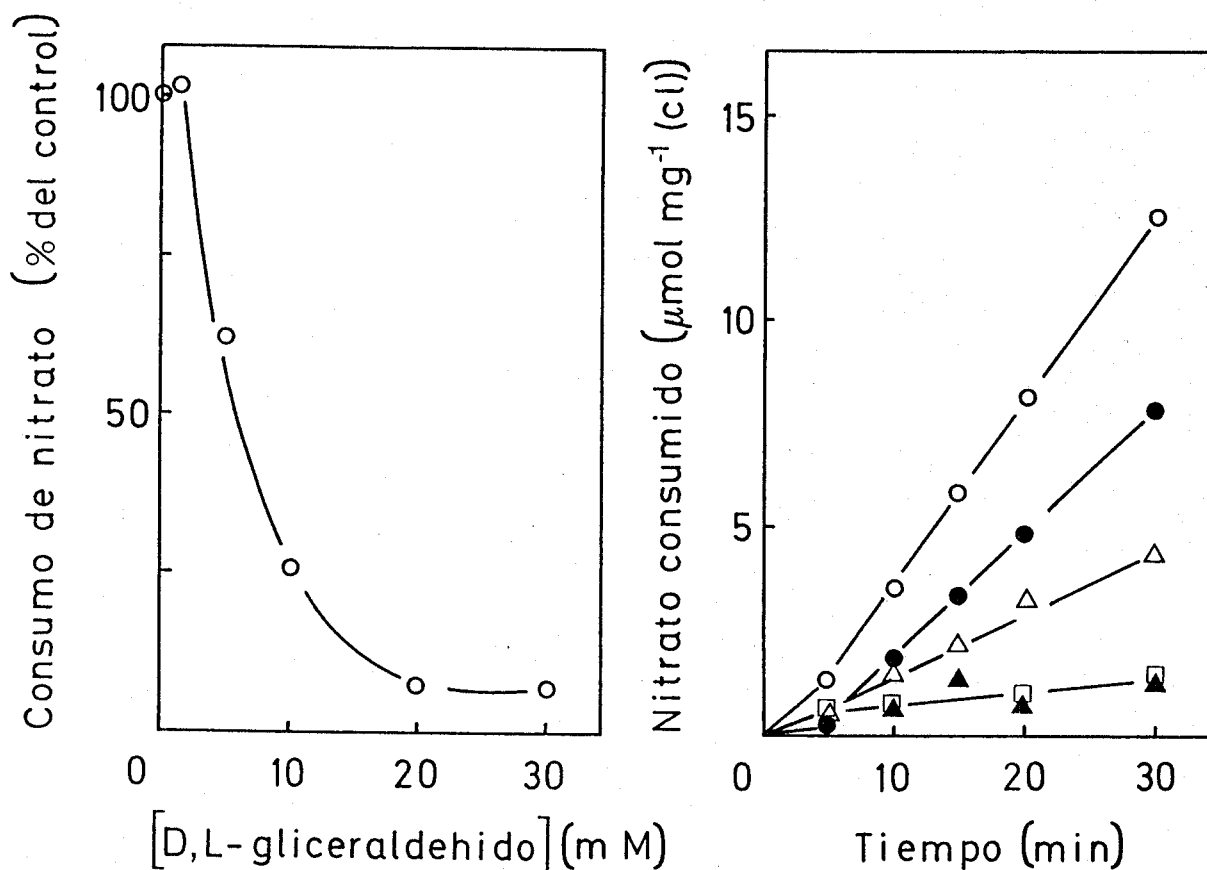


Figura 17. Efecto del DLG sobre la utilización de nitrato en células de A. nidulans

A) Efecto sobre la velocidad de utilización de nitrato.

B) Efecto sobre las cinéticas de consumo de nitrato.

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 10, excepto que la intensidad luminosa fué de $160 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los ensayos se iniciaron encendiendo la luz y añadiendo KNO_3 (0,25 mM) y NaHCO_3 (10 mM). Las células se preincubaron durante 15 min en la oscuridad en ausencia (○) o presencia de DLG 5 mM (●), 10 mM (△), 20 mM (◻) y 30 mM (▲). En A) el 100% corresponde a una velocidad de utilización de nitrato de $27 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

que, concentraciones de DLG de 5 y 10 mM, que inhibían la fijación de CO_2 en 5 y 30%, respectivamente, inhibieron la utilización de nitrato en 37 y 75%, alcanzándose inhibiciones máximas (93%) de este último proceso a concentraciones de DLG superiores a 20 mM.

Al igual que sucedía con el desprendimiento extra de oxígeno asociado a la utilización de nitrato, el tratamiento previo con MSX protegía a la utilización de nitrato de la inhibición por DLG (Tabla IX). Así, en presencia de concentraciones de DLG de 10 y 20 mM que permitían velocidades de asimilación de nitrato del 30 y 11% del control, respectivamente, el tratamiento con MSX permitía velocidades de utilización de nitrato del orden del 100 y 78%, respecto a células control (Tabla IX). La prevención por MSX del efecto inhibitor del DLG sobre el desprendimiento de oxígeno dependiente de nitrato y sobre la utilización de nitrato podría indicar que la inhibición de la asimilación de amonio libera a la utilización de nitrato del requerimiento por productos de la fijación de CO_2 . Esta interpretación, que está de acuerdo con los datos presentados en la Tablas VIII, se ha corroborado estudiando el efecto de la MSX sobre la fijación de CO_2 en células de A. nidulans sin tratar y tratadas con DLG. Como se muestra en la Figura 18, la MSX no afectó significativamente a la velocidad de fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en ninguno de los casos. Puede concluirse, por tanto, que la MSX protege a la utilización de nitrato frente a la inhibición por DLG como consecuencia de su efecto negativo sobre la asimilación de amonio.

TABLA IX

Prevención por MSX de la inhibición del consumo de nitrato causada por el DLG en células de A. nidulans

Tratamiento	Consumo de nitrato	
	($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl}) \text{h}^{-1}$)	(% del control)
Ninguno	27	100
MSX (1 mM)	28	103
DLG (10 mM)	8	30
MSX (1 mM),DLG (10 mM)	27	100
DLG (20 mM)	3	11
MSX (1 mM),DLG (20 mM)	21	78

Los experimentos se realizaron en condiciones idénticas a las de la Figura 17, excepto que las células se preincubaron a la luz durante 15 min en ausencia o presencia de MSX 1 mM, y posteriormente durante 15 min en la oscuridad en ausencia o presencia de DLG.

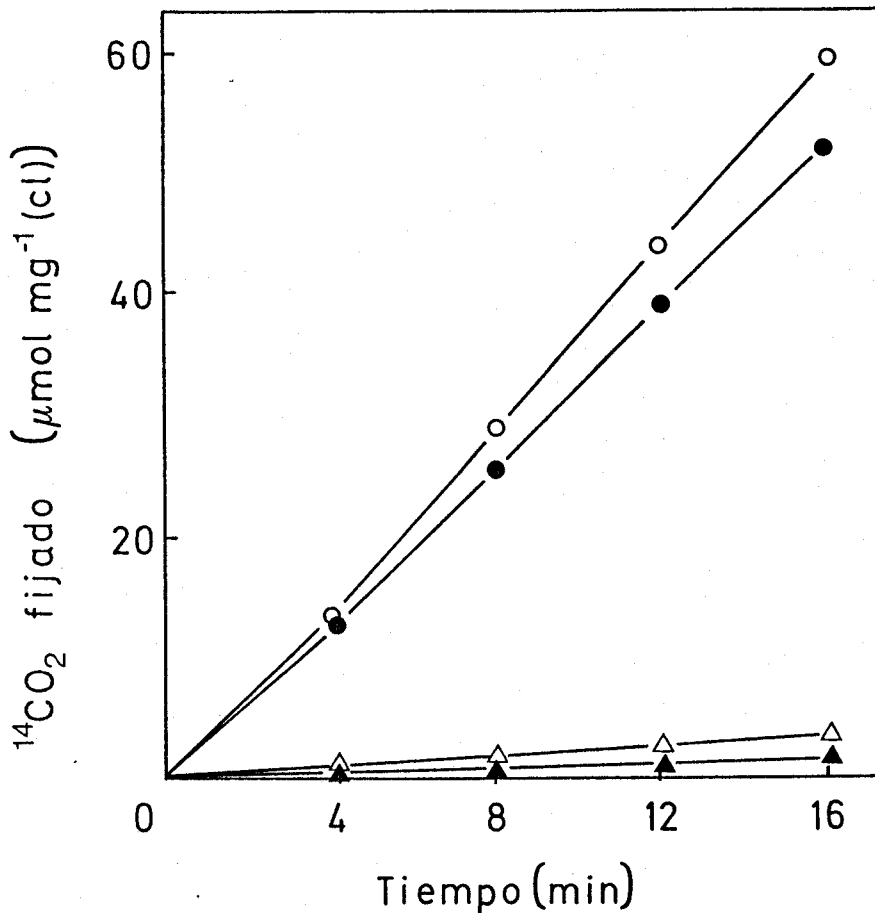


Figura 18. Efecto de MSX y DLG sobre la fijación de $^{14}\text{CO}_2$ en células de A. nidulans

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Figura 16, excepto que las células se sometieron, antes del tratamiento con DLG 30 mM, a una preincubación de 15 min a la luz en ausencia (símbolos abiertos) o presencia (símbolos cerrados) de MSX 1 mM. Células control (O), MSX (●), DLG (Δ), MSX y DLG (\blacktriangle).

Esta conclusión está, asimismo apoyada por el efecto de la azaserina sobre la utilización de nitrato en células tratadas con DLG. Este análogo del glutamato es un inactivador de glutamina-amido transferasas, como la glutamato sintasa, e inhibe efectivamente la asimilación de amonio en Anacystis (Flores et al., 1983b). Los resultados de la Tabla X muestran que el tratamiento previo de células intactas de A. nidulans con azaserina prevenía también del efecto negativo del DLG sobre la utilización de nitrato.

Estos resultados demuestran que el DLG se comporta como un inhibidor selectivo de la fijación de CO_2 sin tener ningún efecto directo sobre la utilización de nitrato. Asimismo, los resultados indican que la utilización de nitrato es dependiente de productos derivados de la fijación activa de CO_2 , eliminándose este requerimiento cuando se impide la asimilación de amonio.

Si bien la inhibición de la utilización de nitrato provocada por DLG puede evitarse en gran medida por pretratamiento de las células con MSX, la inversión en el orden del tratamiento con ambos inhibidores resulta poco efectiva en la protección por MSX del efecto inhibitor del DLG (Tabla XI). Así, cuando se inhibe en primer lugar la fijación de CO_2 con DLG, la posterior inhibición de la asimilación de amonio por MSX no libera a la utilización de nitrato del requerimiento por CO_2 . Estos datos indican que la inhibición de la asimilación de amonio resulta mucho más efectiva en la

TABLA X

Prevención por azaserina de la inhibición del consumo de nitrato causada por DLG en células de A. nidulans

Tratamiento	Consumo de nitrato	
	($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$)	(% del control)
Ninguno	29	100
Azaserina	41	144
DLG	9	24
Azaserina, DLG	34	119

Los experimentos se realizaron en condiciones idénticas a las de la Figura 17, excepto que las células se preincubaron a la luz durante 15 min en ausencia o presencia de azaserina 1 mM, y posteriormente 15 min en la oscuridad en ausencia o presencia de DLG 10 mM.

TABLA XI

Efecto del orden de tratamiento con MSX y DLG sobre la utilización de nitrato por células de A. nidulans

Tratamiento		Consumo de nitrato
1	2	(% del control)
Ninguno	Ninguno	100
MSX	Ninguno	105
Ninguno	MSX	115
DLG	Ninguno	12
Ninguno	DLG	11
MSX	DLG	62
DLG	MSX	22

Los experimentos se desarrollaron en condiciones idénticas a las de la Tabla IX. Los tratamientos consistieron en preincubaciones de 15 min en la luz y en la oscuridad según se tratara con MSX (1 mM) o DLG (30 mM), respectivamente. El 100% corresponde a una velocidad de utilización de nitrato de $32 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

eliminación del requerimiento carbonado de la utilización de nitrato cuando se realiza en condiciones de fijación activa de CO_2 .

3.2.3. ANTAGONISMO ENTRE LA ASIMILACION DE AMONIO Y LA DE CO_2 EN LA REGULACION DE LA UTILIZACION DE NITRATO

Estudios previos habían puesto de manifiesto que el efecto inhibitor del amonio sobre el consumo de nitrato está mediado por productos de la asimilación de amonio (Flores et al., 1980; 1983b). Se ha pretendido aquí explorar si, de hecho, existe una correlación entre la velocidad de consumo de amonio y el efecto inhibitor de éste sobre la utilización de nitrato. Para ello, se ha ensayado el efecto de la 5-hidroxilisina (HYL), un inhibitor reversible de la glutamina sintetasa (Ladha et al, 1978), sobre la regulación por amonio y CO_2 de la utilización de nitrato.

El tratamiento de células de A. nidulans con concentraciones crecientes de HYL producía un doble efecto sobre la utilización de nitrato en presencia de bicarbonato (Fig. 19). Concentraciones de HYL superiores a 1,5 mM estimularon el consumo de nitrato, alcanzándose velocidades máximas (160% con respecto al control) en presencia de 10 mM de HYL, mientras que concentraciones de HYL inferiores a 1,5 mM inducían

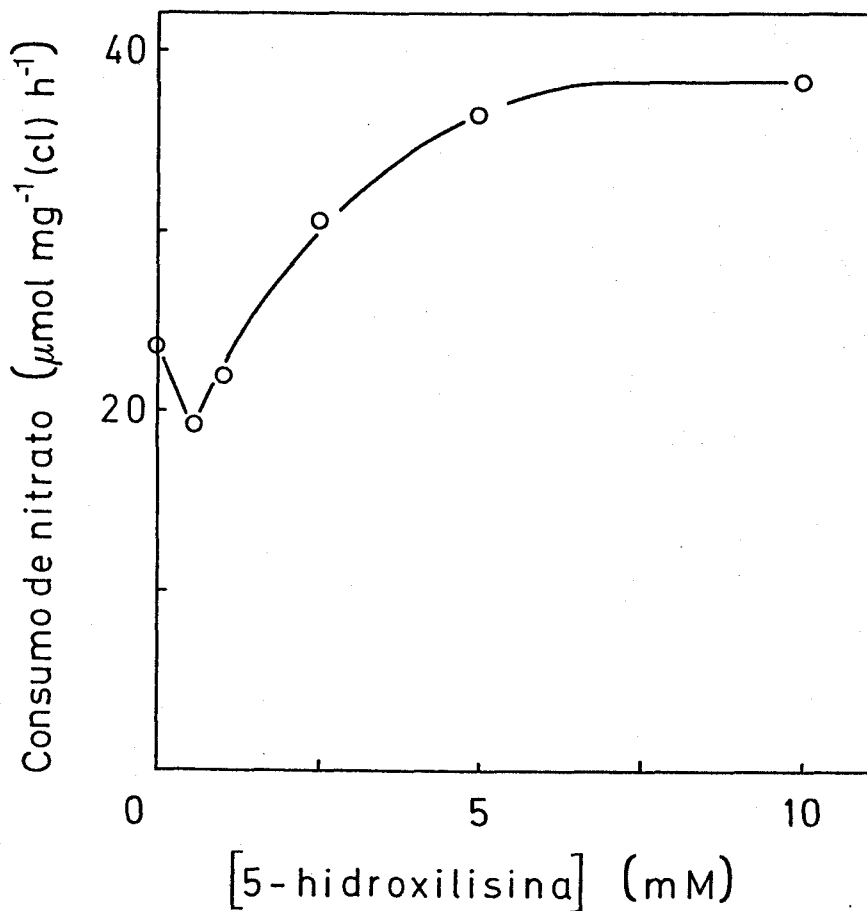


Figura 19. Efecto de la HYL sobre la utilización de nitrato por células de *A. nidulans*

Los experimentos se realizaron en matraces erlenmeyers conteniendo suspensiones con una cantidad de células equivalente a 10 µg cl por ml de tampón de ensayo. Tras 15 min de preincubación a la luz con la correspondiente concentración de HYL, los ensayos se iniciaron encendiendo la luz y añadiendo KNO_3 (0,25 mM) y $NaHCO_3$ (10 mM).

una inhibición parcial de la utilización de nitrato (Fig. 19). El efecto negativo de bajas concentraciones de HYL quedó suprimido por tratamiento de las células con cloruro de magnesio (Tabla XII), el cual inhibe selectivamente a una oxidasa específica de aminoácidos básicos (Pistorius y Voss, 1980; Flores et al., 1982). Este comportamiento podría sugerir que tal L-aminoácido oxidasa sensible a Mg^{2+} catalizara una oxidación de la HYL en la que se liberase amonio, pudiendo éste a su vez inhibir la utilización de nitrato. La Tabla XIII muestra que éste podría ser el caso, puesto que en células tratadas con MSX, la presencia de HYL indujo una acumulación de amonio en el medio que no se observó en presencia de cloruro de magnesio.

Las células tratadas con HYL consumían nitrato y excretaban amonio al medio, siendo la proporción relativa de nitrógeno excretado como amonio dependiente de la concentración de HYL, alcanzando un 73% para 10 mM del inhibidor (Tabla XIV). La existencia de una capacidad residual de asimilación de amonio en células tratadas con HYL se pone de manifiesto al pretratarlas con MSX, observándose en este caso que todo el nitrato consumido se excreta al medio como amonio (Tabla XIV).

Como cabe esperar de la actuación de un inhibidor de la glutamina sintetasa, el tratamiento de células de A. nidulans con HYL afectaba negativamente a la utilización

TABLA XII

Efecto del Cl_2Mg sobre la inhibición por bajas concentraciones de HYL del consumo de nitrato en células de A. nidulans

Concentración de HYL (mM)	Utilización de nitrato (% del control)	
	- Cl_2Mg	+ Cl_2Mg
0,0	100	100
0,5	75	99
1,0	83	100

Los experimentos se desarrollaron en condiciones análogas a las de la Figura 19, excepto que las suspensiones celulares se suplementaron, en su caso, con Cl_2Mg 1 mM. El 100 % corresponde a una velocidad de utilización de nitrato de $24 \mu\text{mol mg}^{-1} (\text{cl})\text{h}^{-1}$.

TABLA XIII

Produccion de amonio dependiente de HYL por células de A. nidulans tratadas con MSX

Adiciones	producción de amonio (nmol mg ⁻¹ (cl))
Ninguna	0,0
Cl ₂ Mg	0,0
HYL	6,2
HYL, Cl ₂ Mg	0,6

Los ensayos se realizaron con suspensiones conteniendo una cantidad de células equivalente a 10 µg cl por ml de tampón de ensayo tratadas con MSX 1 mM. Los ensayos se iniciaban encendiendo la luz y añadiendo HYL (5 mM), y, en su caso, Cl₂Mg (1 mM). Los ensayos se desarrollaron durante 30 min.

TABLA XIV

Producción de amonio dependiente de la reducción de nitrato en células de A. nidulans tratadas con HYL y/o MSX

Tratamiento	Consumo de nitrato ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})$)	Producción de amonio ($\mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})$)
Ninguno	10,0	0,0
MSX	14,0	12,5
HYL (1 mM)	7,7	1,7
HYL (5 mM)	11,3	6,0
HYL (10 mM)	13,2	9,6
MSX, HYL (1mM)	13,6	13,6
MSX, HYL (5mM)	14,0	14,7
MSX, HYL (10mM)	13,0	14,8

Los ensayos se realizaron en idénticas condiciones a las de la Figura 19, excepto que, previo al tratamiento con HYL, las células fueron preincubadas durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX 1 mM. El experimento se desarrolló durante 30 min.

de amonio. La Figura 20 muestra que la inhibición por HYL del consumo de amonio es claramente dependiente de la concentración del inhibidor, alcanzándose un 50% de inhibición a concentraciones de HYL de 1 mM, e inhibición prácticamente total (95%) a 20 mM de HYL. Es interesante señalar que para la GS de Anabaena se ha observado in vitro una inhibición reversible y gradual en función de la concentración de HYL (Ladha et al., 1978).

La inhibición in vivo de la GS de A. nidulans por tratamiento con HYL de las células se infiere de los resultados presentados en la Tabla XV. Células de Anacystis asimilando activamente amonio como fuente de nitrógeno presentaban altos niveles intracelulares de glutamina y niveles relativamente bajos de glutamato y otros aminoácidos (Tabla XV). El tratamiento de las células con HYL 10 mM, que inhibe la asimilación de amonio en un 85% (Fig. 20), resultaba en una acumulalación sustancial de glutamato a expensas de la glutamina existente, mientras que no se observaban cambios significativos en los niveles de otros aminoácidos, excepto un ligero incremento en alanina y glicina y un descenso en serina y tirosina (Tabla XV). Estos resultados indican que el principal efecto de la HYL in vivo es la inhibición de la GS.

En correlación con su efecto inhibitor sobre la utilización de amonio, concentraciones crecientes de HYL inducían una liberación gradual de la inhibición por amonio de la

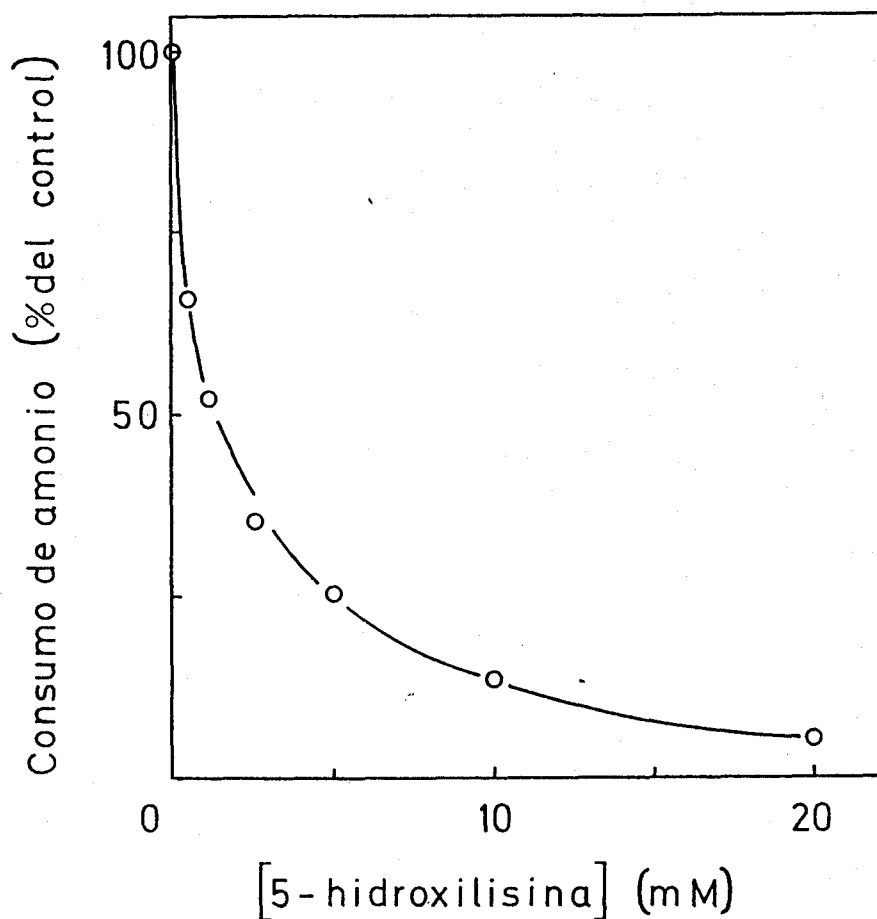


Figura 20. Efecto de la HYL sobre la utilización de amonio en células de A. nidulans

Los experimentos se realizaron en idénticas condiciones a las de la Figura 19, excepto que el ensayo se inició encendiendo la luz y añadiendo NH_4Cl 0,25 mM. El 100% corresponde a una velocidad de consumo de amonio de $48,6 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$.

TABLA XV

Niveles intracelulares de aminoácidos libres en células de A. nidulans sin tratar y tratadas con HYL

Aminoácido	Nivel (nmol mg ⁻¹ (c1))	
	- HYL	+ HYL
Alanina	199	318
Aspártico	229	220
Glutamina	5555	92
Glutamato	917	2337
Glicina	503	782
Serina	182	63
Tirosina	45	<1
Otros aminoácidos(a)	<1	<1

Los niveles intracelulares de aminoácidos libres se determinaron en extractos ácidos (Materiales y Métodos, apartados 2.2.5. y 2.4.5.) de células no tratadas y tratadas con HYL 10 mM, tras 15 min en la luz en presencia de NH₄Cl 0,25 mM y NaHCO₃ 10 mM.

(a) Asparragina, arginina, citrulina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.

utilización de nitrato (Fig. 21), alcanzándose velocidades máximas de utilización de nitrato, análogas a las de células control no expuestas a amonio, a concentraciones de HYL de 20 mM. En células tratadas con HYL, las velocidades de consumo de nitrato en presencia de amonio (Fig. 21) se correlacionaban inversamente con las velocidades observadas de consumo de amonio (Fig. 20) para diferentes concentraciones del compuesto, habiéndose calculado un coeficiente de correlación de 0,954 ($\beta < 0,001$) (Fig. 22). Esta estrecha correlación indica que la magnitud de la inhibición causada por el amonio sobre la utilización de nitrato depende de la capacidad de asimilación de amonio.

Las células de A. nidulans con capacidad limitada de asimilar amonio por tratamiento con HYL parecían un sistema muy adecuado para estudiar el posible antagonismo existente entre el amonio y el CO_2 en la regulación de la utilización de nitrato. En ausencia de amonio añadido, las células consumían nitrato a velocidades moderadas en atmósfera de aire ($10 \mu\text{M CO}_2$), induciendo la adición de bicarbonato un incremento del consumo de nitrato de 12 a $31 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$. En presencia de amonio y atmósfera de aire, células sin tratar utilizaban nitrato a baja velocidad, observándose una potenciación del efecto inhibitor de 1 amonio en respuesta a la adición de bicarbonato (Fig 23A). Por el contrario, en células tratadas con HYL 2 mM, que consumían nitrato en aire a baja velocidad, la presencia de amonio impedía totalmente el consumo de nitrato, resultando la adición de bicarbonato

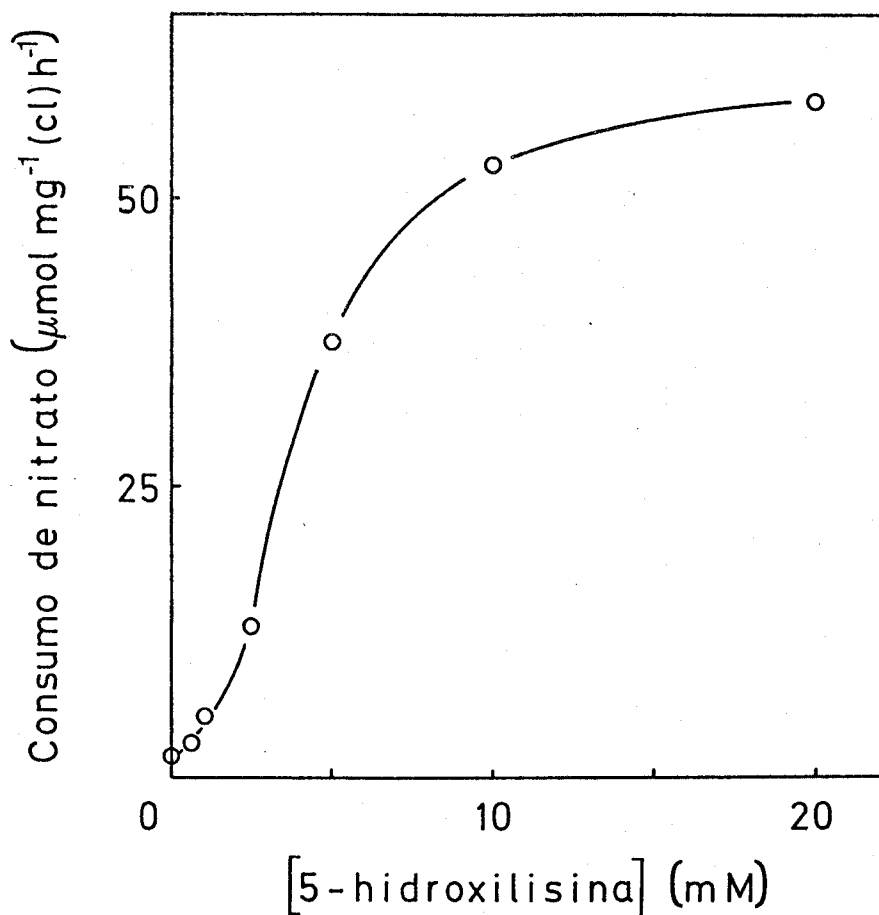


Figura 21. Efecto de la HYL sobre la inhibición por amonio de la utilización de nitrato por células de A. nidulans

Los experimentos se desarrollaron como se describe en la Figura 19, excepto que al inicio de los ensayos se añadió también NH_4Cl 0,5 mM.

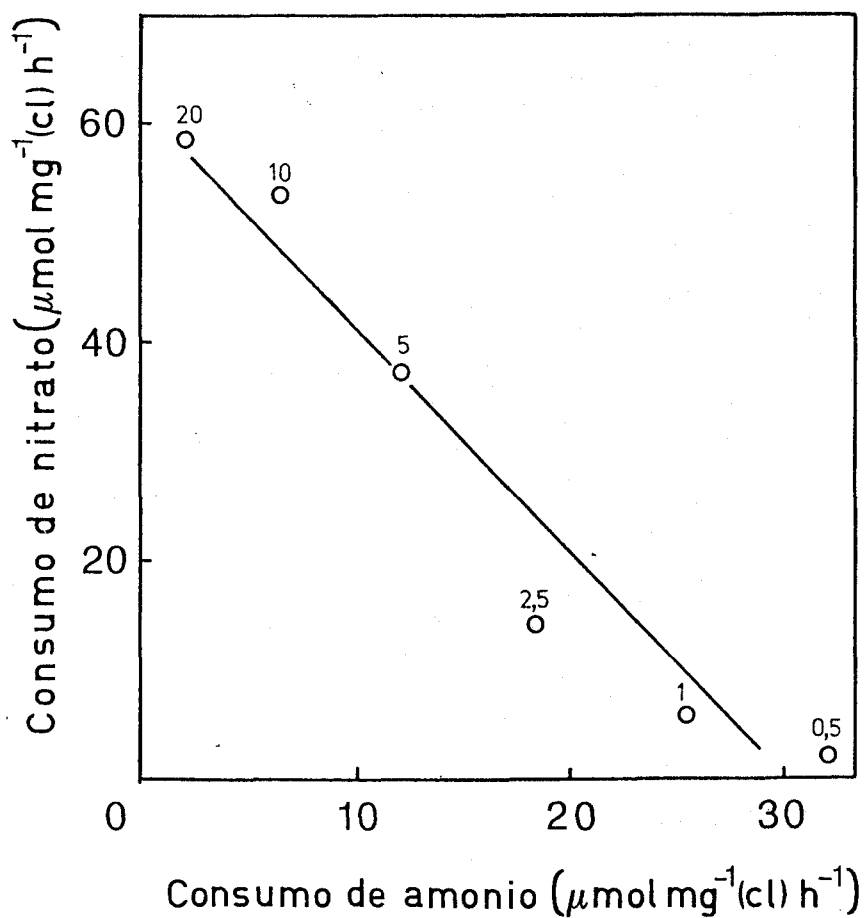


Figura 22. Correlación entre el consumo de nitrato en presencia de amonio y la velocidad de utilización de amonio por células de A. nidulans tratadas con HYL

Se representan los datos correspondientes a las Figuras 20 y 21. Los números sobre los puntos corresponden a las concentraciones de HYL (mM) con las que se trataron las células.

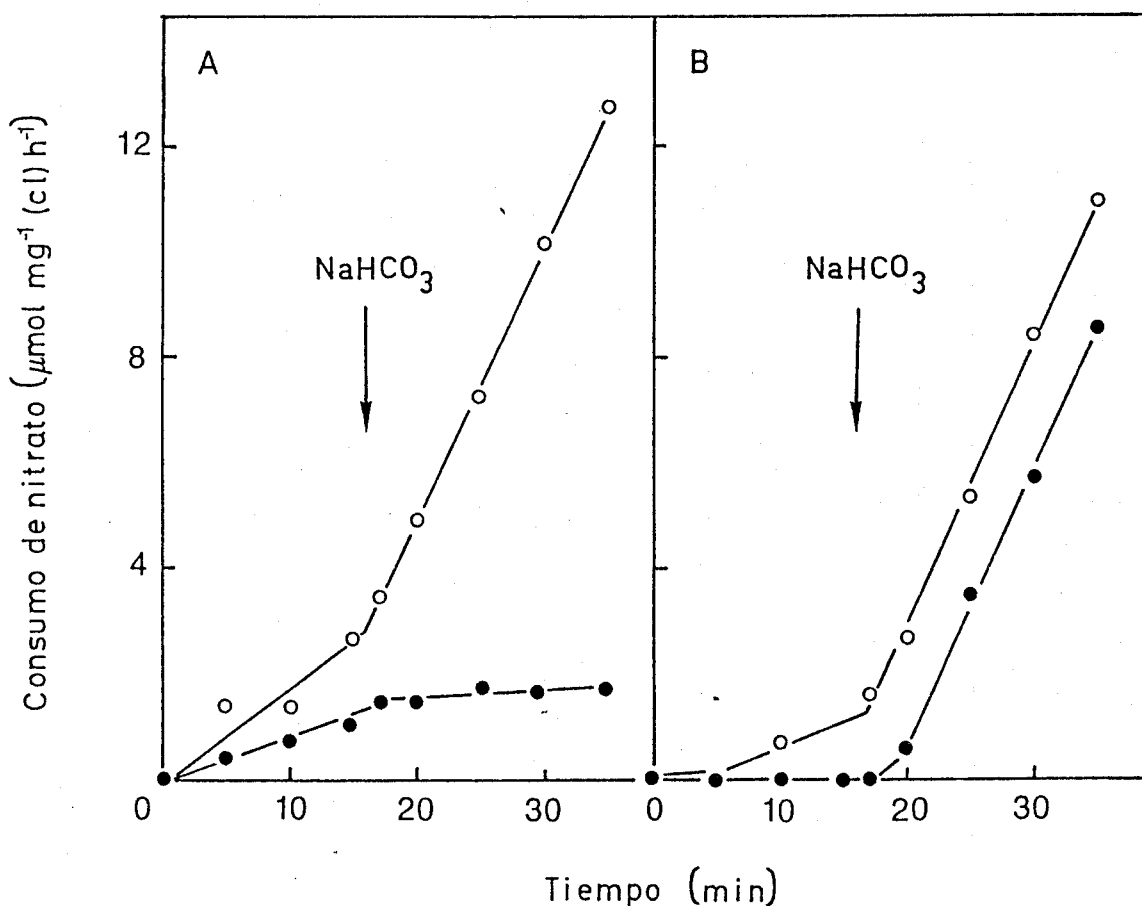


Figura 23. Efecto de la adición de bicarbonato sobre la inhibición por amonio de la utilización de nitrato en células de *A. nidulans*

Los ensayos se realizaron con suspensiones conteniendo $10 \mu\text{g cl por ml}$ de tampón de ensayo, preincubadas en la luz bajo una atmósfera de aire como única fuente de CO_2 en ausencia (A) o presencia (B) de HYL 2 mM. A tiempo cero se añadió a las suspensiones celulares KNO_3 0,25 mM (símbolos abiertos) o KNO_3 0,25 mM y NH_4Cl 0,5 mM (símbolos cerrados). Cuando se indica (flecha) se añadió a todas las suspensiones celulares NaHCO_3 10 mM.

en una considerable estimulación del proceso, que alcanzaba velocidades de $31 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$, tanto en presencia como en ausencia de amonio añadido (Fig. 23B), valores similares a los de células control ($36 \mu\text{mol mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$).

El que en células sin tratar la estimulación de la fijación de CO_2 inducida por la adición de bicarbonato potencia la inhibición por amonio del consumo de nitrato (Fig. 23A), puede explicarse teniendo en cuenta que el bicarbonato estimula también notablemente (unas 4 veces) la asimilación de amonio (Fig. 11). En células tratadas con HYL, en las que la asimilación de amonio se encuentra limitada, la estimulación de la fijación de CO_2 por bicarbonato no se acompaña de un efecto similar sobre la asimilación de amonio, resultando, en estas condiciones, anulado el efecto inhibitor del amonio por bicarbonato (Fig. 23B). Estos resultados indican que la velocidad de utilización de nitrato depende de las velocidades relativas de utilización de amonio y fijación de CO_2 , actuando éste último proceso antagónicamente con respecto al amonio en la regulación de la utilización de nitrato.

3.3. TRANSPORTE DE NITRATO. IMPLICACION EN EL CONTROL DE LA UTILIZACION DEL ION

La acumulación intracelular de un nutriente depende, en principio, de dos factores: 1) la velocidad de entrada de dicho compuesto, y 2) la velocidad de metabolización del mismo. En el caso del nitrato, el nivel intracelular de dicho ión estará determinado por el balance entre la velocidad neta de entrada y la velocidad de su reducción a nitrito catalizada por la nitrato reductasa, primer enzima implicado en la asimilación de nitrato. En principio, pues, para una determinada velocidad de entrada, una alta actividad nitrato reductasa determinaría bajos niveles de acumulación de nitrato, mientras que una baja actividad nitrato reductasa permitiría la acumulación de mayores niveles intracelulares de nitrato. Al efecto de establecer las mejores condiciones para el estudio del transporte de nitrato al interior celular, se ha determinado la acumulación de nitrato en células de A. nidulans con diferentes niveles de actividad nitrato reductasa.

3.3.1. ACUMULACION INTRACELULAR DE NITRATO

La Tabla XVI muestra los niveles intracelulares de nitrato en células de A. nidulans cultivadas en distintas condiciones. Células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, poseyendo altos niveles de actividad nitrato reductasa ($3,94 \text{ mU mg}^{-1}(\text{cl})$), mostraban concentraciones intracelulares de nitrato de $26 \text{ } \mu\text{M}$ tras 60 s de iluminación, en presencia de una concentración extracelular de nitrato de

TABLA XVI

**Concentración intracelular de nitrato en células de A. nidu-
lans cultivadas en distintas condiciones experimentales**

Condiciones de cultivo	Concentración intracelular de nitrato (μM)	ΔG ($\text{KJ mol}^{-1} \text{NO}_3^-$)
Nitrato	26	+8,0
Amonio	0	-
Amonio, nitrato más volframio	212	+13,2

Las determinaciones se realizaron como se indica en Materiales y Métodos (apartados 2.2.2. y 2.4.1.2.) con suspensiones celulares iluminadas durante 60 s en presencia de KNO_3 50 μM . Los cambios de energía libre se estimaron según la ecuación

$$\Delta G = RT \ln ([\text{NO}_3^-]_i / [\text{NO}_3^-]_e) + ZF\Delta\psi$$

para un potencial de membrana de -100 mV y una temperatura de 298 K.

50 μM (Tabla XVI). En células cultivadas con amonio como única fuente de nitrógeno, en las que la síntesis de los enzimas del sistema reductor de nitrato se encuentra reprimida (Herrero et al., 1981), poseyendo muy bajos niveles de actividad nitrato reductasa ($0,27 \text{ mU mg}^{-1}(\text{cl})$), no se detectó acumulación intracelular de nitrato (Tabla XVI). En cambio, los niveles intracelulares de nitrato se incrementaron notablemente cuando células de A. nidulans cultivadas en medio con amonio se incubaron en un medio con nitrato en el que el molibdeno se había sustituido por volframio (ver apartado 2.1.2.). En estas condiciones se sintetiza nitrato reductasa, pero la enzima es mayoritariamente inactiva por incorporar volframio en lugar de molibdeno (Candau, 1979). En este tipo de células (que se denominarán células tratadas con volframio), con baja actividad nitrato reductasa ($0,1 \text{ mU mg}^{-1}(\text{cl})$), se determinaron niveles intracelulares de nitrato de $212 \mu\text{M}$ para 60 s de iluminación, cuando las células se incubaron en presencia de nitrato a una concentración extracelular de $50 \mu\text{M}$.

Aún en células cultivadas en nitrato, que alcanzaron unos niveles intracelulares de nitrato inferiores a los del medio ($26 \mu\text{M}$), el cambio de energía libre para la entrada de nitrato en estas condiciones, calculado para un potencial de membrana de -100 mV (Paschinger, 1977; Zdrou y Tromballa, 1981; Peschek et al., 1985) resultó ser de $+8 \text{ KJ}$ por mol de nitrato transportado al interior celular (Tabla XVI). El valor del cambio de energía libre es aún más positivo en células tratadas con volframio que registran niveles más altos de nitrato intracelular. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un sistema de transporte de nitrato en

A. nidulans de naturaleza endergónica que permite acumular nitrato intracelularmente en contra del gradiente electroquímico del ión. Los datos de la Tabla XVI sugieren también que el sistema de transporte de nitrato podría estar sometido a represión nutricional por amonio, como es el caso para los enzimas del sistema reductor del nitrato.

Puesto que células tratadas con wolframio presentan mayores niveles intracelulares de nitrato, se han utilizado para ensayar el transporte de nitrato en Anacystis. La Figura 24 muestra una típica cinética de acumulación intracelular de nitrato en células tratadas con wolframio en función del tiempo de iluminación. Para una concentración extracelular de nitrato de 50 μM , los niveles intracelulares del ión resultaron ser del orden de 400 μM tras 2 min, lo que supone una acumulación de 8 veces respecto a la concentración de nitrato en el medio externo. Sin embargo, es necesario hacer notar que los niveles intracelulares de nitrato, estimados en experimentos independientes, oscilaron entre 150 y 800 μM , lo que podría estar relacionado con diferencias en la relación entre actividad del sistema de transporte y actividad nitrato reductasa.

Los resultados muestran la existencia de un sistema de transporte activo de nitrato en A. nidulans, operativo en células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, pero no en células cultivadas con amonio.

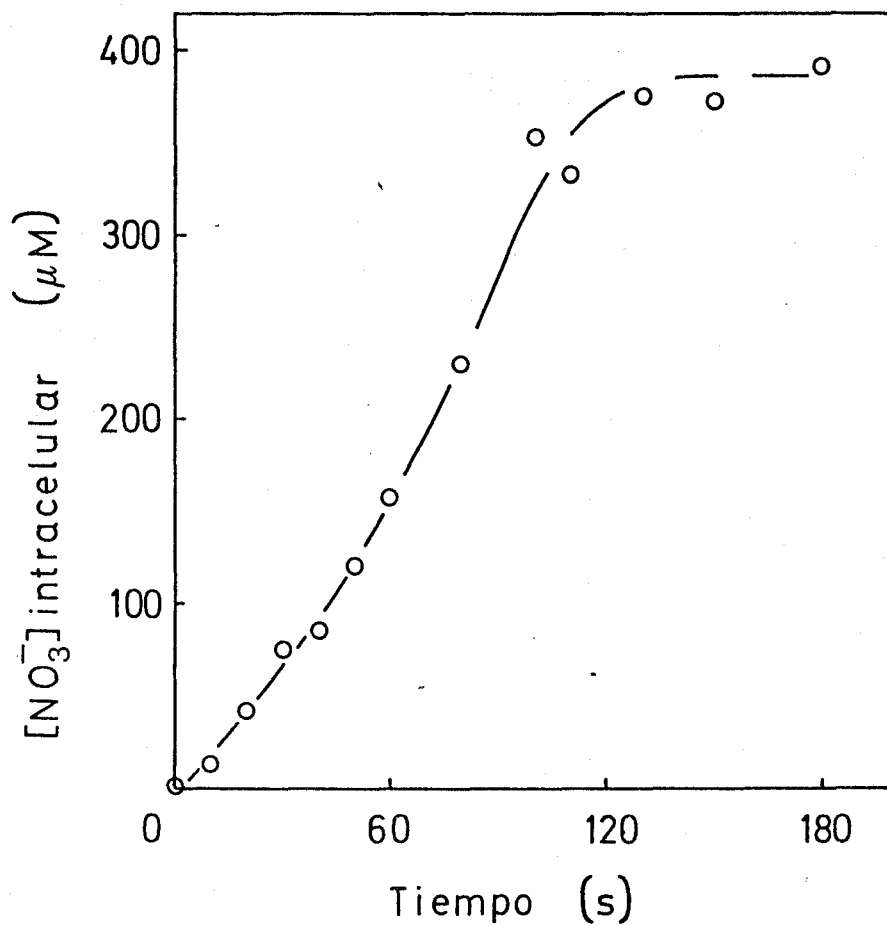


Figura 24. Acumulación intracelular de nitrato con respecto al tiempo en células de *A. nidulans*

El experimento se realizó con suspensiones de células tratadas con wolframio como se indica en la Tabla XVI.

3.3.2. REGULACION DEL TRANSPORTE DE NITRATO POR AMONIO Y CO₂

La entrada de nitrato ha sido propuesta como el punto de regulación por amonio y CO₂ de la asimilación de nitrato (Flores et al., 1983 b,c). Para comprobar esta hipótesis, se ha estudiado el efecto del amonio y del CO₂ sobre la acumulación intracelular de nitrato en células tratadas con volframio.

La Figura 25 muestra el efecto de la presencia de amonio en el medio sobre el transporte de nitrato en células tratadas con volframio. Mientras en ausencia de amonio añadido se observó acumulación creciente de nitrato intracelular, el amonio, añadido antes del nitrato, previno totalmente dicha acumulación (Fig. 25). Como se muestra en la Tabla XVII, el efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de nitrato no se manifiestaba en células tratadas con MSX, que alcanzaban niveles intracelulares de nitrato similares a los de células control, tanto en ausencia como en presencia de amonio añadido. Estos resultados indican que el efecto negativo del amonio sobre el transporte de nitrato no es ejercido por el amonio per se, sino que está mediado por productos de su asimilación.

La dependencia por CO₂ del transporte de nitrato se ha ensayado con ayuda de DLG. El tratamiento de células con DLG 30 mM, que inhibe drásticamente la fijación de CO₂ (ver apartado 3.2.2.), impidió totalmente la acumulación in-

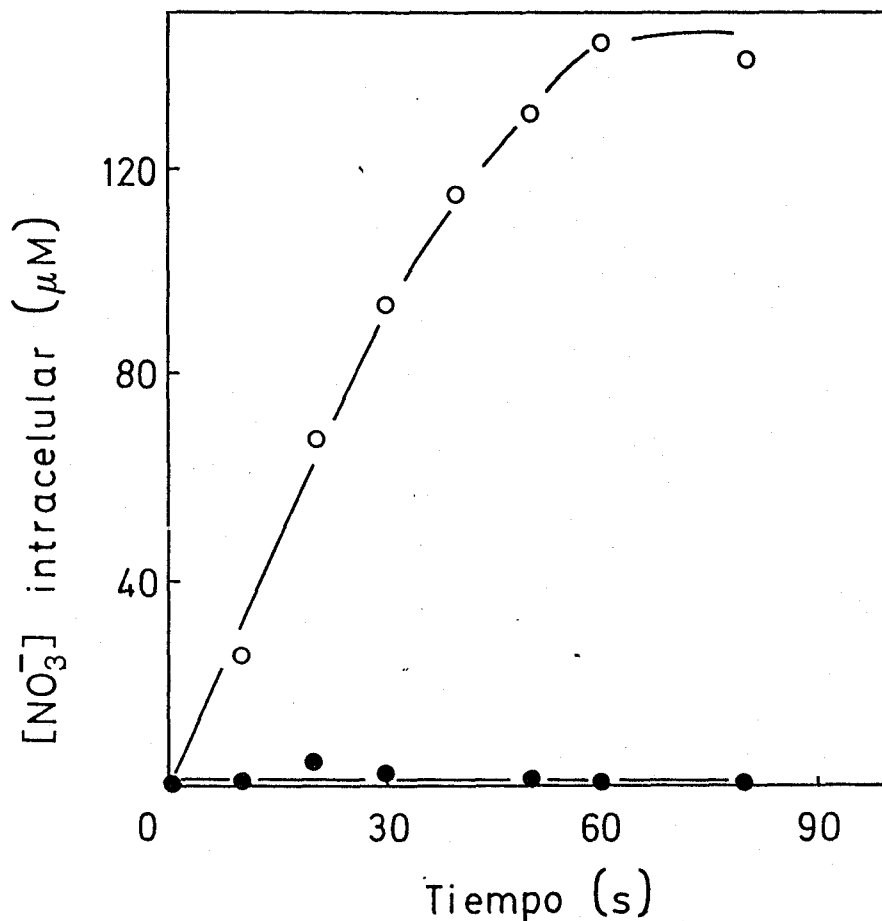


Figura 25. Efecto del amonio sobre el transporte de nitrato en células de A. nidulans.

El experimento se realizó en las mismas condiciones que en la Figura 24, excepto que las células se preincubaron en la luz durante 5 min en ausencia (O) o presencia (●) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 mM.

TABLA XVII

Prevención por MSX de la inhibición del transporte de nitrato causada por amonio en A. nidulans

Tratamiento	Concentración intracelular de nitrato (μM)	
	t= 30s	t= 60s
Ninguno	139	208
Amonio	6	0
MSX	121	225
MSX, amonio	136	211

Las condiciones experimentales fueron análogas a las de la Tabla XVI, excepto que las suspensiones celulares se preincubaron durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX 1 mM, y posteriormente 5 min, también a la luz, en ausencia o presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 mM. Los ensayos se iniciaron al añadir KNO_3 50 μM .

tracelular de nitrato, tanto a 30 como a 60 s de iluminación (Tabla XVIII). Como se había observado para el consumo de nitrato, cuando las células de A. nidulans se trataron previamente con MSX, la inhibición del transporte de nitrato inducida por el tratamiento con DLG no tuvo lugar, y las células acumularon nitrato a niveles similares a los de células control (Tabla XVIII). Estos datos indican que el transporte de nitrato en A. nidulans depende de la fijación de CO₂ y está relacionado con la inhibición por amonio del proceso, siendo necesaria una asimilación activa de amonio para que se manifieste el requerimiento por fijación de CO₂ del transporte de nitrato.

Los resultados presentados en este apartado indican que el transporte de nitrato en A. nidulans se encuentra regulado conjuntamente por productos de la asimilación de amonio y de la fijación de CO₂.

TABLA XVIII

Inhibición por DLG del transporte de nitrato en A. nidulans y su prevención por MSX

Tratamiento	Concentración intracelular de nitrato (μM)	
	t= 30s	t= 60s
Ninguno	139	208
DLG	0	0
MSX	121	225
MSX, DLG	141	196

Las condiciones fueron análogas a las de la Tabla XVI, excepto que las células se preincubaron durante 15 min a la luz en ausencia o presencia de MSX 1 mM, para posteriormente ser incubadas 15 min en la oscuridad, en ausencia o presencia de DLG 30 mM. Los ensayos se iniciaron añadiendo KNO_3 50 μM .

4. DISCUSSION

La propuesta de que la reducción del nitrato en cianobacterias y algas verdes es de naturaleza fotosintética (Losada, 1980; Losada et al., 1981) se ha basado especialmente en resultados de estudios con preparaciones de membranas fotosintéticas capaces de reducir fotoquímicamente nitrato a amonio (Paneque et al., 1969; Candau et al., 1976), así como con células incapaces de asimilar el amonio resultante de la reducción del nitrato. En lo referente al segundo caso, tanto en cianobacterias tratadas con MSX (Flores et al., 1983b) como en algas verdes expuestas a atmósfera carente de CO₂ (Syrett y Morris, 1963; Thacker y Syrett, 1972; Larsson et al., 1982; Flores et al., 1983b), se ha puesto de manifiesto la reducción fotoquímica del nitrato, con una estequiometría de dos moles de oxígeno producido por mol de nitrato reducido a amonio (Thacker y Syrett, 1972; Losada et al., 1981; Syrett, 1981; Larsson et al., 1982; Flores et al., 1983b). Estas observaciones, que indican un acoplamiento *in vivo* entre la reducción del nitrato y la fotólisis del agua, se han llevado a cabo en células cuya capacidad metabólica se encuentra limitada, lo que puede hacer discutible la extensión de estas conclusiones a células en condiciones normales de crecimiento.

Las condiciones experimentales seleccionadas para las experiencias que se recogen en el apartado 3.1. han permitido demostrar para Anacystis nidulans la naturaleza fotosintética de la asimilación del nitrato en condiciones totalmente fisiológicas. Cuando la fijación de CO₂ funciona a su máxima capacidad, esto es, a saturación de luz y bicarbonato, la adición de nitrato induce una estimulación del despreñ

dimiento de oxígeno, sin que se deprima la fijación de CO_2 . Estos resultados muestran que, en las condiciones señaladas, la asimilación de nitrato estimula el flujo de electrones no-cíclico en un grado suficiente para cubrir la demanda adicional de poder reductor por parte de este proceso. Esta observación puede considerarse como evidencia concluyente de que, en condiciones fisiológicas, la asimilación de nitrato es un proceso fotosintético (Syrett, 1981), puesto que, en esta situación de saturación de bicarbonato, en que la fijación de CO_2 está operando a máxima capacidad, el desprendimiento extra de oxígeno inducido por nitrato no puede adscribirse a refijación de CO_2 resultante de oxidación de carbohidratos, sino exclusivamente a asimilación fotosintética de nitrato. Los resultados confirman para una cianobacteria observaciones similares de Van Niel et al. (1953) en Chlorella y de Larsson et al. (1982) en Scenedesmus, aunque se contraponen a las de otros autores para otras especies de algas (Bongers, 1958; Grant y Turner, 1969).

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que a saturación de luz no existe competencia por poder asimilatorio entre la asimilación de nitrato y la fijación de CO_2 , generando el aparato fotosintético suficiente poder asimilatorio para que ambos procesos funcionen a máxima capacidad. Por el contrario, cuando el funcionamiento del aparato fotosintético está limitado por la luz, tal competencia sí se manifiesta, observándose en presencia de nitrato una disminución de la velocidad de fijación neta de CO_2 . Competencia por poder asimilatorio entre la asimilación de nitrato y la de CO_2 a bajas intensidades luminosas, pero no a saturación de

luz, se ha observado también en protoplastos de células de hojas de espinaca (Rathnam, 1978), y en células intactas del alga verde Scenedesmus (Larsson et al., 1985). Observaciones similares sobre la asimilación de nitrito en cloroplastos de espinaca y soja (Robinson, 1986) indican, asimismo, que a alta intensidades luminosas no existe competencia por poder asimilatorio entre este proceso y la fijación de CO_2 .

A pesar de que la asimilación de amonio también consume poder asimilatorio, no se ha observado ningún efecto negativo de esta fuente de nitrógeno sobre la fijación de CO_2 , ni incluso a baja intensidad luminosa. Por el contrario, se ha observado una estimulación consistente de la fijación neta de CO_2 . Este efecto estimulador del amonio se ha descrito también en la cianobacteria Anabaena variabilis (Lawrie et al., 1976), en algas verdes (Bassham et al., 1981), y en células aisladas de hojas de plantas (Paul et al., 1978; Woo y Calvin, 1980; Robinson y Baysdorfer, 1985). En células aisladas de hojas de espinaca, la magnitud de la estimulación por amonio de la fijación de CO_2 depende de la concentración de bicarbonato añadido, siendo máxima a saturación de CO_2 (Woo y Calvin, 1980). Este comportamiento, similar al observado en Anacystis, donde la estimulación por amonio es máxima a saturación de luz, sugiere que la estimulación por amonio de la fijación de CO_2 puede ser relevante fisiológicamente en condiciones óptimas de fijación de CO_2 . El efecto estimulador del amonio se elimina en A. nidulans por tratamiento de las células con MSX, lo cual indica que la estimulación de la fijación de CO_2 producida tras la adición de amonio no se debe al ión en sí, como se ha propuesto para

cloroplastos (Tillberg et al., 1977), sino que depende de su asimilación. En Anabaena variabilis, se ha observado también una estimulación de la fijación de CO_2 en oscuridad inducida por amonio y sensible a MSX (Ohmori, 1981). Parece lógico pensar que, en condiciones de utilización de nitrato, la velocidad observada de fijación de CO_2 sería el resultado del balance entre el efecto negativo de la reducción del nitrato y el positivo de la asimilación del amonio resultante.

La asimilación de nitrógeno no sólo afecta cuantitativamente a la fijación neta de CO_2 , sino que también causa alteraciones en la distribución del carbono fijado. Así, tanto el nitrato como el amonio inducen en A. nidulans un incremento en la incorporación de ^{14}C en la fracción soluble en ácido, lo que indica un cambio en el flujo del carbono recién fijado, disminuyendo la fracción insoluble en ácido (glucógeno y proteínas) a la vez que aumenta la fracción soluble (ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares fosfato). Este cambio se elimina también por tratamiento de las células con MSX, indicando la necesidad de que se asimile el amonio para que el nitrógeno ejerza este efecto.

Aunque todavía no se conocen cuales son las bases de la distribución diferencial del carbono en respuesta a la presencia de nitrógeno en el medio, se dispone, sin embargo, de una posible explicación para la estimulación por amonio de la fijación de CO_2 . Si se considera que los compuestos carbonados precursores de aminoácidos como α -cetoglutarato, oxaloacetato y piruvato, tienen un nivel de oxidación mayor que el de los carbohidratos de los que proceden, puede pensarse

que en la conversión de éstos en aquellos se libera una cierta cantidad de poder asimilatorio. Así, cuando se está asimilando nitrógeno, la conversión de carbohidratos en cetoácidos aceptores generaría poder asimilatorio extra, lo que podría minimizar la competencia por poder asimilatorio entre la asimilación de nitrógeno y la fijación de CO_2 . Esto explicaría que la fijación de CO_2 se estimule por la asimilación de amonio, a pesar de que éste último proceso consume dos equivalentes de reducción y un ATP por cada amonio asimilado. Adicionalmente, podrían darse efectos de productos de la asimilación del amonio que redundasen también positivamente sobre la fijación de CO_2 , como pudiera ser, entre otros, la modulación de enzimas implicados en la asimilación de CO_2 .

En resumen, la asimilación de nitrato deprime la fijación de CO_2 a limitación pero no a saturación de luz, indicando esta depresión la competencia entre ambos procesos por poder asimilatorio. Por el contrario, la asimilación de amonio estimula la fijación de CO_2 a cualquier intensidad luminosa ensayada, siendo éste efecto dependiente de la incorporación de nitrógeno a esqueletos carbonados, y ocurriendo lógicamente también cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno. Por otra parte, la asimilación de cualquier forma de nitrógeno inorgánico induce cambios en el flujo del carbono recién fijado hacia la fracción soluble en ácido, que se anulan al inhibir la asimilación de amonio.

En la segunda vertiente de las interrelaciones entre el metabolismo fotosintético de carbono y nitrógeno, esto es, la referente a efectos del carbono sobre la asimilación

de nitrógeno, destaca el requerimiento por CO_2 de la asimilación de nitrógeno inorgánico. Como ocurre en algas eucarióticas y otras cianobacterias (Warburg y Negelein, 1920; Hattori, 1962; Eisele y Ullrich, 1977; Losada et al., 1981), tanto la utilización de nitrato como la de amonio por células de A. nidulans se encuentran totalmente impedidas en ausencia de CO_2 (Flores et al., 1983c; Boussiba et al., 1984), aumentando la velocidad de ambos procesos con la disponibilidad de sustrato carbonado (Flores et al., 1983c; apartado 3.2.1.). En principio, la utilización de cualquier forma de nitrógeno inorgánico presenta un requerimiento obligado por productos de la fijación de CO_2 , a nivel de la asimilación de amonio, como consecuencia de la demanda metabólica de esqueletos carbonados, principalmente α -cetoácidos, por parte del ciclo GS/GOGAT y reacciones de transaminación relacionadas. En el apartado 3.2.1. se muestra que, en términos cuantitativos, la dependencia por CO_2 de la asimilación de amonio es bastante menos estricta que la de nitrato. El hecho de que la asimilación de amonio transcurra a velocidad máxima cuando la fijación de CO_2 es sólo un tercio de la máxima alcanzable, puede indicar que la dependencia del proceso por productos de la fijación de CO_2 se derive exclusivamente del requerimiento de α -cetoácidos para el funcionamiento del ciclo GS/GOGAT, mientras que en caso de la asimilación de nitrato, cuya dependencia por la fijación de CO_2 es mucho más estricta, exista un requerimiento adicional por productos de la fijación de CO_2 , que podría tener carácter regulatorio.

El efecto negativo del DLG, tanto sobre la utilización de nitrato como sobre el desprendimiento de oxígeno

asociado al proceso, es consecuencia de su efecto inhibitor específico sobre la fijación de CO_2 . Por otro lado, la capacidad de MSX y azaserina para prevenir la inhibición por DLG de la asimilación de nitrato, elimina la posibilidad de que el DLG inhiba la utilización de nitrato afectando directamente a su transporte o a su reducción. Así, los resultados presentados en el apartado 3.2.2. demuestran que en A. nidulans el requerimiento por CO_2 de la utilización de nitrato es, de hecho, un requerimiento por productos derivados de la fijación fotosintética de CO_2 . Por otra parte, los resultados de la combinación de tratamientos con DLG y MSX o azaserina indican que el requerimiento por CO_2 se relaciona con la inhibición de la utilización de nitrato inducida por el amonio (ver Guerrero et al., 1981; Guerrero y Lara, 1986). De hecho, el que la inhibición de la asimilación de amonio resulte tanto en la prevención del efecto negativo del amonio (Flores et al., 1980; 1983a), como del requerimiento por CO_2 de la utilización de nitrato (Flores et al., 1983a,b; apartado 3.2.2.), indica una estrecha conexión entre la fijación de CO_2 y la asimilación de amonio en el control de la utilización de nitrato. Esta conexión resulta evidente en células de A. nidulans tratadas con HYL, en las que la asimilación de amonio está inhibida parcialmente. En estas células, la estimulación de la fijación de CO_2 inducida por adición de bicarbonato, resulta en la eliminación del efecto negativo del amonio sobre la asimilación de nitrato.

Todo lo anterior está de acuerdo con un modelo de regulación de la asimilación de nitrato propuesto previamente (Flores et al., 1983c). De acuerdo con este modelo (ver

esquema III de la Introducción), la utilización de nitrato estaría controlada negativamente por ciertos compuestos orgánicos nitrogenados derivados de su propia asimilación vía amonio. La concentración intracelular de estos compuestos inhibidores estaría determinada, de una parte, por el aporte de amonio, a partir del cual se formarían y, de otra, por el suministro de productos de la fijación de CO₂, los cuales, en el curso del metabolismo celular, se combinarían con los inhibidores derivados del amonio, originando otros compuestos nitrogenados no inhibidores. Así, impidiendo la asimilación de CO₂ con DLG, o limitando la velocidad de fijación de CO₂ por luz o por la disponibilidad de CO₂, se favorecería la acumulación de metabolitos inhibidores que impedirían parcial o totalmente la utilización de nitrato. Inhibiendo la asimilación de amonio y, por tanto, la generación de inhibidores, el consumo de nitrato se liberaría del requerimiento por productos de la fijación de CO₂. La actuación de este sistema de regulación permitiría que el control de la utilización de nitrato se ejerciese no sólo por productos derivados de su propia asimilación, sino también por la disponibilidad de CO₂, consiguiéndose así un estricto control de la utilización de nitrato por el balance entre la asimilación de nitrógeno y la de carbono.

Los resultados presentados en el apartado 3.2.3. indican que el consumo de nitrato en células de A. nidulans se encuentra controlado por la asimilación del amonio resultante de la reducción del propio nitrato (Flores et al., 1980). Así, cuando se inhibe la asimilación de amonio por tratamiento de las células con HYL, la entrada y reducción de

nitrate resulta estimulada, en mayor o menor grado, dependiendo de la concentración de HYL. En células tratadas con diferentes concentraciones de HYL, las velocidades de consumo de nitrato en presencia de amonio se correlacionan inversamente con las velocidades de consumo de amonio, lo que indica que la utilización de nitrato está de hecho controlada por la capacidad de asimilación de amonio.

Se ha propuesto que este sistema de regulación de la utilización de nitrato actuase a nivel de la entrada de nitrato a la célula (Flores et al., 1983b,c; Guerrero y Lara, 1986). No obstante, no se dispone de evidencias directas que permitan apoyar esta hipótesis, aunque la existencia de un sistema de transporte de nitrato en cianobacterias se ha sugerido por distintos autores (Ohmori et al., 1977; Rai et al., 1981; Flores et al., 1983a,b).

Los resultados presentados en el apartado 3.3. ponen de manifiesto que A. nidulans acumulan nitrato en contra del gradiente electroquímico del ión, en un proceso de naturaleza endergónica, que indica la operatividad de un sistema de transporte activo de nitrato. Esta capacidad de acumulación no se ha observado en células de A. nidulans cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno, mientras que sí es manifiesta en células cultivadas con nitrato, lo que sugiere que la síntesis del sistema de transporte de nitrato se encuentra sujeta a represión nutricional por amonio.

La acumulación neta de nitrato en el interior celu-

lar se ha conseguido magnificar empleando células tratadas con volframio (ver apartado 3.3.1.), que muestran bajos niveles de actividad nitrato reductasa, lo que hace a estas células como especialmente idóneas para el estudio del transporte de nitrato. Los resultados presentados indican que el transporte de nitrato en A. nidulans se inhibe drásticamente en presencia de amonio y muestra un requerimiento estricto por fijación activa de CO₂, que se pone de manifiesto al inhibir este último proceso por tratamiento de las células con DLG. Por otra parte, tanto la inhibición por amonio como el requerimiento por CO₂ del transporte de nitrato en A. nidulans se eliminan al impedir la asimilación de amonio mediante tratamiento de las células con MSX. El paralelismo existente entre el comportamiento de la utilización de nitrato y el de su acumulación intracelular frente a los efectos de amonio y CO₂ es altamente indicativo de que sea el transporte de nitrato el proceso sujeto a regulación según el sistema de control discutido anteriormente, en el que participarían de forma concertada productos derivados de la asimilación de amonio y CO₂.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha confirmado la naturaleza fotosintética de la asimilación de nitrato por células de A. nidulans en condiciones fisiológicas. A intensidades luminosas saturantes para la fotosíntesis, la utilización de nitrato no compete con la fijación de CO_2 por poder asimilatorio, mientras que tal competencia tiene lugar a baja intensidad de luz, resultando la fijación de CO_2 disminuida en presencia de nitrato.
2. El amonio estimula la fijación de CO_2 en A. nidulans independientemente de la intensidad luminosa. Esta estimulación requiere la incorporación del amonio a esqueletos carbonados.
3. El amonio, independientemente de la intensidad luminosa, y el nitrato, a intensidades luminosas no saturantes para la fotosíntesis, inducen cambios en la distribución del carbono recién fijado, que fluye preferencialmente hacia metabolitos solubles en ácido. Este efecto de la fuente de nitrógeno depende también de la asimilación del amonio.
4. Tanto la asimilación de nitrato como la de amonio por células de A. nidulans son estrictamente dependientes de la fijación activa de CO_2 , que suministra los compuestos carbonados en los que se incorpora el nitrógeno. La asimilación de nitrato muestra, además, una dependencia de carácter regulador por productos de la fijación de CO_2 .

5. Se ha verificado que el amonio y el CO_2 participan de forma antagónica en la regulación de la utilización de nitrato en A. nidulans. La velocidad del proceso estaría determinada por el balance relativo entre la fijación del CO_2 y la asimilación del amonio resultante de la reducción del nitrato.

6. Se ha puesto de manifiesto la existencia de un transporte de nitrato de naturaleza endergónica en A. nidulans, que permite acumular nitrato en contra del gradiente electroquímico del ión.

7. El transporte de nitrato en células de A. nidulans está sujeto a regulación por productos derivados de la asimilación de amonio y CO_2 , representando el primer punto de control en la utilización de nitrato.

6. BIBLIOGRAFIA

- Anderson JW y Done J (1978) *Plant Physiol.*, **61**:692-697.
- Arnon DI, McSwain BD, Tsujimoto HY y Wada K (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **375**:231-245.
- Atwood JG, Schmidt GJ y Slavin W (1979) *J. Chromatogr.*, **171**: 109-115.
- Bamberger ES y Avron M (1975) *Plant Physiol.*, **56**:481-485.
- Bassham JA, Larsen PD, Lawyer AL y Cornwell KL (1981) En "Nitrogen and Carbon Metabolism" (JD Bewley, ed.), Martinus Nijhoff/Dr W Junk, The Hague, pp. 135-136.
- Beckman (1982) *Liquid Scintillation Systems: LS5800 series*, pp. 5.1-5.15.
- Bergman B (1984) *Arch. Microbiol.*, **137**:21-25.
- Bergmeyer HU (1974) *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 2ª ed., Verlag Chemie, Weinheim.
- Betlach MR, Tiedje JM y Firestone RB (1981) *Arch. Microbiol.*, **129**:135-140.
- Bongers LHJ (1958) *Neth. J. Agric. Sci.*, **6**:70-88.
- Boussiba S, Resch CM y Gibson J (1984) *Arch. Microbiol.* **138**: 287-292.
- Candau P (1979) *Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.*
- Candau P, Manzano C y Losada M (1976) *Nature*, **262**:715-717.
- Cawse PA (1967) *Analyst.*, **92**:311-315.

- Colman B, Cheng KH y Ingle RK (1976) *Plant Sci. Lett.*, **2**:217-219.
- Coronil T (1985) Tesis de Licenciatura, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Cramer M y Myers J (1949) *J. Gen. Physiol.*, **32**:93-102.
- Cresswell RC y Syrett PJ (1979) *Plant Sci. Lett.*, **14**:321-325.
- Deane-Drumond CE y Glass ADM (1983) *Plant Physiol.*, **73**:100-104.
- Delieu T y Walker DA (1972) *New Phytol.*, **71**:201-235.
- Döhler G (1976) *Planta (Berlin)*, **131**:129-133.
- Döhler G (1982) *Z. Naturforsch.*, **37**:213-217.
- Eisele R y Ullrich WR (1977) *Plant Physiol.*, **59**:18-21.
- Eppley RW y Rogers JN (1970) *J. Phycol.*, **6**:344-351.
- Fay P (1983) En "The Blue-Green", *Studies in Biology*, Nº 160, London:Edward Arnold.
- Flores E (1982) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Flores E, Guerrero MG y Losada M (1980) *Arch. Microbiol.* **128**:134-144.
- Flores E, Guerrero MG y Losada M (1983a) *Biochim. Biophys. Acta*, **722**:408-416.

- Flores E, Ramos JL, Herrero A y Guerrero MG (1983b) En "Photosynthetic Prokaryotes: Cell Differentiation and Function" (GC Papageorgiou and L Packer, eds.), pp. 363-387. New York:Elsevier.
- Flores E, Romero JM, Guerrero MG y Losada M (1983c) Biochim. Biophys. Acta, **725**:529-532.
- Flores E, Herrero A y Guerrero MG (1982) Arch. Microbiol., **131**:91-94.
- Fuggi A (1985) Biochim. Biophys. Acta, **815**:392-398.
- Gibson J (1984) Ann. Rev. Microbiol., **38**:135-159.
- Grant BR y Canvin DT (1970) Planta, **95**:227-246.
- Grant BR y Turner IJ (1969) Comp. Biochem. Physiol., **29**:995-1004
- Guerrero MG y Lara C (1986) En "Cyanobacteria: Current Research" (C Van Baalen y P Fay, eds.), Elsevier, North Holland. En prensa.
- Guerrero MG, Manzano C, Cárdenas J y Losada M (1974) Manometría, Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Guerrero MG, Vega JM y Losada M (1981) Ann. Rev. Plant Physiol., **32**:169-204.
- Hattori A (1962) Plant Cell Physiol., **3**:371-377.
- Haystead A, Dharmawardene MWN y Stewart WDF (1973) Plant Sci. Lett., **1**:439-445.

- Heldt MW (1980) *Methods in Enzymology*, **69**:604-613.
- Horecker BL, Smyrniotis PZ y Klenow H (1953) *J. Biol. Chem.*, **205**:661-666.
- Herrero A y Guerrero MG (1986) *J. Gen. Microbiol.*, **132**:2463-2468.
- Herrero A, Flores E y Guerrero MG (1981) *J. Bacteriol.*, **145**:175-180.
- Ihlenfeldt MJA y Gibson J (1975) *Arch. Microbiol.*, **102**:13-21.
- Jansz ER y MacLean FI (1973) *Can. J. Microbiol.*, **19**:497-504.
- Kanazawa TK, Kanazawa MR, Kirk MR y Bassham JA (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **265**:656-669.
- Ladha JK, Rowell P y Stewart WDP (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**:688-696.
- Larsson M, Ingermarson B y Larsson CM (1982) *Physiol. Plant.*, **55**:301-308.
- Larsson M, Olsson T y Larsson CM (1985) *Planta*, **164**:246-253.
- Lawrie AC, Codd GA y Stewart WDP (1976) *Arch. Microbiol.*, **107**:15-24.
- Lea PJ, Joy KW, Ramos JL y Guerrero MG (1984) *Phytochemistry*, **23**:1-6.
- Lea PJ, Mills WR, Walsgrove RM y Mifflin BJ (1982) En "On the Origins of Chloroplasts" (JA Schiff, ed.), pp. 149-178. Elsevier North Holland, New York.

- Lex M, Silvester WB y Stewart WDP (1972) Proc. R. Soc. London, Ser. B, **180**:87-102,
- Lorimer GH (1983) TIBS, **10**:65-68.
- Losada M (1980) Congress of Federation of European Societies of Plant Physiology, Conference Proceedings, II, pp.112-113, Santiago.
- Losada M, Guerrero MG y Vega JM (1981) En "Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur" (H Bothe y A Trebst, eds.), pp. 30-63, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- MacKinney G (1941) J. Biol. Chem., **140**:315-322.
- Manzano C (1977) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Meeks JC (1981) En "Advances in Chemistry Series" (JW Root y KA Krohn, eds.), Vol. 197, pp. 269-294.
- Meeks JC, Steinberg N, Joseph CM, Enderlin CS, Jorgensen PA y Peters GA (1985) Arch. Microbiol., **142**:229-233.
- Meeks JC, Wolk CP, Lockau W, Shilling H, Shaffer PW y Chien WS (1978) J. Bacteriol., **134**:125-130.
- Meeks JC, Wolk CP, Thomas J, Lockau W, Shaffer PW, Austin SM, Chien WS y Galonsky A (1977) J. Biol. Chem., **252**:7894-7900.
- Meeks JC, Wycoff KL, Chapman JS y Enderlin CS (1983) Appl. Environ. Microbiol., **45**:1351-1359.
- Mizioroko HM (1979) J. Biol. Chem., **254**:270-272.
- Ohmori M (1981) Plant Cell Physiol., **22**:709-716.

- Ohmori M, Ohmori K y Strotman H (1977) Arch. Microbiol., **114**:
225-229.
- Ortega T, Castillo F y Cárdenas J (1976) Biochem. Biophys.
Res. Commun., **71**:885-891.
- Paneque A, Aparicio PJ, Cárdenas J, Vega JM y Losada M (1969)
FEBS Lett., **3**:57-59.
- Paschinger H (1977) Arch. Microbiol., **113**:285-291.
- Paul JS, Cornwell KL y Bassham JA (1978) Planta, **142**:49-54.
- Peirson D (1985) Plant Physiol., **77**:5-8.
- Pelroy RA y Bassham JA (1972) Arch. Mikrobiol., **86**:25-38.
- Peschek GA, Czerny T, Schmetterer G y Nitschmann WH (1985)
Plant Physiol., **79**:278-284.
- Pierce J, Tolbert NE y Barker R (1980) Biochemistry, **19**:934-
942.
- Pistorius EK y Voss H (1980) Biochim. Biophys. Acta, **611**:227-
240.
- Pistorius EK, Funkhouser EA y Voss H (1978) Planta, **141**:279-
282.
- Platt ST, Plant Z y Bassham JA (1977) Plant Physiol., **60**:739-
742.
- Rai AK, Kahyap AP y Gupta SL (1981) Biochim Biophys Acta, **674**:
78-86.
- Ramos JL, Guerrero MG y Losada M (1982) Biochim. Biophys.
Acta, **679**:323-330.

- Rathnam CKM (1978) *Plant Physiol.*, **62**:220-223.
- Rehfield DW y Jensen RG (1973) *Plant Physiol.*, **52**:17-22.
- Robinson JM (1986) *Plant Physiol.*, **80**:676-684.
- Robinson JM y Baysdorfer C (1985) En "Regulation of Carbon Partitioning in Photosynthetic Tissues" (RL Heath y J Preiss, eds.), pp. 333-357, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Schlösser UG (1982) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **95**:181-276.
- Serrano A, Rivas J y Losada M (1981) *Photosynthesis Res.*, **2**: 175-184.
- Serrano A, Rivas J y Losada M (1982) *Photobiochem. Photobiophys.*, **4**:257-264.
- Shelp BJ y Calvin DT (1984) *Can. J. Bot.*, **62**:1398-1403.
- Smith AJ (1973) En "The Biology of the Blue-green Algae" (NG Carr y BA Whitton, eds.), pp. 1-38, Oxford, Blackwell.
- Smith AJ, London J y Stanier RY (1967) *J. Bacteriol.*, **94**: 972-983.
- Snell FD y Snell CT (1949) En "Colorimetric Methods of Analysis", vol. 3, pp. 804-805, Van Nostrand, New York.
- Stanier RY y Cohen-Bazire G (1977) *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**: 225-274.
- Stevens SE y Van Baalen (1973) *Plant Physiol.*, **51**:350-356.
- Stewart WDP (1980a) *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**:497-536.

- Stewart WDP (1980b) En "Microorganisms and Nitrogen Sources" (JW Payne, ed.), pp. 577-607, John Wiley, New York.
- Stewart WDP y Rowell P (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**:846-856
- Stewart WDP, Haystead A y Dharmawardene MWN (1975) En "Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms" (WDP Stewart, ed.), pp. 129-158, Cambridge University Press, Cambridge.
- Stokes DM y Walker DA (1972) *Biochem. J.*, **28**:1147-1157.
- Syrett PJ (1981) *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210**:182-210.
- Syrett PJ y Leftley JW (1976) En "Perspectives in Experimental Biology" (N Sunderland, ed.), Vol 2, pp. 221-234, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Syrett PJ y Morris Y (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **67**:566-575.
- Thacker A y Syrett PJ (1972) *New Phytol.*, **71**:423-433.
- Thayer JR y Huffaker RC (1980) *Anal. Biochem.*, **102**:110-119.
- Thayer JR y Huffaker RC (1982) *J. Bacteriol.*, **149**:198-202.
- Thomas RJ, Hipkin CR y Syrett PJ (1976) *Planta*, **133**:9-13.
- Thomas J, Meeks JC, Wolk CP, Shaffer PW, Austin SM y Chien WS (1977) *J. Bacteriol.*, **129**:1545-1555.
- Thomas J, Wolk CP, Shaffer PW (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**:501-507.

- Tillberg JE, Giersch C y Heber U (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **461**:31-47.
- Tischner R y Lorenzen H (1979) *Planta*, **146**:287-292.
- Tischner R y Schmidt A (1984) *Arch. Microbiol.* **137**:151-154.
- Tung TC, Ling KH, Byrne WL y Lardy HA (1954) *Biochim. Biophys. Acta*, **14**:488-494.
- Ullrich WR (1983) En "Inorganic Plant Nutrition", (A Läuchli y RI Bielecky, eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New series*", Vol. 15 A, pp. 376-397, Springer, Berlin.
- Van Liere L, Walsby AE (1982) En "The Biology of Cyanobacteria" (NG Carr y BA Whitton, eds.), pp. 9-45, Oxford, Blackwell.
- Van Niel CB, Allen MB y Wriqth BE (1953) *Biochim. Biophys. Acta*, **12**:67-74.
- Vennesland B y Guerrero MG (1979) En *Photosynthesis II* (M Gibbs y E Latzko, eds.), "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series", Vol.6, pp. 425-444, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Warburg O y Negelein E (1920) *Biochem. Z.*, **110**:66-115.
- Wolk CP (1973) *Bacteriol. Rev.*, **37**:32-101.
- Wolk CP (1980) En "Nitrogen Fixation" (WE Newton y WH Orme-Johnson, eds.), Vol. 11, pp. 279-292, University Park Press, Baltimore.

Wolk CP (1981) En "The Biochemistry of Plants" (PK Stumpf y EE Conn, eds.), Vol. 1, pp. 659-686, Academic Press, New York.

Wolk CP, Thomas J, Lockau W, Shaffer PW, Austin SM, Chien WS y Galonsky A (1976) J. Biol. Chem., **251**:5027-5034.

Woo KC y Calvin DT (1980) Can. J. Bot., **58**:505-510.

Zdrou I y Tromballa HW (1981) Arch. Microbiol., **129**:325-330.

Zebenboom W, de Groot GJ y Mur LR (1980) Arch. Microbiol., **125**:59-65.

José María Romero Rodríguez
 "Interrelación entre los metabolismos fotosintéticos de carbono y nitrógeno en la cianobacteria Anacystis nidulans".
 APTO Cum Laude

18

Diciembre

86

~~Miguel Ángel~~
 me

~~[Signature]~~

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500293278

FBI E TO-100

293278