

R. 3649



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA CIENCIAS
30-XI-78
ENTRADA N.º 78

TB TD
685-685

ESTUDIOS A NIVEL CELULAR DE LA ASIMILACION DEL NITRATO
EN *Chlorella fusca*. PAPEL REGULADOR DEL AMONIACO Y DE
LA LUZ AZUL

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado D. Fernando Calero Santiago

Sevilla, Diciembre de 1978

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

DIRECTOR

Dr. Pedro J. Aparicio Alonso
Colaborador Científico del
C.S.I.C.

A mis padres

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla.

Agradezco al Prof. D. Manuel Losada Villasante el haberme acogido en su Departamento y al Dr. D. Pedro J. Aparicio Alonso la dirección prestada en esta tesis.

Agradezco igualmente al Prof. Wolfram Ullrich, de quién recibí grandes enseñanzas, la ayuda prestada para la obtención de los resultados que aquí se presentan.

A todos mis compañeros de Departamento les agradezco su aliento y valiosa crítica.

A mis amigos Isabel y Toño, que han prestado una inestimable ayuda en la confección de este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

Asímismo, deseo agradecer a D. José Moreno Fernández y a la Sra. Dña. María José Pérez de León su continua colaboración técnica.

Finalmente, mi agradecimiento a la Universidad de Sevilla, así como al C.S.I.C. por el apoyo económico prestado mediante la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador.

INDICE

ABREVIATURAS.....	X
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIALES Y METODOS.....	23
II.1. CULTIVO DE CELULAS.....	24
II.2. ENZIMAS.....	25
II.2.1. <i>Preparación del extracto celular.....</i>	25
II.2.2. <i>Ensayo de la actividad nitrato reductasa... </i>	26
II.2.3. <i>Ensayo de la actividad nitrito reductasa... </i>	27
II.3. INCORPORACION DE NITRATO, NITRITO Y AMONIO.....	27
II.3.1. <i>Preparación de células para el ensayo de</i> <i>incorporación de nitrato, nitrito o amonio. </i>	28
II.3.2. <i>Obtención de medio de cultivo libre de cé-</i> <i>lulas para la determinación de nitrato, ni</i> <i>trito y amonio.....</i>	30
II.4. ILUMINACION.....	30
II.5. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS...	31
II.5.1. <i>Centrifugaciones.....</i>	31
II.5.2. <i>Determinaciones espectrofotométricas.....</i>	33
II.5.3. <i>Determinación de nitrato.....</i>	33
II.5.4. <i>Determinación de nitrito.....</i>	33
II.5.5. <i>Determinación de amoniaco.....</i>	34

II.5.6. Determinación de clorofila.....	34
II.5.7. Determinación del desprendimiento de oxígeno.....	35
II.5.8. Estimación de la velocidad de fotosín- tesis.....	35
II.5.9. Determinación de proteína.....	36
II.5.10. Medidas de pH.....	36
II.6. REACTIVOS.....	36
II.7. OTROS APARATOS.....	37
III. RESULTADOS.....	38
III.1. ASIMILACION DEL NITRATO POR CELULAS DE <i>Chlo-</i> <i>rella fusca</i> . EFECTO DEL NITRITO, AMONIACO Y OTROS DESACOPLANTES.....	39
III.1.1. Cinética de la incorporación del nitrato en luz blanca.....	39
III.1.2. Efecto inhibitor del nitrito en la incor- poración del nitrato.....	41
III.1.3. Efecto inhibitor del amonio en la incor- poración del nitrato.....	43
III.1.4. Inhibición de la incorporación de nitra- to por la metilamina.....	43
III.1.5. Efecto inhibitor del arseniato sobre la incorporación del nitrato.....	45

III.2. ASIMILACION DEL NITRITO POR CELULAS DE <i>Chlo-</i> <i>rella fusca</i> . EFECTO DEL NITRATO Y EL AMONIO.....	48
III.2.1. <i>Cinética de la incorporación del nitrito</i> <i>en luz blanca</i>	48
III.2.2. <i>Incorporación del nitrito en presencia de</i> <i>nitrato</i>	48
III.2.3. <i>Inhibición por amonio de la incorporación</i> <i>del nitrito</i>	50
III.3. NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS DE CELULAS DE <i>Chlorella</i> <i>fusca</i> . EFECTO DEL AMONIO Y LA METILAMINA.....	55
III.3.1. <i>Efecto del amoniaco en el nivel celular</i> <i>de actividades nitrato y nitrito reductasas</i>	55
III.3.2. <i>Efecto de la metilamina en el nivel celular</i> <i>de actividad nitrato reductasa</i>	55
III.4. PAPEL MODULADOR DE LA LUZ AZUL EN LA ASIMILA- CION DEL NITRATO EN <i>C. fusca</i>	59
III.4.1. <i>Incorporación del nitrato por células ilu-</i> <i>minadas con distintas cualidades de luz</i>	59
III.4.2. <i>Efecto de distintas intensidades de luz</i> <i>azul y roja sobre la velocidad de incorpo-</i> <i>ración del nitrato</i>	61

- III.4.3. *Incorporación de nitrato por células sometidas a períodos de iluminación sucesivos de luz azul, roja y blanca.....* 64
- III.4.4. *Acción conjunta de la luz azul y roja sobre la velocidad de incorporación del nitrato.....* 64
- III.4.5. *Incorporación de nitrito y amonio por células iluminadas con distintas cualidades de luz.....* 67
- III.4.6. *Efecto del DCMU y su reversión por glucosa, sobre la incorporación del nitrato dependiente de la luz.....* 70
- III.4.7. *Incorporación de nitrato, dependiente de glucosa, en presencia de DCMU. Efecto de las luces blanca, azul y roja de alta intensidad.....* 70
- III.4.8. *Efecto de distintos tipos de luz monocromática de baja intensidad en la incorporación de nitrato dependiente de glucosa, en presencia de DCMU.....* 72
- III.4.9. *Incorporación de nitrato, dependiente de glucosa, por células iluminadas con distintas longitudes de onda de luces azul y roja en presencia de DCMU.....* 75

III.4.10. Incorporación de nitrito y amoniaco dependiente de glucosa. Influencia de la luz azul monocromática de baja intensidad.....	77
III.4.11. Actividad enzimática nitrato reductasa de células tratadas con distintas cualidades de luz.....	77
III.4.12. Incorporación de nitrato en ausencia de CO ₂ por células sometidas a distintos tratamientos de iluminación.....	80
IV. DISCUSION.....	83
V. CONCLUSIONES.....	101
VI. BIBLIOGRAFIA.....	106

ABREVIATURAS

ADP.....	Adenosín difosfato
ATP.....	Adenosín trifosfato
CCCP.....	Carbamil cianuro m-clorofenil hidrazona
DCMU.....	3-(3', 4'-diclorofenil)-1, 1 dimetil urea
E.....	Coeficiente de extinción
EDTA.....	Acido etilen-diamino-tetrácético
FAD.....	Flavín adenín dinucleótido
FCCP.....	Carbamil cianuro p-trifluorometoxi- fenil hidrazona
g.....	Constante de gravitación
GDH.....	Glutámico deshidrogenasa
GOGAT.....	L-glutamina:2-oxoglutarato amido- transferasa
GS.....	Glutamina sintetasa
λ	Longitud de onda
MV.....	Metil viológeno
NADH.....	Nicotinamín adenín dinucleótido reducido

NADPH.....	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H.....	NADH o NADPH indistintamente
NNEDA.....	N-naftil-etilendiamina
T.....	Transmitancia
Tris.....	Tris(hidroximetil)aminometano
v/v.....	Volumen/volumen

I. INTRODUCCION

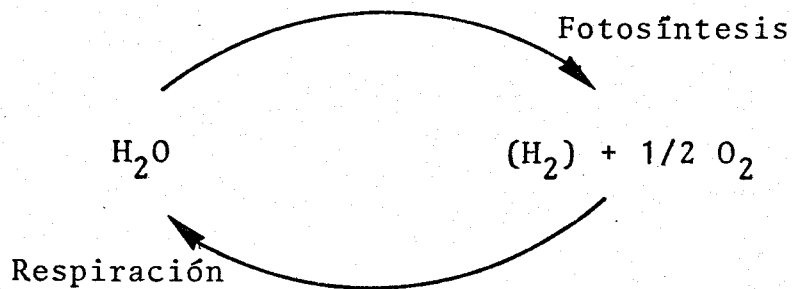
En el mundo que conocemos, los cinco elementos biogénicos fundamentales, hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre y fósforo, se encuentran generalmente, y salvo en el caso del nitrógeno que se presenta en su forma más estable como nitrógeno molecular, en sus estados de máxima oxidación, como consecuencia de la alta concentración de oxígeno de la atmósfera que los envuelve. Desde el punto de vista bioenergético, por tanto, las formas en que se presentan estos elementos, corresponden a sus niveles más bajos.

La energía que actualmente mueve a todo el mundo vivo es la luz solar, que capturada por pigmentos especializados, clorofilas, carotenos y ficobilinas, es transformada por la maquinaria fotosintética de bacterias, algas y plantas superiores, en energía química, en forma de poder reductor, ya biológicamente aprovechable, que se almacena y se distribuye, fundamentalmente, en forma de carbohidratos, proteínas y lípidos (Losada, 1977; Losada y Guerrero, 1978).

El resto de los organismos vivos carentes de a-

aparato fotoquímico, utilizan la energía almacenada fotosintéticamente en los compuestos mencionados, en el proceso redox inverso, la respiración, donde el poder reductor es quemado por el oxígeno y la energía liberada es transducida en energía de enlace, fundamentalmente ATP.

El ciclo fundamental de la bioenergética puede resumirse en el siguiente esquema:



El agua se rompe en el proceso fotosintético, generando poder reductor y oxígeno, que son recombinados en la respiración.

Estimaciones recientes indican que todo el oxígeno de la atmósfera es reciclado a través de los seres vivos en ciclos de 2×10^3 años.

Aunque el carbono juega un papel esencial en el mundo vivo, recientemente el nitrógeno viene despertando la máxima atención de los más destacados científicos en este campo. Es un elemento que forma parte fundamental de todos los componentes bioactivos de los seres vivos, proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas.

El nitrógeno molecular, reserva última de este elemento en la biosfera, entra a formar parte del mundo vivo en un proceso biológico del que están dotados un destacado, aunque escaso, número de organismos, bacterias y algas verdeazuladas (cianobacterias). Dicho proceso, energéticamente muy oneroso, proporciona amonio a partir del nitrógeno presente en la atmósfera (Burns y Hardy, 1975; Yates, 1976; Zumft, 1976). Sin embargo, para la generalidad de los seres vivos, este nitrógeno así fijado no va, como tal, a constituir una fuente significativa de este elemento, salvo en el caso de algunas especies vegetales como las leguminosas.

En la mayoría de los casos, este amonio, proveniente de la fijación del nitrógeno molecular, es oxidado

a nitrato por las bacterias nitrificantes, constituyendo esta forma de máxima oxidación del nitrógeno, la fuente primordial de este elemento para el resto de los seres vivos, al ser asimilado por la generalidad de los vegetales, proceso éste que implica su nueva reducción a amonio, antes de ser incorporado en los esqueletos carbonados.

Aunque una parte significativa del nitrato del suelo es devuelto a la atmósfera como nitrógeno molecular (denitrificación), el mencionado proceso de asimilación del nitrato en vegetales constituye *per se*, un tema del máximo interés económico, agrícola y ecológico, por ser etapa obligada en el camino que sigue este elemento hasta llegar a los animales superiores, así como de particular significación en fisiología y bioquímica vegetales.

El presente trabajo aborda la asimilación fotosintética del nitrato a nivel celular y subcelular, que lleva a cabo el alga verde unicelular *Chlorella fusca* y con especial atención se estudian los efectos reguladores de los distintos tipos de luz visible, azul y roja fundamentalmente, en la incorporación de este catión por

células enteras.

En el proceso de asimilación del nitrato se pueden distinguir tres etapas claramente diferenciadas: entrada del ión en la célula, su reducción enzimática hasta amoniaco y, por último, la incorporación de dicho amoniaco en esqueletos carbonados.

Entrada del nitrato en la célula

El estudio de este proceso, realizado principalmente a nivel fisiológico, con células enteras, ha permitido elucidar algunos aspectos de la primera etapa en la asimilación de dicho ión.

Aparentemente, se trata de un proceso que requiere energía metabólica (Heimer y Filner, 1971; Schloemer y Garrett, 1974a; Rao y Rains, 1976a; Eisele y Ullrich, 1975, 1977), sugiriéndose para este transporte activo de nitrato al interior de la célula, la participación de un sistema permeásico específico.

En plantas el nitrato parece actuar como inductor de su sistema de transporte específico (Heimer y Filner, 1971; Schloemer y Garrett, 1974a; Chantarotwong *et al.*, 1976; Rao y Rains, 1976a, 1976b). En general, y debido al carácter fotosintético de la asimilación, la luz actúa aumentando la velocidad de incorporación (Beevers y Hageman, 1969, 1972; Ullrich-Eberius, 1973; Hewitt *et al.*, 1976; Rao y Rains, 1976a, 1976b) y recientemente se ha encontrado en plantas superiores la existencia de un ciclo diario de incorporación de nitrato con un máximo en la mitad del fotoperiodo y un mínimo en el periodo oscuro (Pearson y Steer, 1977). Algunos autores han propuesto que la misma nitrato reductasa, el primer enzima de la ruta de asimilación del nitrato, es, precisamente, la proteína encargada de transportar el ión al interior de la célula (Butz y Jackson, 1977). Sin embargo, la mayoría de los resultados experimentales obtenidos en este campo indican que el transporte de nitrato es independiente de la actividad de dicho enzima (Heimer y Filner, 1971; Rao y Rains, 1976a, 1976b; Schloemer y Garrett, 1974a).

Eisele y Ullrich (1977) han sugerido la existencia en *Ankistrodesmus braunii* de una permeasa especí-

fica para el nitrato, distinta de la nitrato reductasa, basándose en la diferente sensibilidad al pH de los procesos de incorporación del ión a la célula y su posterior reducción. Este hecho ha sido confirmado recientemente en *Chlorella fusca* (Florencio, 1978).

El amoníaco detiene rápidamente la incorporación del nitrato en algas verdeazuladas como *Anabaena cylindrica* (Ohmori *et al.*, 1977), *Anacystis nidulans* (Flores *et al.*, 1978a), y algas verdes como *Chlorella vulgaris* (Syrett y Morris, 1963; Pistorius *et al.*, 1978) o *Chlamydomonas reinhardii* (Thacker y Syrett, 1972). En plantas superiores, mientras que cereales como la cebada (Rao y Rains, 1976a) y el trigo (Minotti *et al.*, 1969), presentan una respuesta similar, en otras como *Lemna minor* (Orebamjo y Stewart, 1975) o algunas rosáceas (Mohanthy y Fletcher, 1976), la incorporación de nitrato parece ser independiente de la presencia de amonio.

La rápida inhibición que se observa en la incorporación de nitrato motivada por la presencia de amonio ha hecho sugerir que el sistema de transporte de nitrato es el afectado en primer término por el amonio

(Pistorius *et al.*, 1976, 1978; Syrett y Leftley, 1976).

Reducción de nitrato a amonio

Este proceso enzimático de óxido-reducción viene siendo muy estudiado en los últimos años (Beevers y Hageman, 1969; Hewitt, 1975; Losada y Guerrero, 1978; Venesland y Guerrero, 1978) habiéndose visto que transcurre en dos pasos secuenciales. En primer lugar el nitrato se reduce a nitrito en una reacción que implica la transferencia de dos electrones y está catalizada por la nitrato reductasa, y en segundo lugar el nitrito se reduce a amoníaco en una reacción que implica la transferencia de seis electrones y está catalizada por la nitrito reductasa (Losada, 1975/76).

El donador de electrones para el primer paso, catalizado por la molibdo proteína nitrato reductasa, varía según el tipo de organismo. Así, en algas verdes y plantas superiores el enzima requiere NADH o NADPH, mientras que en cianobacterias (Manzano *et al.*, 1976), y en bacterias fotosintéticas (Chiba e Ishimoto, 1973), o no fotosintéticas, el donador de electrones para la nitrato reductasa es la ferredoxina, una sulfoferroproteína de

potencial redox muy negativo.

La nitrato reductasa mejor estudiada es la de hongos, algas verdes y plantas superiores. En todos los casos se trata de un complejo enzimático de alto peso molecular (160.000 a 600.000 daltons, según su origen), con dos partes funcionales que participan secuencialmente en la transferencia de los electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato. La primera mitad, llamada diaforasa, cataliza la reducción de diferentes oxidantes distintos al nitrato con NAD(P)H como reductor, y es dependiente de FAD (Paneque y Losada, 1966; Paneque *et al.*, 1968; Aparicio, 1971). La segunda mitad, conocida como terminal, contiene molibdeno y cataliza la reducción del nitrato por reductores del tipo de viológenos o flavinas (Losada *et al.*, 1969). El complejo enzimático contiene, además de los grupos prostéticos citados FAD y Mo, un grupo hemo, caracterizado como citocromo b_{557} (Solomonson *et al.*, 1975; Notton *et al.*, 1977; Guerrero y Gutierrez, 1977; Díez *et al.*, 1977).

El enzima de organismos procarióticos está peor caracterizado. Tanto en bacterias aeróbicas, como en

cianobacterias parece faltar la porción diaforásica (Losada, 1975/76) dependiente de FAD. En cuanto a grupos prostéticos, se ha descrito la presencia de Mo en el enzima de *Azotobacter chroococcum* (Guerrero y Vega, 1975) y parece ser que el de *Anacystis nidulans* carece de flavinas (Candau, 1978).

La reducción del nitrito hasta amoníaco está catalizada por la ferroproteína nitrito reductasa (Losada y Guerrero, 1978). En hongos y bacterias este enzima es dependiente de piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones (Vega *et al.*, 1973; Rivas *et al.*, 1973; Lafferty y Garrett, 1974; Vega, 1976), mientras que la nitrito reductasa de cianobacterias, algas verdes y plantas superiores utiliza ferredoxina reducida.

La nitrito reductasa de hongos y bacterias posee FAD y un grupo prostético de tipo porfirínico llamado sirohemo. En organismos fotosintéticos parece faltar la flavina, habiéndose determinado, sin embargo, la presencia de un agrupamiento sulfoférico (Aparicio *et al.*, 1975) que, al igual que el sirohemo, tiene funcionalidad en el transporte de electrones desde el donador hasta el

nitrito (Vega y Kamin, 1977; Vega *et al.*, 1978).

El sistema reductor del nitrato compuesto por los enzimas nitrato y nitrito reductasas se localiza unido a partículas en cianobacterias mientras que en el resto de los organismos que poseen la capacidad de asimilar nitrato, parece encontrarse en forma soluble o sólo débilmente asociado a estructuras celulares.

La reducción asimilatoria de nitrato a amoníaco está sometida a regulación por variaciones del nivel enzimático de la nitrato y nitrito reductasas, así como por cambios de actividad del primer enzima.

En *Chlorella* la nitrato reductasa es un enzima adaptativo, reprimible por amonio incluso en presencia de nitrato (Vega *et al.*, 1971).

En cuanto a la regulación de la actividad de este enzima, hoy se sabe que, tanto en algas verdes, como en cianobacterias, se halla sometido a un mecanismo de regulación por interconversión entre una forma oxidada, activa y una forma reducida, inactiva (Losada, 1974,

1975/76, Ortega *et al.*, 1977; Losada y Guerrero, 1978). La forma inactiva puede obtenerse *in vitro* por incubación del enzima con NADH e *in vivo* por adición de amonio a un cultivo de células creciendo en nitrato (Losada *et al.*, 1970; Herrera *et al.*, 1972; Díez *et al.*, 1977) habiéndose propuesto que el efecto del amonio podría deberse a su efecto desacoplante de la fosforilación fotosintética, que conduce a un incremento en los niveles celulares de poder reductor, NAD(P)H, y ADP (Losada, 1974, 1975/76; Losada y Guerrero, 1978; Chaparro *et al.*, 1976).

El grupo de Vennesland, en Berlin, ha llegado a conclusiones diferentes en cuanto al mecanismo de inactivación reversible de la nitrato reductasa, proponiendo que el enzima inactivo es un complejo enzima reducido-cianuro (Lorimer *et al.*, 1974; Vennesland y Guerrero, 1978).

La nitrato reductasa inactivada, bien *in vivo* por la adición de amonio, bien *in vitro*, por incubación con NADH, puede ser reactivada *in vitro* por la acción de un efectivo agente oxidante como es el ferricianuro, lo

cual refuerza la hipótesis de una regulación enzimática dependiente del nivel redox celular.

Incorporación del amonio en aminoácidos

La última etapa en el proceso asimilatorio del nitrato es la incorporación del amonio en aminoácidos, como grupo α -amino.

Fowden (1967) propuso que la reacción principal para la incorporación del amonio en el material celular era la aminación reductiva del α -cetoglutarato, catalizada por la glutamato deshidrogenasa. Posteriormente, Mifflin y Lea (1976, 1977) señalaron el significado fisiológico de otra ruta alternativa, consistente en la incorporación del amoniaco al glutamato para obtener glutamina, en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa (Haystead *et al.*, 1973), y a continuación, una transaminación reductiva en la que participan el último compuesto y el α -cetoglutarato para dar glutamato, reacción catalizada por el enzima L-glutamina:2-oxoglutarato amido-transferasa, también conocida como glutamato sintasa o GOGAT (Mifflin y Lea, 1976, 1977). Estos autores, basán-

dose en diversos estudios, han propuesto que el sistema GS/GOGAT, y no el de la GDH, es la ruta principal para la incorporación de amonio en bacterias y organismos fotosintéticos.

Los experimentos llevados a cabo con organismos enteros, han aclarado muchos puntos acerca del funcionamiento global de la ruta de asimilación del nitrato. Basándose en este tipo de experiencias, se ha podido estudiar la influencia de diversos factores sobre la capacidad de utilización del nitrato por algas y plantas superiores, como son la luz, el CO_2 , el amoníaco, etc. (Beevers y Hageman, 1972; Losada, 1974, 1976; Hewitt *et al.*, 1976; Syrett y Leftley, 1976).

El CO_2 parece ser que es requerido para la utilización del nitrato (Warburg y Negelein, 1920) pero no para la del nitrito (Kessler, 1955), interpretándose el hecho en base al distinto origen de los donadores de electrones de los enzimas implicados, nitrato y nitrito reductasas: el CO_2 proporcionaría, no sólo esqueletos carbonados para la incorporación del amoníaco (lo cual explicaría la más efectiva asimilación de nitrito en pre

sencia de CO_2 que en su ausencia), sino también, y a partir de ellos, el NADH necesario para la reducción del NO_3^- , mientras que el nitrito se reduciría mediante la ferredoxina reducida por el aparato fotosintético.

Flores *et al.* (1978b) han presentado resultados discrepantes con estas interpretaciones y han sugerido un posible papel del CO_2 , en la utilización del nitrato, a través de su efecto estimulador de la velocidad del flujo fotosintético. Stemler y Govindjee (1973) han observado un efecto activador del flujo de electrones fotosintético, producido por el ión bicarbonato, hecho que podría estar relacionado con la estimulación de la incorporación del nitrato por el CO_2 .

Eisele y Ullrich (1977) han encontrado en *Ankistrodesmus braunii* que el CO_2 es necesario para la asimilación del nitrato, únicamente a pH 6, mientras que a pH 8 el nitrato se incorpora tanto en presencia como en ausencia de CO_2 , si bien, en este último caso, todo el nitrato incorporado es reducido y eliminado como amonio al medio, sugiriendo que algún producto del metabolismo del CO_2 podría estabilizar el sistema de transporte de nitrato.

to, sobre todo a pH bajos.

Anteriormente, ya se ha indicado la necesidad de la luz en la asimilación del nitrato. Esta dependencia parece ser debida a un efecto indirecto, a través de la fijación del CO_2 , ya que pueden obtenerse velocidades de incorporación similares en la oscuridad utilizando glucosa como fuente de carbono.

Pero la luz, además de actuar como fuente de energía para la maquinaria fotosintética, puede desempeñar una función como agente regulador de procesos fisiológicos muy variados (Erlanger, 1978).

Los sistemas fotorreceptores, capaces de desencadenar una respuesta por la regulación de la actividad biológica de macromoléculas como enzimas, proteínas incorporadas a membranas, etc., están muy extendidos en el mundo vivo.

Uno de los sistemas mejor estudiados, ha sido el sistema fotocromico de plantas superiores, cuyo pig -

mento fotorreceptor, el fitocromo, sensible a la luz roja, ha sido aislado y caracterizado parcialmente (Pratt 1978; Schopfer, 1977). Sistemas similares se han descrito para hongos (Kumagai y Oda, 1973), cianobacterias (Björn y Björn, 1977), algas (Van der Velde y Hemrika Wagner, 1977), etc. .

En cuanto a la luz azul, y dejando aparte respuestas atribuibles directamente a procesos fotosintéticos y a las desencadenadas por el fitocromo, ejerce también un papel modulador en muchos procesos fisiológicos, en los cuales, como pigmentos fotorreceptores, podrían actuar flavinas y carotenos. Ultimamente, sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de estos procesos regulados por la luz azul, dependen de las flavinas como pigmentos fotorreceptores.

En este sentido, Muñoz y Butler (1975) identificaron el espectro de acción de la fotorreducción de un citocromo *b* en micelios de *Neurospora*, con el espectro de absorción de una flavina. Poff y Butler (1975) obtuvieron resultados similares en extractos crudos de *Dyctios-*

telium discoideum. Otros procesos descritos en los que parecen intervenir las flavinas como pigmento fotorreceptor, han sido: fotoinhibición del ritmo circadiano de conidiación en *Neurospora* (Sargent y Briggs, 1967), fotoactivación de la síntesis de carotenoides en *Neurospora* (Zalokar, 1955), fototropismo de los coleóptilos de avena y de los esporangióforos de *Phycomyces* (Presti *et al.*, 1977; Presti y Delbruck, 1978), etc. .

En *Chlorella*, la luz azul incrementa la incorporación de $^{14}\text{CO}_2$ preferentemente en aspartato, glutamato, malato y fumarato, en un mecanismo dependiente de la fotosíntesis (Ogasawara y Miyachi, 1969, 1970). El hecho de que sea el oxalacetato el precursor más probable de estos compuestos, ha motivado que se proponga que el papel de la luz consista en aumentar el nivel de actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Kowallick y Gaffron (1966) encontraron un incremento en la actividad respiratoria de un mutante de *Chlorella* carente de clorofila al ser iluminado con luz azul, interpretándolo como una consecuencia del aumento de nivel del oxalacetato. El espectro de acción de estos

dos fenómenos indica que el fotorreceptor responsable de la acción de la luz azul probablemente sea una flavina (Kamiya y Miyachi, 1974). Efectos semejantes a los descritos encontraron estos mismos autores por adición de amonio.

Voskresenskaya (1972) describió la similitud entre las respuestas producidas en el metabolismo del carbono por la luz azul, con las producidas por el amonio, sugiriendo la posibilidad de que la luz azul promoviese un aumento de la concentración de amonio en la célula.

El incremento en la actividad respiratoria provocado por la luz azul se dá también utilizando sustratos respiratorios exógenos, como la glucosa (Ries y Gauss, 1977).

En cuanto al efecto específico de la luz azul sobre el metabolismo del nitrato, Aparicio *et al.* (1976) han mostrado que la nitrato reductasa inactiva de *C. fusca* y de hojas de espinaca puede ser rápidamente activada por luz azul, pero no por luz roja, en un proceso en el

que las flavinas desempeñan un papel fundamental (Aparicio *et al.*, 1976; Roldán *et al.*, 1978).

En plantas superiores, Jones y Sheard (1977) han descrito un efecto similar de la luz azul sobre el nivel celular de actividad de la nitrato reductasa.

En el presente trabajo se describe un mecanismo regulador de la ruta de asimilación del nitrato en células de *Chlorella fusca*, en el que la luz azul desempeña un papel activador que parece ser específico para la incorporación del nitrato.

Por otro lado, el hecho de que únicamente se precisen pequeñas intensidades de luz azul para incrementar la asimilación de nitrato, permite sugerir que este efecto podría ser relevante a nivel fisiológico.

Previamente se ha puesto a punto un procedimiento para la determinación de la velocidad de incorporación de nitrato, nitrito o amoníaco, que ha permitido medir su desaparición del medio de cultivo en que se encuentran las células, en condiciones óptimas de crecimiento.

Asímismo se ha estudiado el efecto del ión nítrito así como del amoniaco y otros agentes desacopla-tes de la fotofosforilación, en la incorporación del nítrato por células creciendo en condiciones fototróficas. Tanto el nítrito, como el amoniaco han resultado ser efi-caces agentes inhibidores de este proceso al igual que los desacoplantes ensayados, arseniato y metilamina.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. CULTIVO DE CELULAS

En este trabajo se ha utilizado el alga verde unicelular *Chlorella fusca* Shihira et Krauss (*C. pyrenoidosa* Chick) 211-15, obtenida de la colección Pringsheim de Göttingen (Alemania).

Como *medio de cultivo* del alga se ha empleado, con ligeras modificaciones, el descrito por Domanski-Kaden y Simonis (1972) que contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican: KNO_3 , 8 mM; NaNO_3 , 3 mM; CaCl_2 , 0.1 mM; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 3.5 μM ; KH_2PO_4 , 3 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM; Fe-EDTA, 34 μM y se añadieron 8 ml/litro de una solución de oligoelementos que contenía H_3BO_3 , 150 mg; $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mg; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 4 mg; $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mg, disueltos en 500 ml de H_2SO_4 , 0.02 N.

Cuando se indica, al medio de cultivo se le añadió NH_4Cl , 1 mM.

Condiciones de cultivo. El medio de cultivo descrito se utilizó sin esterilizar puesto que, al no

contener fuente de carbono y emplearse como inóculo una gran masa celular, la contaminación no era significativa, como se comprobó por examen microscópico.

Las células se crecieron en tubos cilíndricos de 4 cm \emptyset y 40 cm de longitud, con iluminación continua suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca (5000 lux), en una cámara climatizada a la temperatura de 28°C burbujeándose a través del medio una corriente de gas compuesta por una mezcla de aire, impulsado por una bomba de membrana de la firma SIROCCO, y anhídrido carbónico en la proporción 95:5 (v/v).

Para la preparación de los inóculos se partió de células mantenidas en agar o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido.

II.2. ENZIMAS

II.2.1. *Preparación del extracto celular*

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento, sedimentándose por centrifugación a 5000

x g durante 5 minutos, resuspendiéndolas en agua destilada y sometiéndolas a una nueva centrifugación a 5000 x g durante 5-10 minutos para eliminar los residuos del medio de cultivo.

Una vez recogidas, las células se rompieron en un mortero con alúmina, en la proporción de 3 g de alúmina por cada gramo de células. El material roto se extrajo con tampón fosfato 50 mM, pH 7.5, y el material resultante se centrifugó a 27.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante constituyó el extracto crudo para la determinación de la actividad enzimática. Todas estas operaciones se realizaron a la temperatura de 0°-4°C.

II.2.2. *Ensayo de la actividad nitrato reductasa*

El ensayo standard de la actividad nitrato reductasa se realizó en tubos abiertos, utilizándose NADH como donador de electrones. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 5 minutos y contenía, en volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 7.5, 100 μ moles; KNO_3 , 10 μ moles; NADH, 0.3 μ moles, y una cantidad adecuada de extracto celular. La reacción se detuvo por acidificación

de la mezcla y se determinó el nitrito aparecido según se describe posteriormente.

II.2.3. *Ensayo de la actividad nitrito reductasa*

La actividad metil-viológeno nitrito reductasa se determinó siguiendo las condiciones descritas para el ensayo standard de la nitrito reductasa de hojas de espinaca (Ramirez *et al.*, 1966; Losada y Paneque, 1971). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml además de la cantidad necesaria de enzima, 150 μ moles de tampón fosfato potásico pH 7.5, 4 μ moles de NaNO_2 , 1.5 μ moles de MV y 5 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ en 0.2 ml de NaHCO_3 0.29M.

II.3. INCORPORACION DE NITRATO, NITRITO Y AMONIO

La incorporación de cada uno de los tres iones se determinó estimando la desaparición de los mismos previamente añadidos a una suspensión de células en medio de cultivo carente de fuente de nitrógeno, según se describe a continuación.

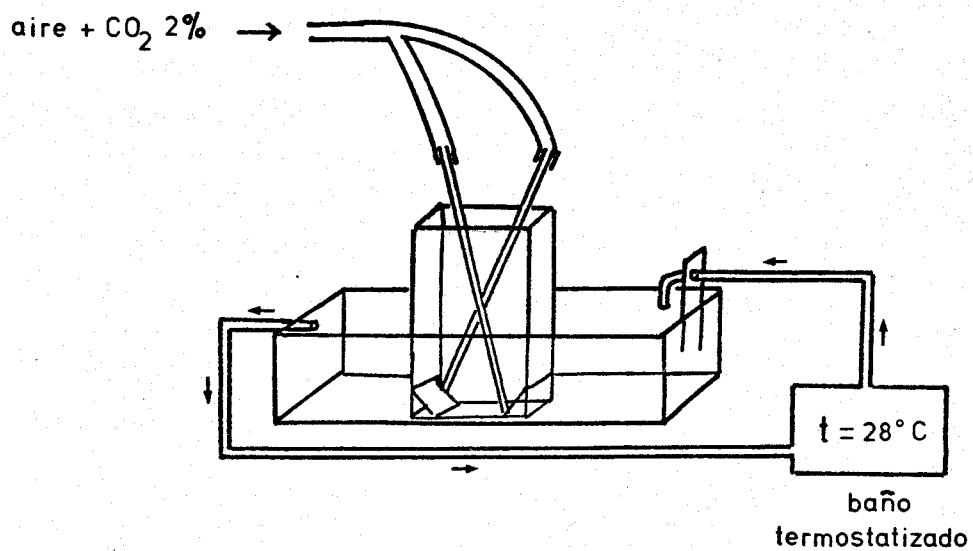
II.3.1. *Preparación de células para el ensayo de incorporación de nitrato, nitrito o amonio*

Células creciendo en fase exponencial se recogieron por filtración en filtros circulares MILLIPORE, de acetato de celulosa, de 10 cm de \emptyset y con poros de 45 μ metros de \emptyset . Dicha filtración se aceleró con una bomba de vacío marca Mc LEOD o con una trompa de agua BRAND. A continuación se lavaron con H_2O destilada y se resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno, a la concentración celular indicada en cada caso.

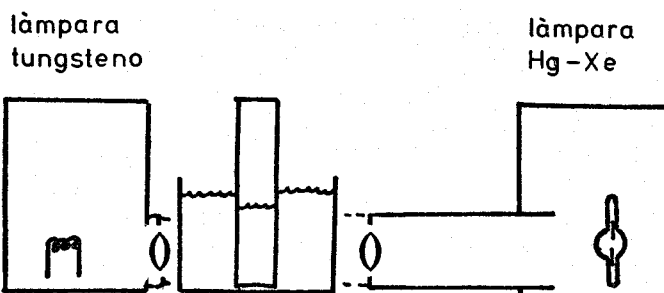
50 ml de la suspensión celular así obtenida se transferían a una cubeta de plástico transparente, de dimensiones 10x4.5x1.5 cm, donde se realizaron los ensayos. Dicha cubeta se colocaba en un recipiente también transparente por donde se hacía circular una corriente de H_2O a temperatura constante, 28°C, proporcionada por un baño termostatzado de la marca HETOFRIG (véase esquema 1).

Antes de añadir la fuente de nitrógeno (nitrato, nitrito o amonio) la suspensión de células se mante-

ESQUEMA 1



A



B

Vistas frontal (A) y lateral (B) del sistema empleado para la medida de la incorporación de nitrato, nitrito o amoniaco.

nía 30 minutos en agitación (mediante gaseo de aire enriquecido en CO_2 al 2%, cuya mezcla se obtuvo con un medidor de flujo gaseoso MANOSTAT e iluminada con luz blanca. El inicio de cada ensayo coincidió con la adición de el(os) ión(es) a medir. La concentración inicial de los mismos (nitrato, nitrito o amonio) varió entre 1 y 2 mM.

Excepto cuando se indique lo contrario, las células se mantuvieron en agitación como se ha descrito anteriormente durante el desarrollo del experimento, en las condiciones de iluminación que se especifican.

II.3.2. *Obtención de medio de cultivo libre de células para la determinación de nitrato, nitrito y amonio*

A los tiempos indicados, se tomaban alícuotas de 2 ml de las que se eliminaban las células por filtración a vacío a través de filtros SCHLEICHER-SCHULL N° 589³, soportados sobre placas filtrantes de vidrio.

II.4. ILUMINACIÓN

Dependiendo de la intensidad lumínica empleada

se utilizaron una o dos fuentes de iluminación colocadas a ambos lados de la cubeta de ensayo según se muestra en el esquema 1. Estas dos fuentes consistían en una lámpara de tungsteno marca SYLVANIA F.C.S. de 200 watios y 24 voltios, y una lámpara de arco de Hg-Xe, de 200 watios, provista de una fuente de alimentación marca ORIEL CORPORATION.

Las distintas cualidades de luz se obtuvieron empleando filtros de interferencia de la marca BALZERS o BAIRD-ATOMIC, cuyos espectros se muestran en el esquema 2.

II.5. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

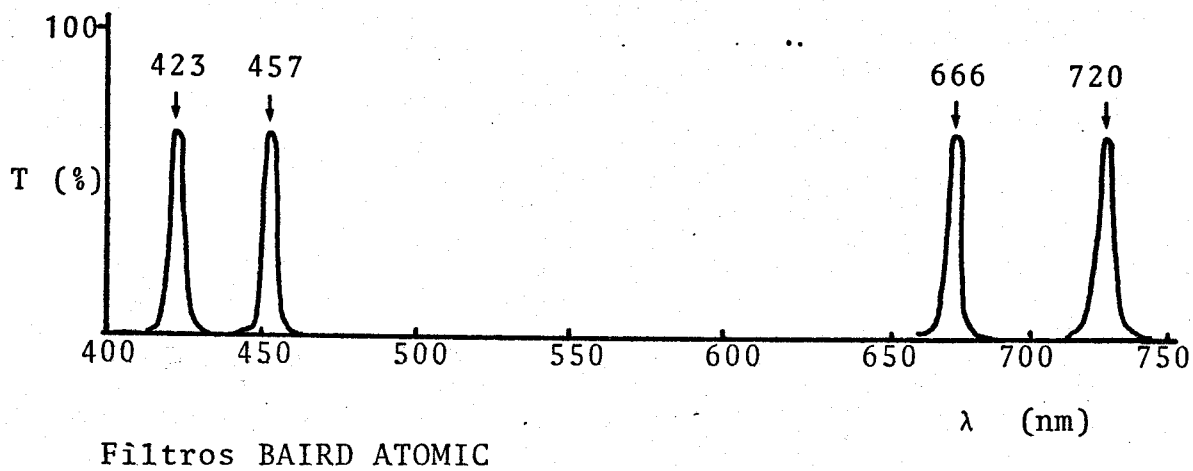
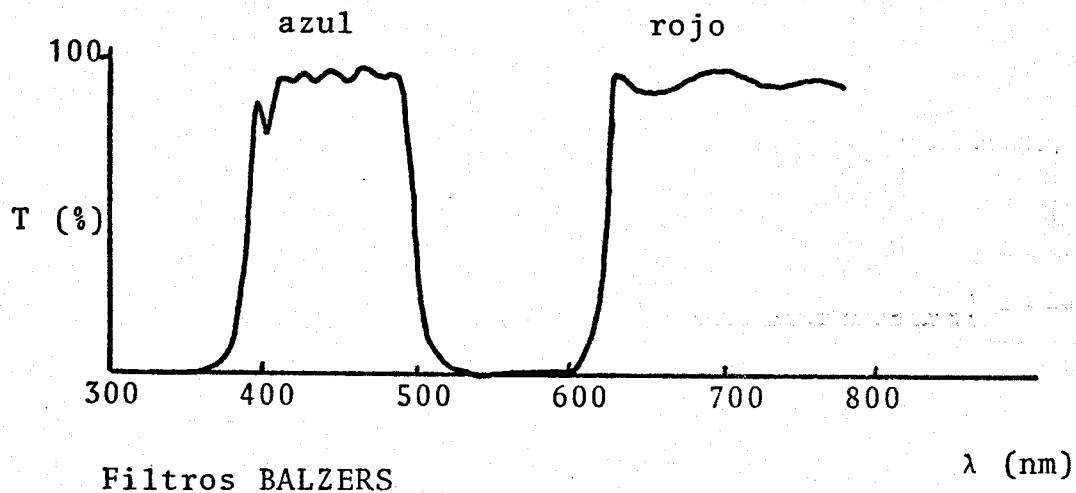
II.5.1. *Centrifugaciones*

Para la obtención de extractos celulares se emplearon centrífugas refrigeradas SORVALL, modelo RC-2B.

Para las centrifugaciones a baja velocidad se emplearon centrífugas de la marca SELECTA.

ESQUEMA 2

CARACTERISTICAS ESPECTRALES DE LOS FILTROS EMPLEADOS



II.5.2. *Determinaciones espectrofotométricas*

Para las determinaciones colorimétricas se utilizó un espectrofotómetro BAUSCH&LOMB Spectronic modelo 100. Las medidas de absorbancia en la región ultravioleta del espectro se realizaron en espectrofotómetros PYE UNICAM S.P.1800.

II.5.3. *Determinación de nitrato*

El nitrato fué determinado por su absorbancia a 204 nm en medio ácido (Cawse, 1967). A una muestra de una disolución en la que se quería determinar el nitrato se le añadió ácido sulfámico hasta una concentración del 0.4% para eliminar posibles trazas de nitrito. Tras unos minutos se añadió ácido perclórico a una concentración final de 1.35%, leyéndose a continuación la absorbancia debida al ión nitrato a 204 nm.

II.5.4. *Determinación de nitrito*

El nitrito se determinó colorimetricamente a 540 nm por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway,

según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949). A 1 ml de muestra se le añadía 1 ml de una disolución 58 mM de sulfanilamida en ClH 2.4 N y 1 ml de una disolución 0.69 mM de NNEDA. Trás 15 minutos de incubación a temperatura constante, se medía la absorbancia a 540 nm.

II.5.5. *Determinación de amoniaco*

El amoniaco se determinó midiendo a 640 nm el color azul del indofenol obtenido por la reacción, a alto pH, del amoniaco con el fenol y el hipoclorito (Solorzano, 1969).

II.5.6. *Determinación de clorofila*

La concentración de clorofila en las suspensiones de células se determinó por su absorbancia a 652 nm tras su extracción con acetona al 80%, de la suspensión de células, según el método descrito por Arnon (1949), utilizándose un $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}} = 34.5$.

II.5.7. *Determinación del desprendimiento de oxígeno*

Se llevó a cabo polarográficamente en el electrodo de oxígeno. La suspensión de células se colocaba en la cámara de un electrodo de oxígeno del tipo Clark (RANK BROSS.), termostatzado a 28°C y se iluminaba con las mismas fuentes que las utilizadas para los ensayos de incorporación de nitrato, nitrito o amonio. Los 3 ml de suspensión contenían células de *Chlorella* en medio de cultivo completo con nitrato, utilizándose bicarbonato sódico como fuente de carbono.

II.5.8. *Estimación de la velocidad de fotosíntesis*

Para la medida de la actividad fotosintética con CO₂ y nitrato como aceptores de electrones, se determinó primero a la oscuridad la absorción de oxígeno debida a respiración, iluminando después y estimando así el desprendimiento de este gas. La velocidad neta de fotosíntesis se calculó mediante la suma algebraica de la velocidad de desprendimiento de oxígeno en la luz, y de la velocidad de absorción de oxígeno en la oscuridad.

II.5.9. *Determinación de proteína*

Para la determinación de proteína se empleó el método de Lowry *et al.* (1931) y también una modificación de éste realizada por Bailey (1967) usándose en ambos ca sos seroalbúmina como proteína patrón.

II.5.10. *Medidas del pH*

Las medidas de pH se efectuaron en pHmetros ME TROHM HERISAU modelo E-512 con escala expandida.

II.6. REACTIVOS

Los piridín nucleótidos, el Tris y el EDTA se adquirieron a SIGMA, St. Louis, EE.UU. . El cloruro amónico, el nitrato potásico, el nitrito potásico, la glucosa, el arseniato, y el clorhidrato de metilamina se obtuvieron de MERCK, Darmstadt, Alemania. El metil viológeno, el DCMU y la seroalbúmina bovina procedían de SERVA, Ale ma nia. Para la rotura de células se empleó alúmina de grado bacteriológico de ALCOA, Arkansas, EE.UU. . El resto

de los productos empleados se adquirieron a las firmas RIEDEL (Alemania), BDH (Inglaterra), MALLINCRODT (EE.UU.), CARLO ERBA (Italia) y PANREAC (España), siendo todos ellos de grado analítico.

El anhídrido carbónico utilizado en el cultivo de células fué de alta pureza y suministrado por la SEO. Para la obtención de aire pobre en anhídrido carbónico se hizo pasar el aire por un frasco que contenía una solución saturada de KOH.

II.7. OTROS APARATOS

El agua destilada se obtuvo con un destilador marca DRA.

III. RESULTADOS

III.1. ASIMILACION DEL NITRATO POR CELULAS DE *Chlorella fusca*. EFECTO DEL NITRITO, AMONIACO Y OTROS DESACOPLANTES

III.1.1. *Cinética de la incorporación del nitrato en luz blanca*

La utilización de la técnica ya descrita en Materiales y Métodos de medir la incorporación del nitrato por células enteras en condiciones similares a las óptimas de crecimiento, determinándose su desaparición del medio de cultivo, ha permitido disponer de un método muy efectivo para seguir esta actividad fisiológica.

La fig. 1 muestra la incorporación de nitrato a lo largo del tiempo por células bajo condiciones similares a las de crecimiento: mismo medio de cultivo, 28°C y una mezcla de aire y CO₂ al 2%.

Las velocidades de incorporación de nitrato oscilaban entre 10 y 20 μ moles/mg de clorofila x hora. En experimentos aislados se llegaron a alcanzar velocidades superiores a los 30 μ moles/mg de clorofila x hora.

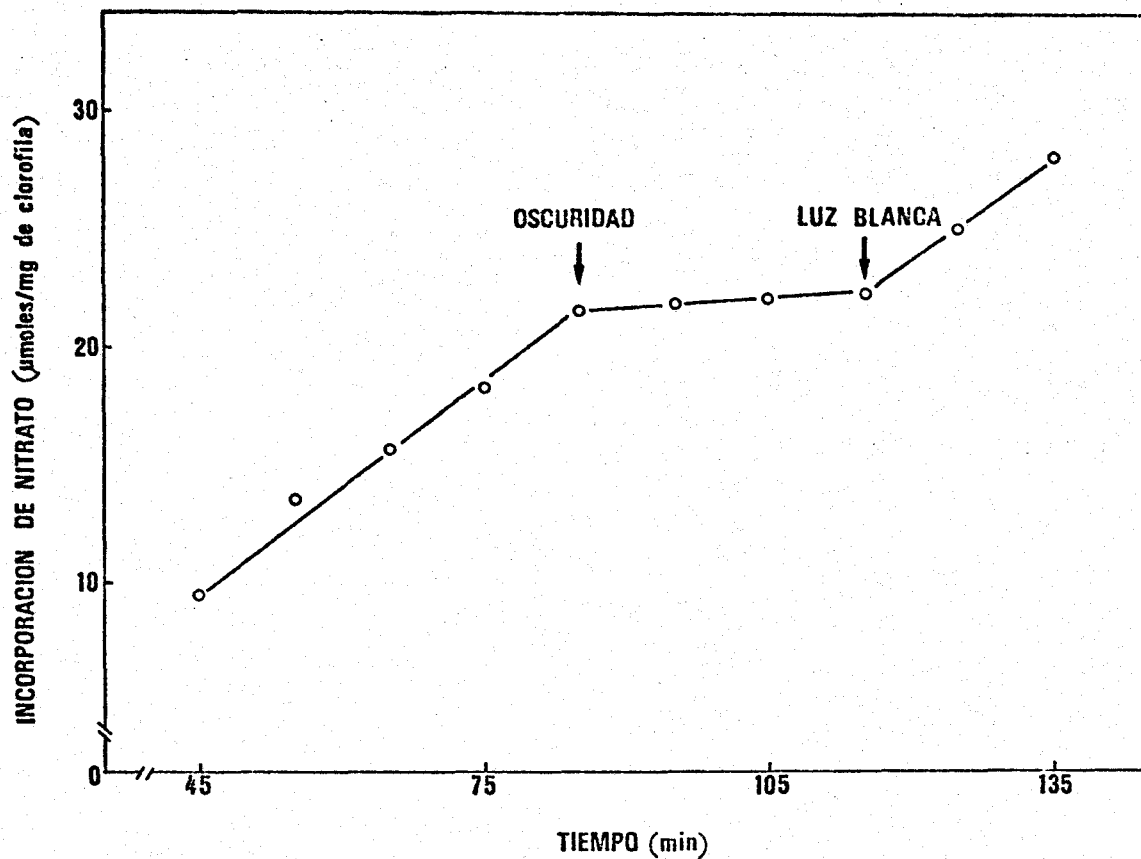


Fig. 1. Cinética de la incorporación del nitrato en luz blanca por células de *Chlorella fusca*. Células crecidas en nitrato se recogieron por filtración y se resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno a una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g/ml}$, preincubándose a la luz, a 28°C , gaseando con aire + $2\% \text{CO}_2$, durante 30 min. Al tiempo cero se añadió KNO_3 2 mM. Donde se indica, se apagó la luz durante 30 min. Otras condiciones experimentales como se describe en Materiales y Métodos. Intensidad de luz blanca, 300W/m^2

En la oscuridad cesa la incorporación de nitrato, restaurándose su velocidad sin fase de retraso cuando se vuelve a iluminar el cultivo.

III.1.2. *Efecto inhibitor del nitrito en la incorporación de nitrato*

El nitrito, que es el producto más inmediato de la reducción del nitrato, puede ser incorporado activamente por células enteras de *C.fusca* (véase fig. 2).

Sin embargo, como se observa en la fig. 2, la adición de KNO_2 2 mM provocó una inhibición de la incorporación de nitrato, inhibición que duró hasta que todo el nitrito desapareció del medio tras ser metabolizado por las células.

La detención de la asimilación del nitrato fue casi total. Sin embargo, las células reasumen temporalmente cierto consumo de nitrato coincidiendo con el período en que el nitrito se asimila con más lentitud. Este último hecho se discutirá en detalle en la sección III.2.1.

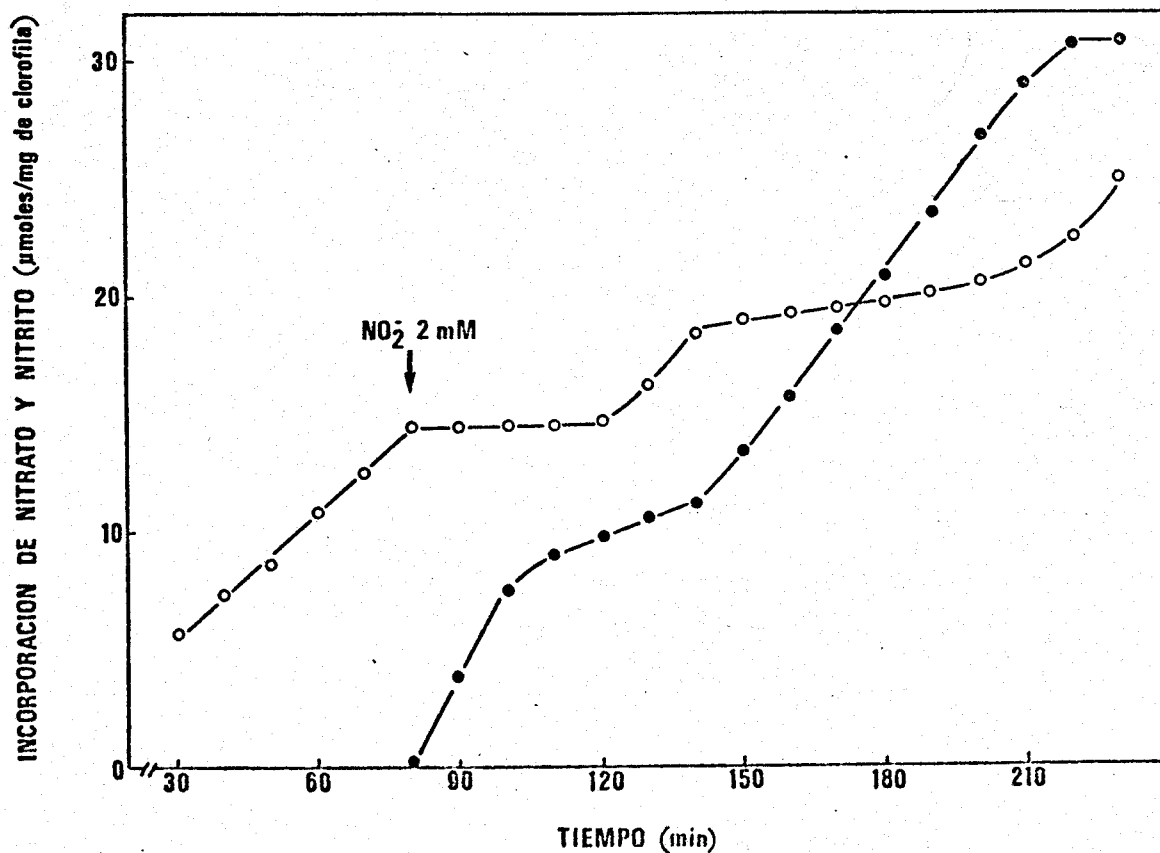


Fig. 2. Efecto del ión nitrito en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Condiciones experimentales similares a las de la fig. 1. Donde se indica, se añadió KNO_2 2 mM y se determinó su incorporación según se describe en Materiales y Métodos.

(○—○) incorporación de nitrato; (●—●) incorporación de nitrito.

III.1.3. *Efecto inhibidor del amonio en la incorporación del nitrato*

El amoniaco, producto final de la reducción asimilatoria del nitrato, provoca una todavía más brusca inhibición en la incorporación de nitrato por células que lo están asimilando en luz blanca.

Como se observa en la fig. 3 la adición de pequeñas cantidades de NH_4Cl trajo consigo la inmediata detención de la incorporación de nitrato y esta detención permaneció hasta que todo el amoniaco había sido consumido por las células. Una vez desaparecido el amonio, la velocidad de incorporación de nitrato se restablece.

III.1.4. *Inhibición de la incorporación de nitrato por la metilamina*

El efecto inactivante que el amonio ejerce sobre la nitrato reductasa se ha interpretado teniendo en cuenta su efecto desacoplante de la fotofosforilación.

La metilamina, compuesto posiblemente no meta-

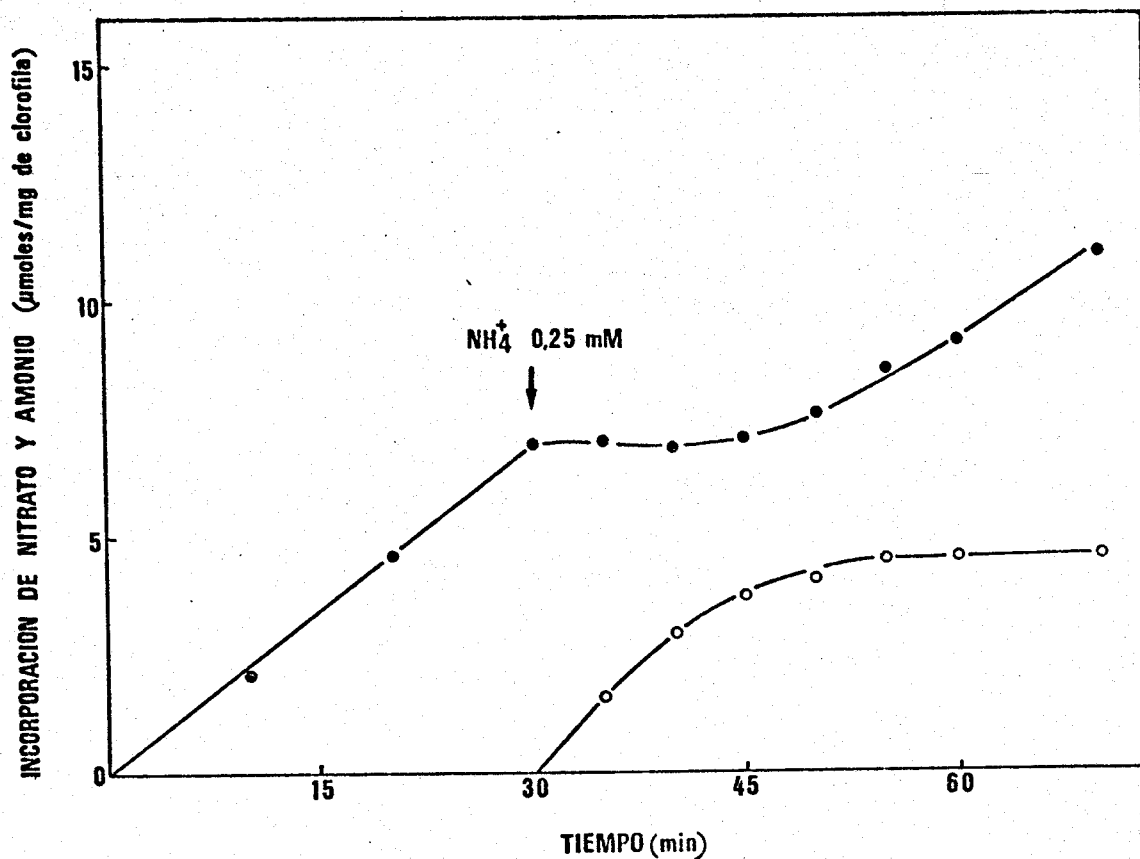


Fig. 3. Efecto del ión amonio en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Condiciones experimentales similares a las de la fig. 1. Donde se indica, se añadió NH_4Cl 0.25 mM, determinándose su incorporación según se describe en Materiales y Métodos.

(●—●) incorporación de nitrato; (○—○) incorporación de amonio.

bolizable por las células y altamente efectivo como desacoplante, también provoca la inactivación de la nitrato reductasa (Chaparro *et al.*, 1976; Díez *et al.*, 1977). En la fig. 4, se observa que también inhibe de forma casi completa la incorporación de nitrato.

III.1.5. *Efecto inhibitor del arseniato sobre la incorporación de nitrato*

El arseniato, que inhibe la formación de ATP, posiblemente al reemplazar al fosfato, también inhibe la asimilación del nitrato, como se observa en la figura 5. Sin embargo, la concentración de arseniato necesaria para causar una inhibición del 75% en la asimilación del nitrato, debía aumentarse hasta valores de 15 mM. Una concentración de 3 mM carecía prácticamente de efecto (Fig.5).

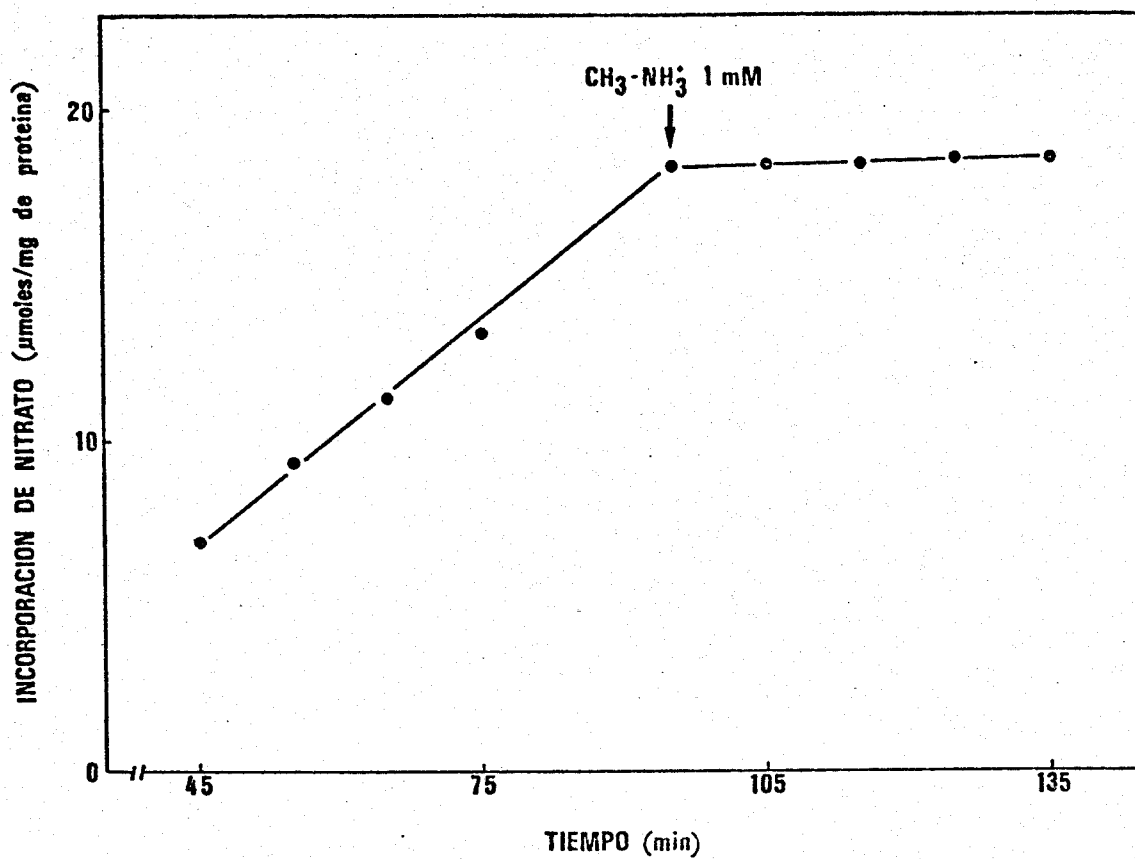


Fig. 4. Efecto de la metilamina en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Condiciones experimentales similares a las de la fig. 1. Donde se indica se añadió $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ 1 mM.

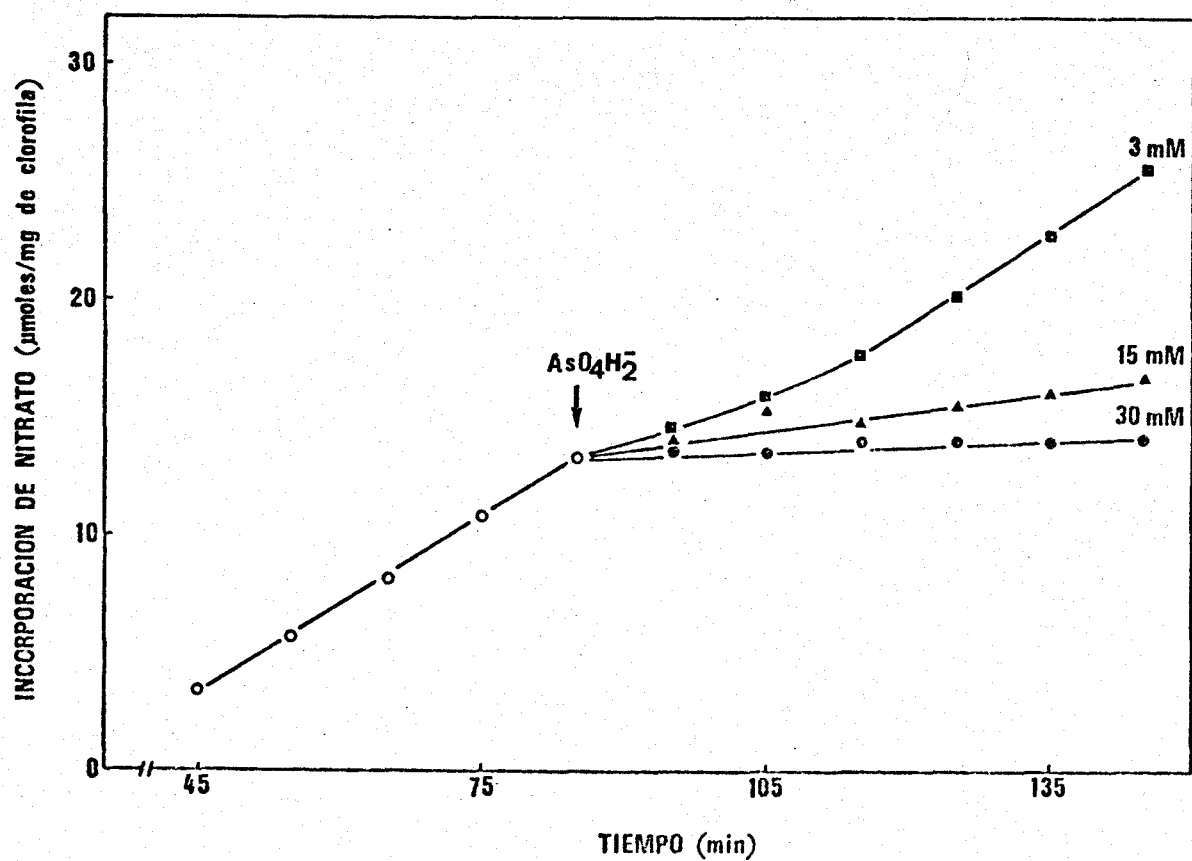


Fig. 5. Efecto de distintas concentraciones de arseniato en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Condiciones experimentales similares a las de la fig. 1. Donde se indica, se añadió Na_2HAsO_4 3 mM, 15 mM ó 30 mM

III.2. ASIMILACION DEL NITRITO POR CELULAS DE *Chlorella fusca*. EFECTO DEL NITRATO Y EL AMONIO

III.2.1. *Cinética de la incorporación del nitrito en luz blanca*

La cinética de incorporación de nitrito no parece tan simple como la de nitrato. Las células incorporan nitrito activamente durante la primera fase de 20 a 40 minutos, transcurridos los cuales la velocidad se hace menor durante 15-30 minutos y, a continuación, vuelve a aumentar haciéndose ya su incorporación proporcional al tiempo, hasta que es agotado por las células del cultivo. Con mayor o menor variabilidad en cuanto a la duración de las dos primeras fases, la cinética de incorporación descrita se ha repetido en prácticamente la totalidad de los experimentos realizados (Fig. 6).

III.2.2. *Incorporación del nitrito en presencia de nitrato*

La incorporación de nitrito, en su primera fase, no se afecta por la presencia del ión nitrato, aunque es

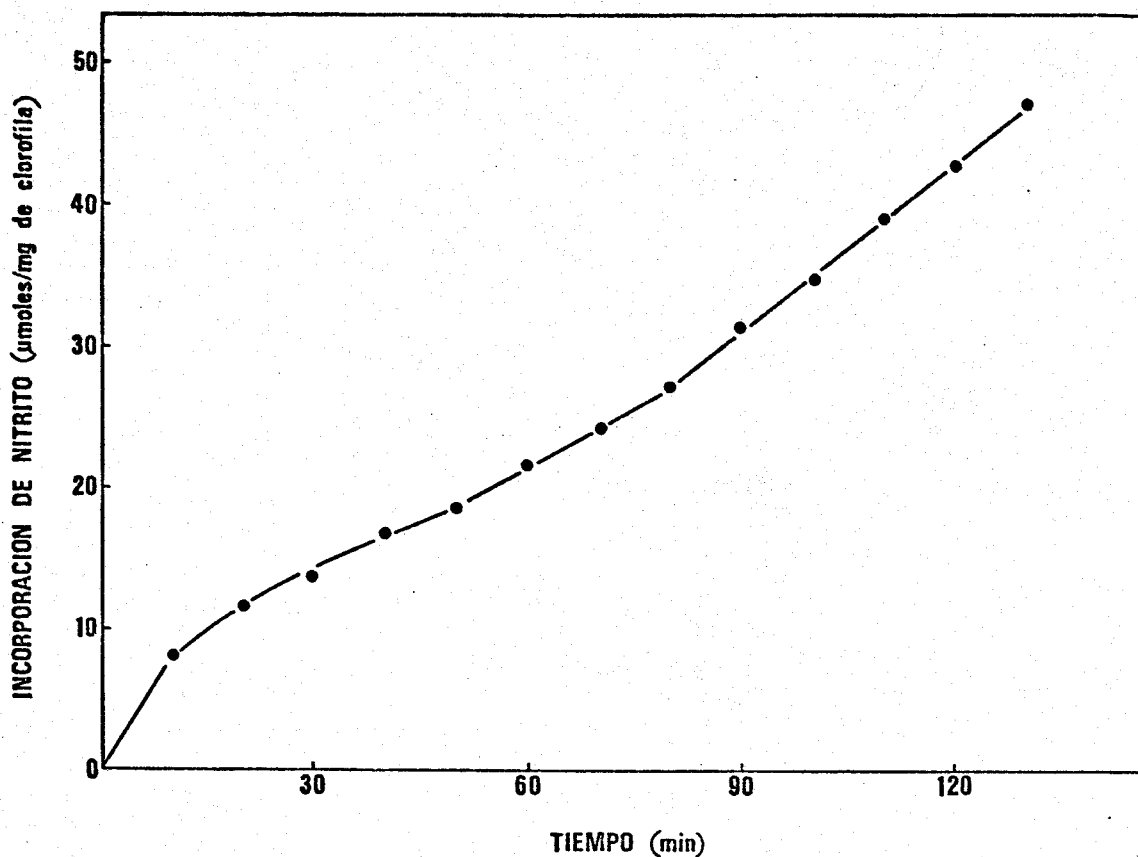


Fig. 6. Cinética de la incorporación de nitrito en luz blanca por células de *Chlorella fusca*. Células crecidas en nitrato se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno (clorofila, 30 μ g/ml), preincubándose en luz blanca durante 30 minutos. Al tiempo cero se añadió KNO_2 2 mM. La incorporación de nitrito se midió como se describe en Materiales y Métodos.

te último se encuentre en concentración 30 veces superior a la del nitrito (Tabla I).

III.2.3. *Inhibición por amonio de la incorporación del nitrito*

El amonio, al igual que sucedía en la incorporación del nitrato, inhibe eficazmente la incorporación de nitrito por células que lo estén asimilando activamente (fig. 7), siempre que su adición se efectúe en la tercera fase de la cinética de asimilación del nitrito. Sin embargo, cuando amonio y nitrito se añadieron simultáneamente, la detención de la incorporación de nitrito sufrió un retraso de unos 30 minutos (fig. 8B). Este retraso desaparecía cuando el amonio se añadía 30 minutos antes de que se adicionara el nitrito (fig. 8C).

TABLA I

EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ION NITRATO SOBRE
 LA VELOCIDAD INICIAL DE INCORPORACION DEL NITRITO
 POR CELULAS DE Chlorella fusca.

Fuente de nitrógeno	Velocidad incorporación NO_2^- ($\mu\text{moles/mg}$ de clorof. x h.)
KNO_2 0.5 mM	24
KNO_2 0.5 mM + KNO_3 0.5 mM	21
KNO_2 0.5 mM + KNO_3 2.0 mM	21
KNO_2 0.5 mM + KNO_3 15.0 mM	20

Células crecidas en nitrato se recogieron por filtración y se resuspendieron en 200 ml de medio de cultivo completo. Clorofila, 38 $\mu\text{g/ml}$. Se tomaron alícuotas de 50 ml y las células se recogieron por filtración y se resuspendieron en igual volumen de medio sin fuente de nitrógeno, preincubándose a la luz durante 30 minutos antes de añadirse las fuentes de nitrógeno que se indican. La incorporación de nitrito se siguió durante 30 minutos.

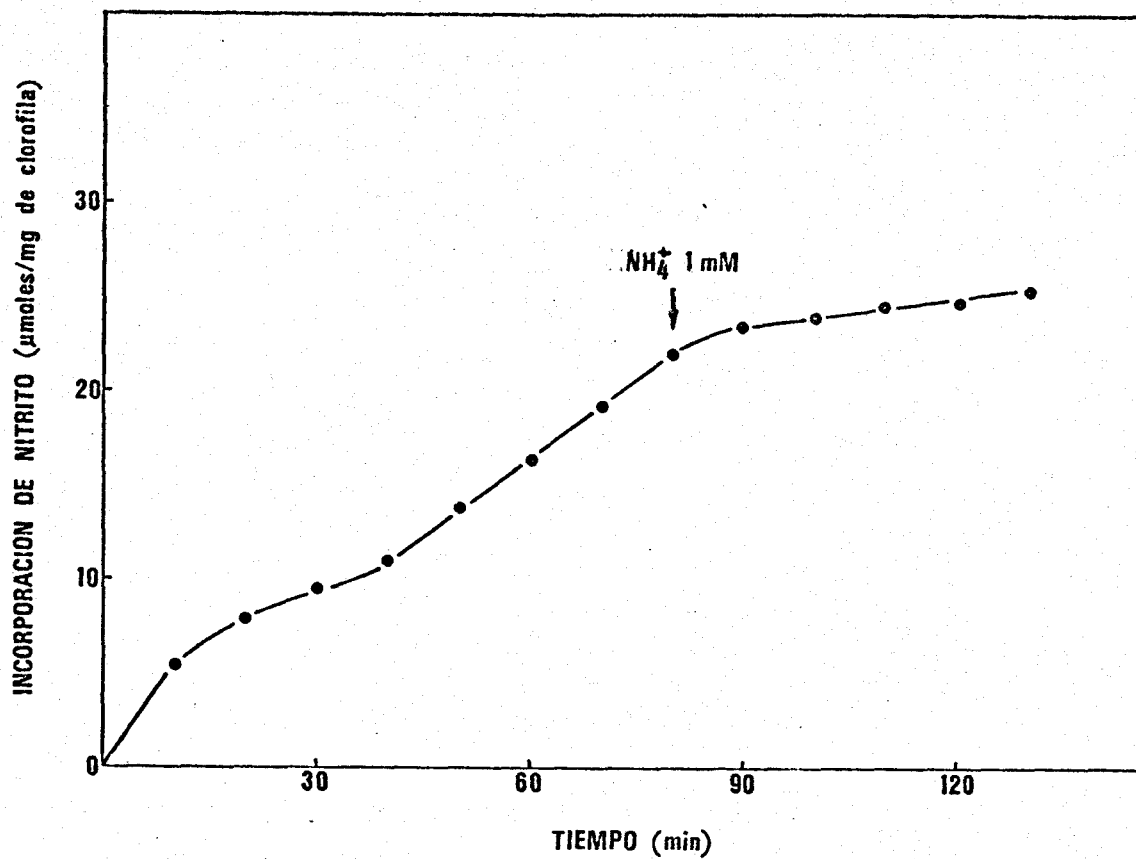


Fig. 7. Efecto del ión amonio en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Condiciones experimentales como en la fig. 6 excepto que, donde se indica, se añadió NH_4Cl 1 mM.

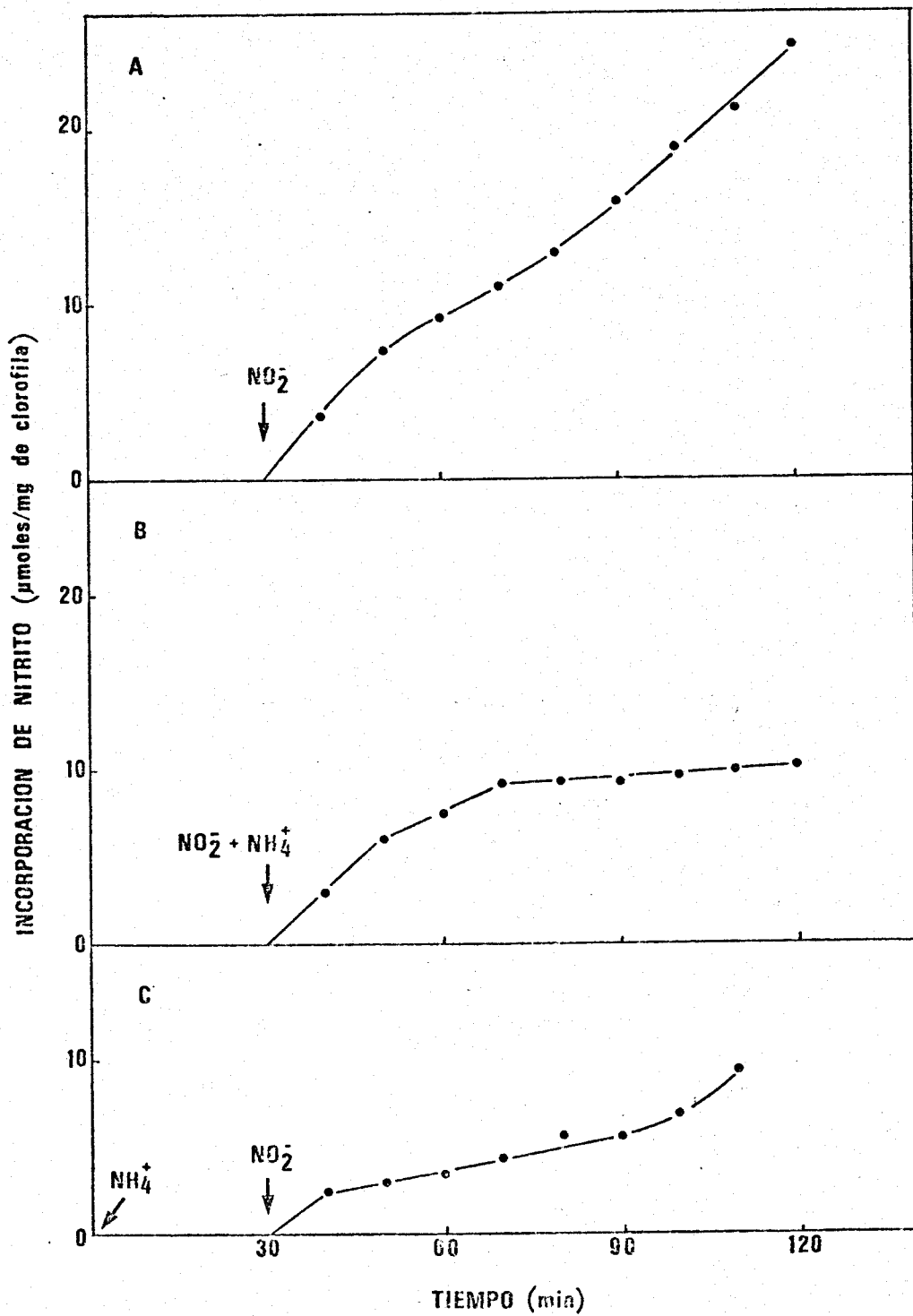


Fig. 8. Efecto de la preincubación con amonio en la incorporación del nitrito por células de *Chlorella fusca*. Células crecidas en nitrato se recogieron por filtración y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno (A, B) o en el mismo medio suplementado con NH_4Cl 2 mM. (clorofila, 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se iluminaron con luz blanca durante 30 minutos antes de añadir KNO_2 2 mM (A, B y C) y NH_4Cl 2 mM (B). Otras condiciones experimentales como se describe en Materiales y Métodos.

III.3. NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA NITRATO Y NITRITO REDUCTASA DE CELULAS DE *Chlorella fusca*. EFECTO DEL AMONIO Y LA METILAMINA

III.3.1. *Efecto del amoniaco en el nivel celular de actividades nitrato y nitrito reductasas*

Bajas concentraciones de amoniaco (1 mM), capaces de afectar drásticamente la incorporación del nitrato y del nitrito, como se ha visto anteriormente, carecen de efecto inhibitor en la actividad nitrato reductasa y también en la nitrito reductasa, ensayadas éstas en los extractos libres de células (Tabla II). Previo a la rotura, las células se incubaron con amonio durante una hora. Transcurrido este tiempo se comprobó que aún quedaba amonio en el medio de cultivo.

III.3.2. *Efecto de la metilamina en el nivel celular de actividad nitrato reductasa*

Al igual que en el caso anterior, una pequeña cantidad de metilamina, suficiente para anular casi por completo la incorporación de nitrato, no causó una pérdi

TABLA II

EFFECTO DEL ION AMONIO SOBRE EL NIVEL CELULAR DE ACTIVIDAD ENZIMATICA NITRATO REDUCTASA Y NITRITO REDUCTASA EN CELULAS DE Chlorella fusca.

Fuente de nitrógeno	Actividad NO_3^- Rasa (mU/mg)	Actividad NO_2^- Rasa (mU/mg)
KNO_3 2 mM	108	125
KNO_3 2 mM + NH_4Cl 1 mM	86	121

Células crecidas en nitrato se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio que contenía KNO_3 2 mM como fuente de nitrógeno. Clorofila, 70 $\mu\text{g/ml}$. A una alícuota se le añadió NH_4Cl 1 mM. A los 60 minutos se recogieron las células, se rompieron y en los extractos se determinó la actividad enzimática nitrato reductasa y nitrito reductasa. Otras condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

da significativa en la actividad nitrato reductasa, medida también en extractos libres de células (Tabla III). Igual que en el caso anterior, las células se incubaron con metilamina, durante una hora, antes de proceder a la preparación de los extractos.

TABLA III

EFFECTO DE LA METILAMINA SOBRE EL NIVEL CELULAR DE ACTIVIDAD ENZIMATICA NITRATO REDUCTASA EN CELULAS DE Chlorella fusca.

Fuente de nitrógeno	Actividad NO_3^- Rasa (mU/mg)	Velocidad incorp. NO_3^- ($\mu\text{mol.}/\text{mg}$ clorof. x h)
KNO_3 2 mM	91	18
KNO_3 2 mM + $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ 1 mM	87	1

Condiciones experimentales como en la tabla II excepto que se utilizó $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ 1 mM en lugar de amonio y además se midió la incorporación de nitrato como se describe en Materiales y Métodos.

III.4. PAPEL MODULADOR DE LA LUZ AZUL EN LA ASIMILACION DEL NITRATO EN *Chlorella fusca*

III.4.1. *Incorporación del nitrato por células iluminadas con distintas cualidades de luz*

La iluminación con distintos tipos de luz actínica produjo variaciones notables en la velocidad de incorporación del nitrato por células que crecen con CO_2 como fuente de carbono. Como se observa en la figura 9, las luces azul y roja fueron incapaces de mantener los consumos de nitrato observados cuando se utilizaba luz blanca como luz actínica. La intensidad de los tres tipos de luz mencionados fué ajustada a 200 W/m^2 , siendo, por el contrario, la velocidad de incorporación del nitrato, bajo luz azul, un 55% de la observada en luz blanca y siendo la roja incapaz de mostrar valores superiores al 30% de los obtenidos con luz blanca.

Por otro lado, el desprendimiento de oxígeno, medido en condiciones similares, (NO_3^- y CO_2 presentes), también se veía afectado por las cualidades de luz, si bien, a intensidades de 200 W/m^2 , únicamente la luz roja

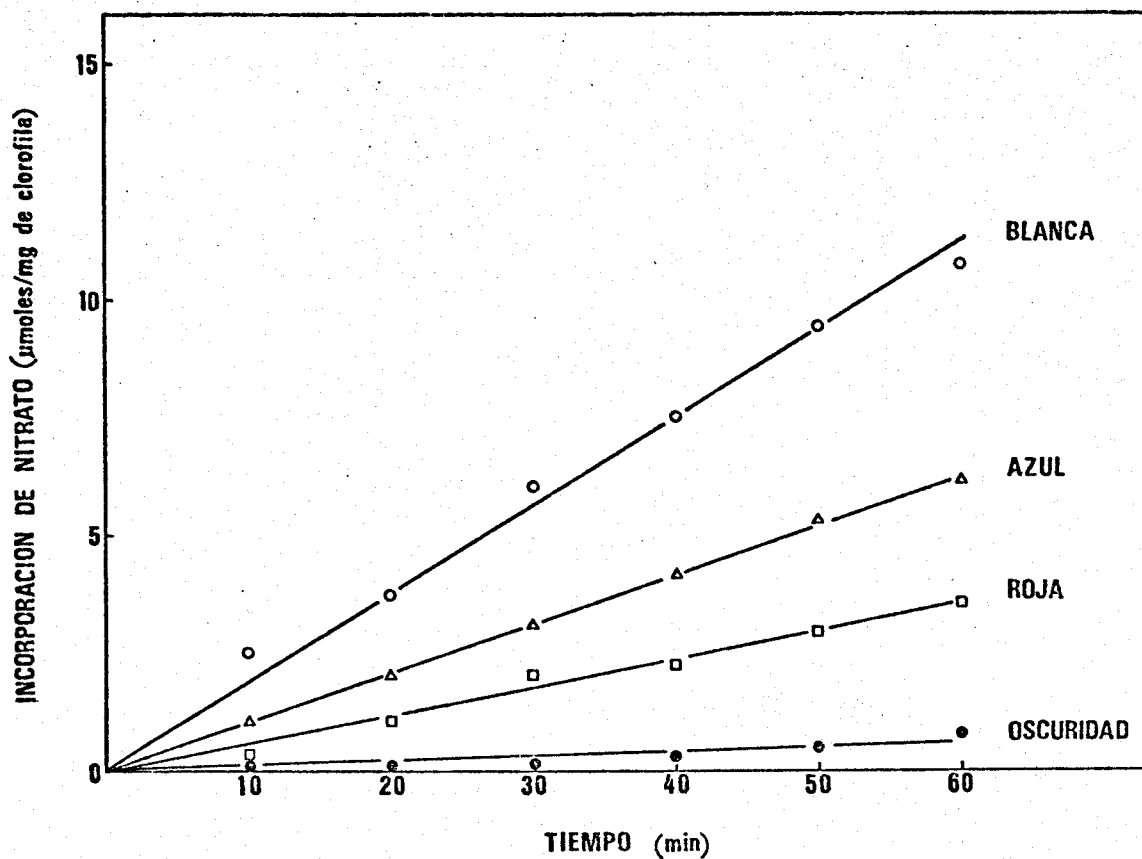


Fig. 9. Efecto de las luces blanca, azul y roja de igual intensidad, en la cinética de incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. De un mismo cultivo de células se recogieron por filtración alícuotas que se resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno y se preincubaron 30 minutos en luz blanca. Al tiempo cero se les añadió KNO_3 2 mM y se mantuvieron en la oscuridad o se iluminaron con la luz que se indica. Intensidad luminosa 200 W/m^2 .

era menos efectiva, proporcionando valores de desprendimiento de oxígeno que alcanzaban el 75% de los obtenidos en luz blanca. Cuando las intensidades luminosas superaban los 200 W/m^2 , la velocidad de incorporación de nitrato se hizo independiente del tipo de iluminación (Tabla IV).

III.4.2. *Efecto de distintas intensidades de luz azul roja sobre la velocidad de incorporación del nitrato*

En la figura 10, puede apreciarse que la luz azul es más efectiva que la roja en la incorporación del nitrato, cuando las intensidades no superan los 300 W/m^2 . A intensidades superiores a este valor, los dos tipos de luz eran igualmente efectivos.

Asimismo, la figura 10 muestra que el proceso de la incorporación del nitrato alcanzó la saturación con menores intensidades de luz azul que de roja. Si bien, se debe hacer notar que, aún en condiciones de iluminación saturante para las dos luces empleadas, no se consiguieron alcanzar los valores de velocidad de incorporación de

TABLA IV

EFFECTO DE LA CUALIDAD E INTENSIDAD DE LA LUZ EN LA VELOCIDAD DE DESPRENDIMIENTO DE OXIGENO POR CELULAS DE Chlorella fusca.

Iluminación	Intensidad lumin. (W/m ²)	Velocidad desprend.O ₂ (µmoles/mg clorofila x h.)
BLANCA	300	201
AZUL	200	198
	150	169
	50	122
ROJA	300	190
	200	140
	66	79

Las medidas de velocidad de desprendimiento de oxígeno se llevaron a cabo por el método polarográfico tal como se describe en Materiales y Métodos. La cámara de reacción del electrodo contenía 3 ml de una suspensión de células (clorofila, 30 µg/ml), en medio con nitrato 15 mM, previamente gaseada con nitrógeno, en la oscuridad, durante 30 minutos.

Antes de iluminar se añadió 1.32 mM de NaHCO₃.

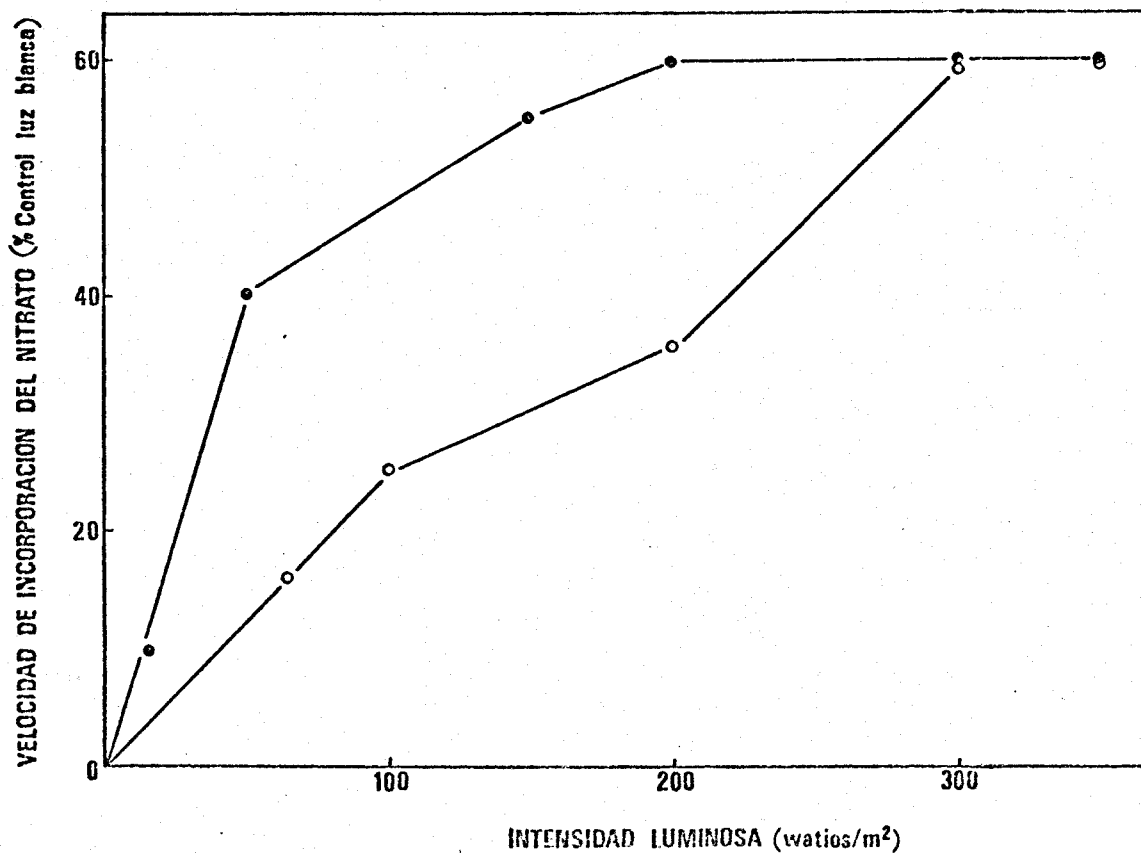


Fig. 10. Efecto de distintas intensidades de luz azul y roja en la velocidad de incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca*. Los puntos representan distintos experimentos en los que se determinó la incorporación del nitrato iluminando las células con luz blanca saturante (300 W/m²) y a continuación, según los casos, con luz azul (●—●) o roja (○—○) a las intensidades que se indican.

Los valores de concentración de clorofila variaron entre 30 y 40 µg/ml.

Cada punto es la media de, al menos, cinco experimentos.

nitrato obtenidos con luz blanca.

III.4.3. *Incorporación de nitrato por células sometidas a periodos de iluminación sucesivos de luz azul, roja y blanca*

La figura 11 muestra la incorporación de nitrato por células iluminadas con luces azul, roja y blanca, de 200 W/m^2 de intensidad y se puede apreciar que la respuesta a los cambios de luz fué practicamente inmediata e independiente del orden en que se procediera a iluminar con los distintos tipos de luz.

Resultados similares se obtuvieron cuando las células se iluminaron en condiciones saturantes de iluminación, 300 , 290 y 200 W/m^2 , para las tres cualidades de luz empleadas, blanca, azul y roja, respectivamente (fig. 12).

III.4.4. *Acción conjunta de la luz azul y roja sobre la velocidad de incorporación del nitrato*

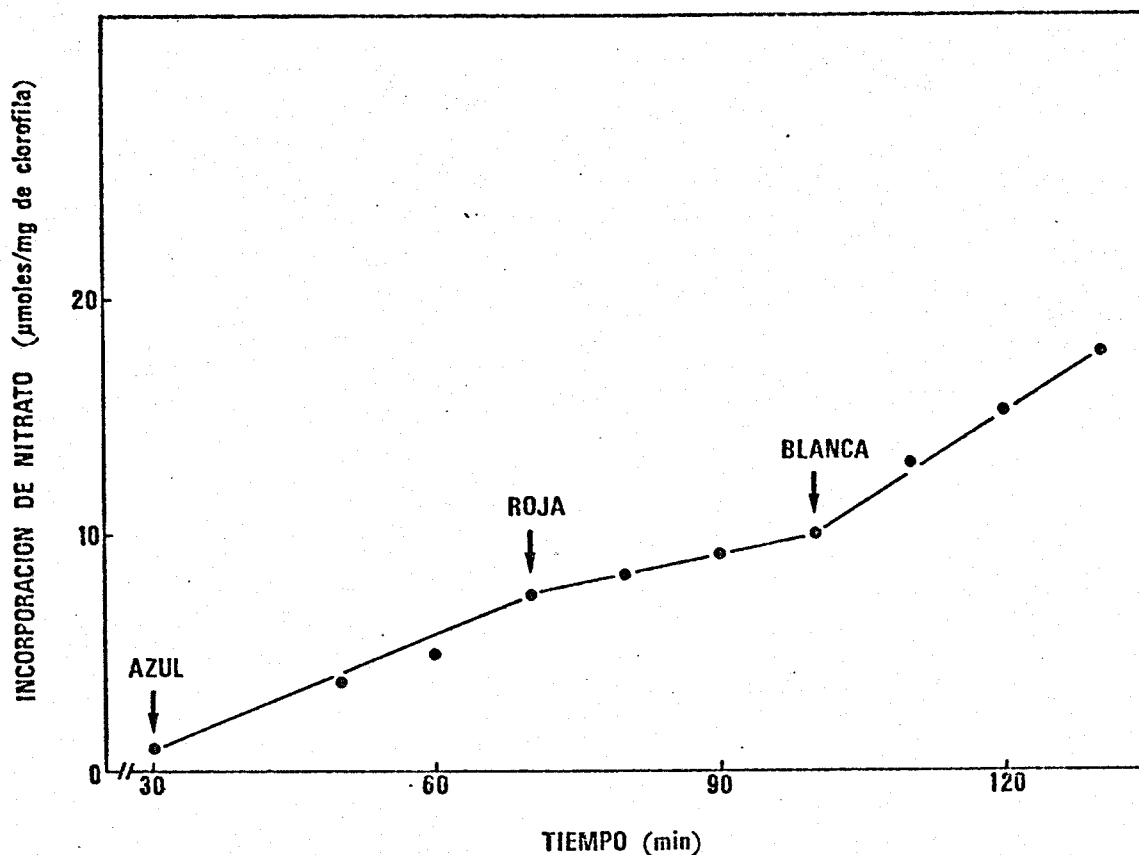


Fig. 11. Incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca* sometidas a periodos de iluminación sucesivos de luz azul, roja y blanca de igual intensidad.- Células recogidas por filtración se lavaron y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno, preincubándose en luz blanca durante 30 minutos. Concentración de clorofila, 34 µg/ml. Bajo estas condiciones de iluminación, a tiempo cero se añadió KNO_3 2 mM y, transcurridos 30 minutos, se midió su incorporación bajo los tipos de luz indicados. Las flechas indican los distintos periodos de iluminación, coincidiendo el fin de uno con el inicio del siguiente. La intensidad luminosa para los tres tipos de luz fue de 220 W/m^2 .

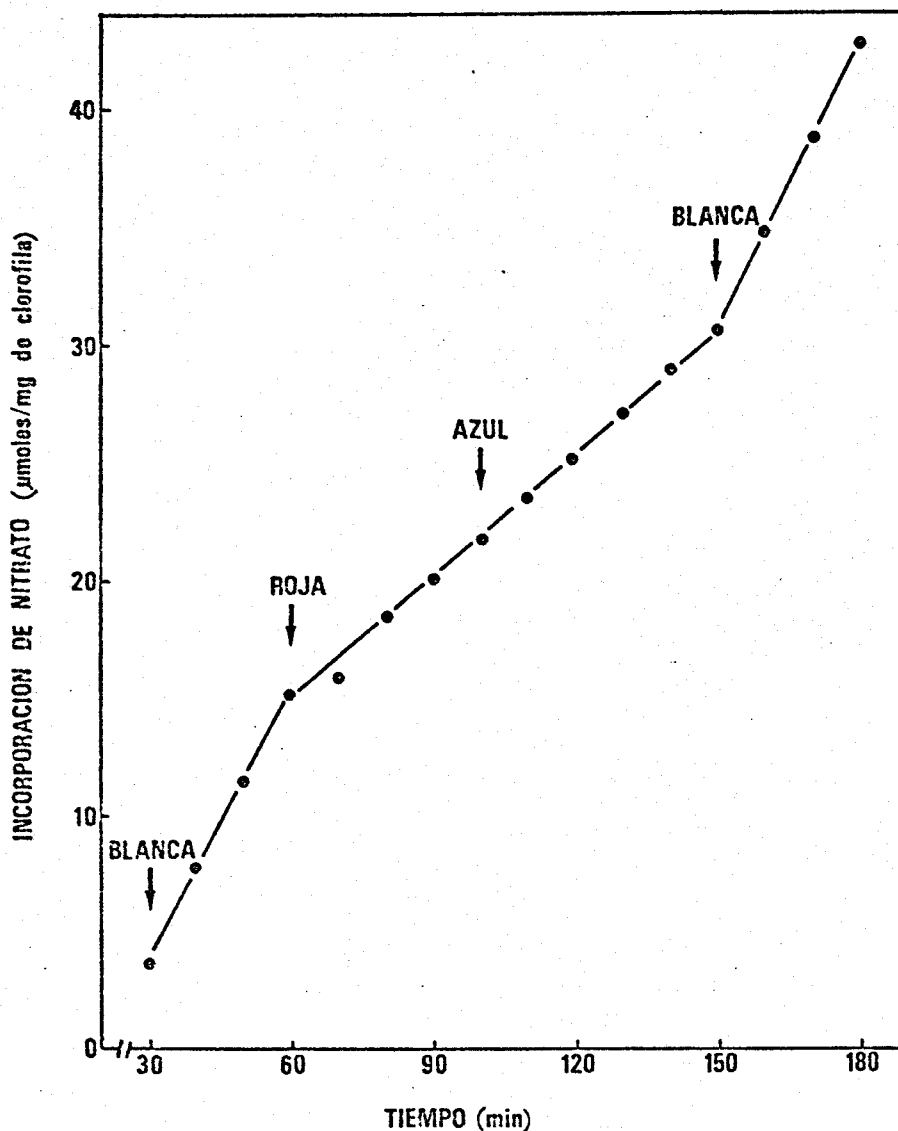


Fig. 12. Incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca* iluminadas con periodos sucesivos de luz azul, roja y blanca a intensidad saturante. Condiciones experimentales como en la figura anterior excepto que las intensidades luminosas fueron 300, 290 y 200 W/m^2 para las luces blanca, azul y roja respectivamente.

El disponer de dos fuentes de iluminación, nos permitió medir la incorporación de nitrato cuando las células se sometían a períodos de iluminación con luz azul y roja actuando simultáneamente. En este caso, la velocidad de desaparición de nitrato del medio, alcanzó valores comparables a los medidos cuando la iluminación se efectuaba con luz blanca (tabla V). Cuando se iluminaron las células con luz roja de mayor intensidad (400 W/m^2), equivalente a la que se proporcionaba con la actuación conjunta de la roja y la azul, no se apreció ningún incremento en la velocidad de incorporación del nitrato.

III.4.5. *Incorporación de nitrito y amonio por células iluminadas con distintas cualidades de luz*

En las mismas condiciones que en la figura 9, las células de *Chlorella fusca* incorporaban el nitrito independientemente del tipo de luz empleado (tabla VI). Cuando la fuente de nitrógeno fue amonio, la desaparición del mismo del medio se afectó sólo ligeramente por la cualidad de luz utilizada (tabla VI).

TABLA V

EFFECTO DE LA ACCION CONJUNTA DE LAS LUCES AZUL Y ROJA
 SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DEL NITRATO
 POR CELULAS DE Chlorella fusca.

Iluminación	Intensidad luminosa (W/m ²)	Velocidad incorp NO ₃ ⁻ (μmol./mg clorof x h)
ROJA	300	17
	400	17
ROJA + AZUL	210 + 150	27
BLANCA	400	32

Condiciones experimentales como en la figura 11 salvo los tipos de luz y su intensidad.

TABLA VI

EFFECTO DE LA LUZ BLANCA, AZUL Y ROJA SOBRE LAS VELOCIDADES DE INCORPORACION DE NITRITO Y DE AMONIO POR CELULAS DE Chlorella fusca

Iluminación	Velocidad incorp. NO_2^- ($\mu\text{mol.}/\text{mg}$ clorof. x h)	Velocidad incorp. NH_4^+ ($\mu\text{mol.}/\text{mg}$ clorof. x h)
BLANCA	20	23
AZUL	19	19
ROJA	19	17

Condiciones experimentales similares a las de la fig. 9, excepto que las fuentes de nitrógeno fueron KNO_2 2 mM ó NH_4Cl 2 mM en lugar de KNO_3 .

III.4.6. *Efecto del DCMU y su reversión por glucosa, sobre la incorporación del nitrato dependiente de la luz*

La adición de DCMU 20 μM a una suspensión de células creciendo en nitrato como única fuente de nitrógeno, produjo un 70% de inhibición en la velocidad de incorporación de dicho ión, en luz blanca (fig. 13). Esta inhibición se revertió por la adición de glucosa 30 mM, alcanzándose velocidades similares a las que se obtenían antes del tratamiento con el inhibidor, si bien, se apreciaba una fase de latencia de corta duración.

III.4.7. *Incorporación de nitrato, dependiente de glucosa, en presencia de DCMU. Efecto de las luces blanca, azul y roja de alta intensidad*

Cuando la incorporación de nitrato se midió en una suspensión celular, en presencia de DCMU, que utilizaba glucosa como fuente de carbono, el efecto de los distintos tipos de iluminación fué muy diferente al observado cuando las células fijaban el CO_2 en la luz. En estas condiciones, la luz azul fué un eficaz agente estimulador

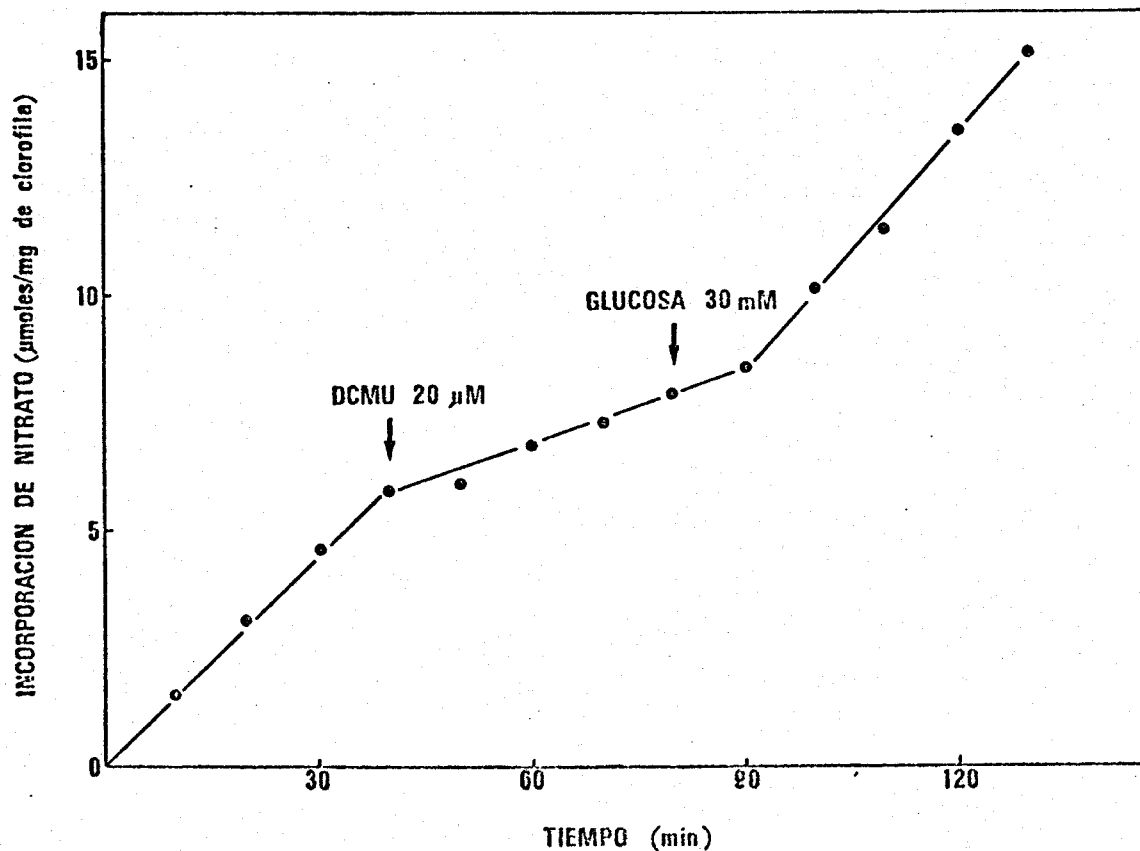


Fig. 13. Efecto del DCMU y su reversión por glucosa, en la incorporación del nitrato por células de *Chlorella fusca* iluminadas con luz blanca. Células crecidas en nitrato se recogieron por filtración y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno, (clorofila, 39 µg/ml), preincubándose 30 minutos en luz blanca (230 W/m²). Al tiempo cero se añadió KNO₃ 2 mM midiéndose su incorporación en las mismas condiciones de iluminación. Donde se indica, se añadió DCMU 20 µM y glucosa 30 mM.

de la velocidad de incorporación, mientras que la luz roja no ejerció ningún efecto, desapareciendo el nitrato del medio a la misma velocidad que en oscuridad (fig.14). La estimulación fué, en todos los experimentos realizados, superior al 100% y tenía lugar inmediatamente, cesando en cuanto se interrumpía la iluminación.

III.4.8. *Efecto de ditintos tipos de luz monocromática de baja intensidad en la incorporación de nitrato dependiente de glucosa, en presencia de DCMU*

El efecto estimulador de la luz azul, descrito en el capítulo anterior, se mantenía al iluminar las células con luz azul obtenida utilizando un filtro de longitud de onda específica, 457 nm, con 10 nm de anchura de banda, que transmite una radiación luminosa de baja intensidad (fig.15).

Tampoco en este caso se observó efecto alguno por parte de la luz roja, que se obtuvo con un filtro de 666 nm, de características semejantes al empleado para la luz azul.

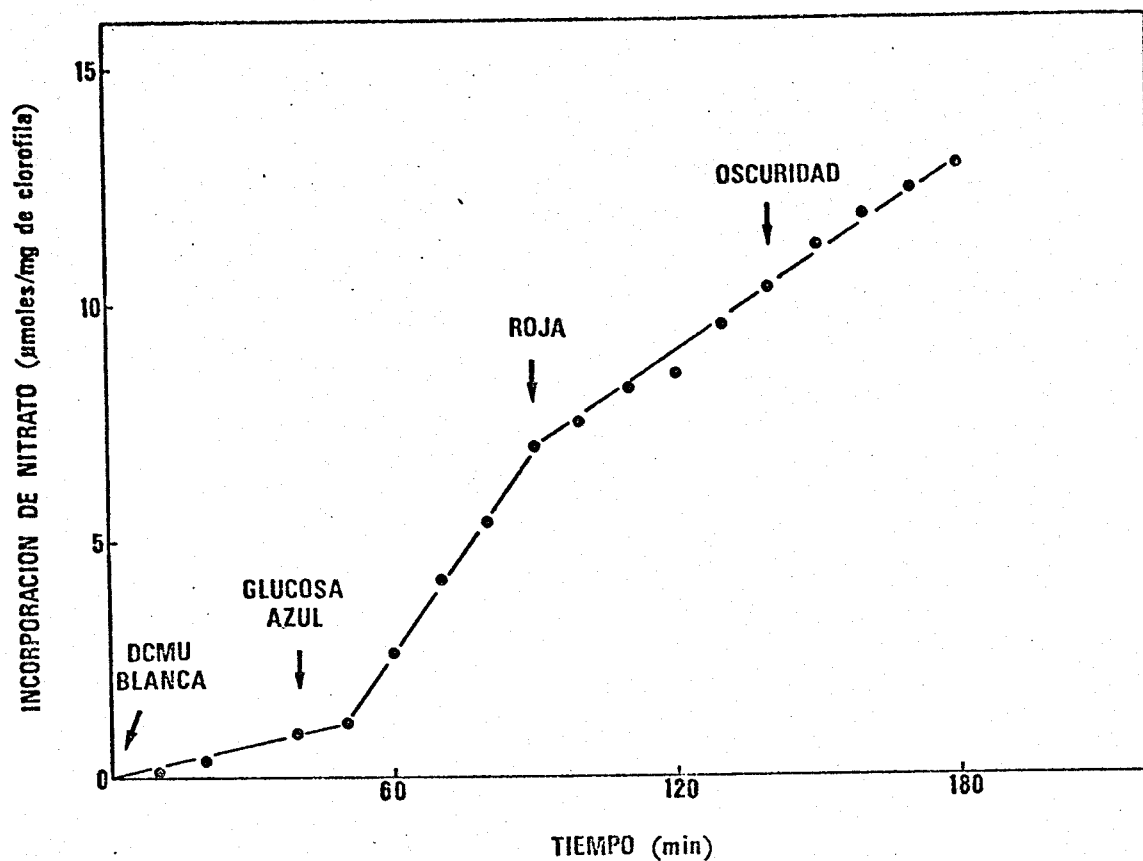


Fig. 14. Efecto de la luz azul y roja de alta intensidad sobre la incorporación de nitrato dependiente de glucosa por células de *Chlorella fusca*. Células crecidas en nitrato se recogieron por filtración y se resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno a una concentración de clorofila de $41 \mu\text{g/ml}$, preincubándose en luz blanca 30 minutos. Bajo estas condiciones de iluminación se añadió, al tiempo cero, DCMU $30 \mu\text{M}$ y KNO_3 2 mM . Donde se indica, se añadió glucosa 30 mM y la luz blanca se substituyó por la luz azul.

Las flechas señalan el comienzo de los tipos de iluminación indicados, así como del periodo de oscuridad.

Intensidad luminosa de los tres tipos de luz, 250 W/m^2 .

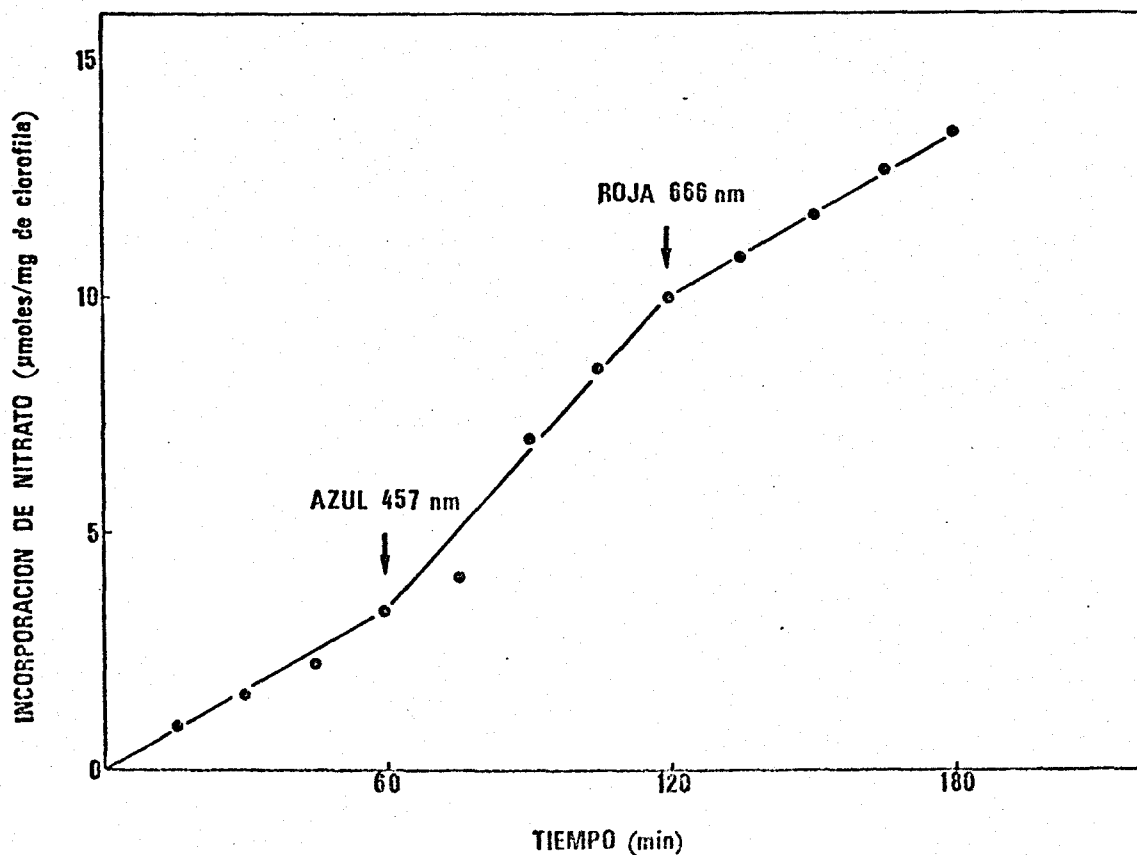


Fig. 15. Efecto de la luz monocromática azul y roja de baja intensidad sobre la incorporación de nitrato dependiente de glucosa por células de *Chlorella fusca*. Las células se recogieron por filtración y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno (clorofila, 50 µg/ml), pre incubándose en luz blanca durante 30 minutos. Al tiempo cero se apagó la luz y se añadió DCMU 30 µM, glucosa 30 mM y KNO_3 2 mM. Donde se indica, se iluminó con luz de la longitud de onda especificada. Intensidad luminosa 3.5 W/m^2 en ambos casos. Otras condiciones experimentales como se describe en Materiales y Métodos.

III.4.9. *Incorporación de nitrato, dependiente de glucosa, por células iluminadas con distintas longitudes de onda de luces azul y roja, en presencia de DCMU*

Como se puede ver en la tabla VII, la luz azul de 457 nm fué la más efectiva para producir un efecto estimulador en la incorporación del nitrato dependiente de glucosa, por células tratadas con DCMU. La luz de 423 nm produjo un incremento en la velocidad de incorporación, menor que el producido por la de 457 nm. Las luces rojas de cualquiera de las dos longitudes de onda empleadas, 666 y 720 nm, fueron inefectivas para aumentar el valor de la velocidad que se midió en oscuridad.

En la misma tabla se puede apreciar que la acción conjunta de la luz azul de 457 nm y la roja de 666 nm no produjeron un efecto estimulador superior al obtenido con luz azul, a diferencia de lo encontrado en células que consumían nitrato, utilizando CO_2 como fuente de carbono y, por tanto, en ausencia de DCMU y glucosa.

TABLA VII

EFFECTO DE DISTINTAS LONGITUDES DE ONDA DE LUZ AZUL Y ROJA EN LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DEL NITRATO DEPENDIENTE DE GLUCOSA POR CELULAS DE Chlorella fusca.

Iluminación (3.5 W/m ²)	Velocidad incorp. NO ₃ ⁻ (% control oscuridad)
NINGUNA	100
AZUL 457 nm	213
AZUL 423 nm	169
ROJA 666 nm	100
ROJA 720 nm	94
ROJA 666 nm + AZUL 457 nm	218

Condiciones experimentales como en la figura 15 excepto que los períodos de iluminación sucesivos fueron azul 457 nm, azul 423 nm en un caso, y roja 666 nm, roja 720 nm y roja 666 nm + azul 457 nm en otro.

El 100 % de velocidad de incorporación corresponde a un valor de 5 μ mol./mg clorof. x hora.

III.4.10. *Incorporación de nitrito y amoniaco dependiente de glucosa. Influencia de la luz azul monocromática de baja intensidad*

La velocidad de incorporación de nitrito o de amonio en oscuridad, por células que, en presencia de DCMU, utilizaban glucosa como fuente de carbono, no se afectó cuando dichas células se iluminaron con luz azul de 457 nm.

En la tabla VIII puede comprobarse que los valores de incorporación de nitrito o de amonio fueron similares, tanto en oscuridad como en el caso en que hubo iluminación azul monocromática de baja intensidad.

III.4.11. *Actividad enzimática nitrato reductasa de células tratadas con distintas cualidades de luz*

La actividad nitrato reductasa de células creciendo fotosintéticamente con CO_2 iluminadas durante 60 minutos con luz azul o roja, fué totalmente comparable a la obtenida con la luz blanca (Tabla IX).

TABLA VIII

EFFECTO DE LA LUZ AZUL MONOCROMATICA DE BAJA INTENSIDAD EN LA INCORPORACION DEL NITRITO Y DEL AMONIO DEPENDIENTE DE GLUCOSA POR CELULAS DE Chlorella fusca.

Iluminación (3.5 W/m ²)	Velocidad incorp. NO ₂ ⁻ (μmol./mg clorof x h)	Velocidad incorp. NH ₄ ⁺ (μmol./mg clorof x h)
Ninguna	15	9
AZUL 457 nm	13.5	9

Las células se recogieron por filtración y se resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno, (clorofila, 39 μg/ml) preincubándose a la luz durante 30 minutos. Al tiempo cero se apagó la luz y se añadió DCMU 30 μM, glucosa 30 mM y, según los casos, KNO₂ 2 mM ó NH₄Cl 1 mM. Tras 30 minutos de oscuridad se iluminó con la luz que se especifica.

TABLA IX

EFFECTO DE DISTINTOS TIPOS DE ILUMINACION EN EL NIVEL CELULAR DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca.

Iluminación	Nitrato reductasa (Actividad relativa)	Incorporación de nitrato (Velocidad relativa)
BLANCA	100	100
AZUL	90	53
ROJA	92	50

Las células se recogieron por filtración y se resuspendieron en medio con KNO_3 2 mM como fuente de nitrógeno, a una concentración de clorofila de 50 $\mu\text{g/ml}$. Después de 60 minutos de incubación con la luz que se indica, las células se recogieron por centrifugación, se rompieron y en los extractos se determinó la actividad nitrato reductasa. Intensidad luminosa 200 W/m^2 .

El 100 % de actividad enzimática corresponde a un valor de 40 μmoles de NO_3^- reducidos/mg de clorofila x hora, y el de velocidad de incorporación de nitrato a 22 μmoles de NO_3^- incorporado/mg de clorofila x hora.

III.4.12. *Incorporación de nitrato en ausencia de CO₂ por células sometidas a distintos tratamientos de iluminación*

Por último, se ha estudiado el efecto de las luces azul y roja sobre la incorporación del nitrato en ausencia de CO₂.

Syrett y Morris (1963), describieron que células de *Chlorella vulgaris*, previamente mantenidas en oscuridad con el fin de provocar un empobrecimiento interno en carbohidratos, podían incorporar nitrato a la luz en ausencia de CO₂, pero dicho ión se acumulaba en forma de amonio en el medio de cultivo.

Por otro lado, las células de *C. fusca* incorporan el nitrato más activamente a pH 8 que a pH 6, sobre todo en condiciones de baja tensión de CO₂ (Florencio, 1978).

Nosotros hemos observado que en parecidas circunstancias, es decir, con células previamente manteni -

das en oscuridad durante 18 horas, con bajas tensiones de CO_2 y a pH 8, la incorporación de nitrato fué independiente de la cualidad de luz utilizada (Tabla X). Tanto la luz azul, como la roja, produjeron velocidades de incorporación similares a las producidas por la luz blanca.

En estas condiciones experimentales, todo el nitrato consumido por las células se excretó al medio de cultivo como nitrito y amoniaco, en cantidades prácticamente equivalentes.

TABLA X

INCORPORACION DE NITRATO EN AUSENCIA DE CO₂ POR CELULAS DE Chlorella fusca ILUMINADAS CON DISTINTAS CUALIDADES DE LUZ

Iluminación (200 W/m ²)	Velocidad incorp. NO ₃ ⁻ (% control luz blanca)
BLANCA	100
AZUL	99
ROJA	102

Células crecidas en nitrato y posteriormente mantenidas 18 horas en oscuridad, se recogieron por filtración, lavaron y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno, (clorofila, 33 μ moles/ml), preincubándose durante 30 minutos en luz blanca y aire pasado a través de una disolución saturada de KOH. Al tiempo cero se añadió KNO₃ 2 mM y se midió su incorporación en luz blanca y a continuación en luz azul o en luz roja.

El 100 % de velocidad de incorporación de nitrato corresponde a un valor de 11 μ moles/mg de clorofila x h.

IV. DISCUSSION

Las formas de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las algas verdes incluyen iones inorgánicos, nitrato, nitrito, amonio, y compuestos orgánicos como urea, aminoácidos y purinas. De todas ellas, el nitrato y el amonio son las más importantes desde el punto de vista fisiológico (Syrett y Leftley, 1976). El nitrito, que en la naturaleza aparece en pequeñas cantidades como producto intermedio del proceso de nitrificación, no contribuye de forma cuantitativamente importante a la nutrición nitrogenada de los organismos vegetales. No obstante, puede asimilarse eficazmente, habiéndose descrito en algún caso la presencia de sistemas de transporte específicos para este ión (Schloemer y Garrett, 1974b). *Chlorella fusca* puede asimilar este anión siempre que su concentración en el medio no supere el nivel de 2 mM, puesto que concentraciones mayores son tóxicas para este alga (Knutsen, 1965).

La incorporación del nitrato, etapa previa a su reducción hasta amoniaco, se afecta por muchos factores como luz, temperatura, pH, concentración de sales y particularmente desacoplantes de la fosforilación (Beever y Hageman, 1972; Ullrich, 1978; Eisele y Ullrich, 1976; Losada y Guerrero, 1978), por lo que se ha propuesto que el

mecanismo de entrada en la célula sea del tipo de transporte activo y, por ello, susceptible de regulación.

El amoníaco, producto final de la reducción asimilatoria del nitrato, es también consumido activamente por *Chlorella fusca*. Sin embargo, la adición de pequeñas cantidades del mismo a células que están utilizando nitrato como fuente de nitrógeno, provoca la detención de la incorporación del nitrato, asimilando entonces el amonio como tal, no volviendo a consumirse el nitrato hasta que todo el amonio se ha agotado del medio (fig. 2). El fenómeno era ya conocido en otras especies de algas, *Chlorella vulgaris* (Pistorius et al., 1978), *Ankistrodesmus braunii* (Díez, 1978), *Chlamydomonas reinhardii* (Thacker y Syrett, 1972), habiéndose postulado muy diversas hipótesis para explicar su lugar y mecanismo de acción (Syrett y Leftley, 1976). Esta inhibición no parece ser debida al amonio *per se*, sino a un producto de su asimilación. Así, células de *Chlorella vulgaris* que no disponen de fuente de carbono, mantenidas bajo una atmósfera libre de CO₂, incorporan y reducen el nitrato, siendo excretado al medio como nitrito y amoníaco, al carecer las células de los esqueletos carbonados necesarios para su incorporación en

el material celular (Syrett y Morris, 1963). En nuestros experimentos con *Chlorella fusca* hemos observado este mismo efecto utilizando células que no disponían de CO₂ y que además se habían mantenido previamente 18 horas en ausencia de fuentes de carbono (ver Resultados, sección III.4.12.). En estas condiciones, el amonio excretado es incapaz de detener la entrada y posterior reducción de nitrato, mientras que en presencia de una fuente de carbono adecuada su efecto inhibitor es, como ya se ha descrito, casi instantáneo.

La incorporación de nitrito sigue una cinética diferente a la de nitrato (figs. 1 y 6). En su primera fase el consumo es lineal durante los primeros 20 ó 30 minutos y, normalmente, más rápido que el de nitrato. A continuación, en lo que podría corresponderse con una segunda fase, la velocidad disminuye por un periodo variable de tiempo (15 a 30 minutos), transcurrido el cual, dicha velocidad aumenta y se hace lineal hasta que el nitrito del medio se agota. Strotmann (1967) describió una cinética de este tipo en células de *Chlorella fusca* que asimilan nitrito en condiciones de baja tensión de CO₂. Tal comportamiento no parece deberse a la utilización de concentra-

ciones de nitrato próximas a la toxicidad, puesto que con concentraciones menores de este ión, se sigue observando el mismo tipo de incorporación multifásica. En cualquier caso, una explicación convincente de este hecho requiere una mayor documentación experimental.

También en la incorporación del nitrato, el amonio produce una marcada inhibición (fig. 7), aunque difiere apreciablemente de la que se produce con la incorporación del nitrato. Syrett y Morris (1963) observaron un efecto inhibitor del amonio sobre la incorporación del nitrato en *Chlorella vulgaris*. Por otro lado, Ohmori *et al* (1977) han sugerido la independencia de la incorporación del nitrato con respecto al ión amonio en células de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*.

En nuestros experimentos, bajas concentraciones de amoníaco ejercían un marcado efecto inhibitor sobre la incorporación de nitrato por *Chlorella fusca*, siendo esta inhibición dependiente del momento en que se añade el amonio a las células. Si la adición de amonio se efectúa cuando la suspensión celular está consumiendo nitrato en lo que se ha denominado tercera fase, la inhibición es casi

inmediata (Fig. 7). Si se añade, en cambio, simultáneamente con el nitrito (primera fase), la inhibición no se produce hasta pasados 20 o 30 minutos, durante los cuales se está incorporando nitrito independientemente de la presencia de amoníaco (figs. 8a y 8b). Este retraso en la inhibición puede disminuirse apreciablemente si las células se encuentran asimilando previamente amoníaco (fig. 8c).

Al igual que ocurría con el nitrato, esta inhibición sólo se produce una vez que el amonio está siendo incorporado en esqueletos carbonados (véase fig. 8), por lo que se puede pensar que la inhibición de la incorporación del nitrato o del nitrito que produce el amoníaco, podría llevarse a cabo por mecanismos similares, siendo necesario un determinado nivel de algún(os) producto(s) de la asimilación del amonio, para que estas inhibiciones tengan lugar. Para detener la incorporación de nitrito se requerirían mayores niveles intracelulares de este(os) compuesto(s) de la asimilación del amonio, que para el caso del nitrato.

Otro posible mecanismo de acción del amoníaco que podría explicar a concentraciones superiores (15 mM),

la detención de la desaparición de nitrato del medio, consistiría en la actuación de los productos de la asimilación de este metabolito a nivel de la nitrato reductasa. En este sentido, Losada *et al* (1970) encontraron que el amoniaco, a concentraciones elevadas (15 mM) produce la inactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca*. Similares resultados se han obtenido en células de *Chlamydomonas reinhardtii* (Herrera *et al.*, 1972) y *Ankistrodesmus braunii* (Díez *et al.*, 1977). En nuestras condiciones experimentales, bajas concentraciones de amoniaco (1 mM) que inhiben casi inmediatamente la asimilación del nitrato, no tenían efecto apreciable sobre la actividad nitrato reductasa, ensayada en los correspondientes extractos celulares (Tabla II). Esto sugiere que el lugar de actuación del amoniaco se localiza, en estas condiciones, a nivel de entrada del ión en la célula, como se ha sugerido por otros autores (Pistorius *et al.*, 1978). No obstante, no se puede descartar la posibilidad que algún factor no controlado pueda influir en la determinación de la actividad nitrato reductasa en los extractos libres de células, pudiendo no corresponderse los valores de actividad así determinados, con los existentes *in vivo*.

El nitrato inhibe también muy eficazmente el consumo de nitrato (fig. 2). En principio, no parece que se trate de un efecto competitivo por un mismo lugar de entrada, puesto que concentraciones de nitrato muy superiores a las del nitrato (30 veces), no consiguen disminuir esta inhibición (Tabla I). Indirectamente, nuestros resultados sugieren que la inhibición sólo tiene lugar cuando el nitrato es asimilado por la célula. Así, células que están empobrecidas en sus niveles internos de carbohidratos, mantenidas en atmósfera libre de CO_2 , incorporan y reducen el nitrato excretando, además de amonio, nitrito al medio de cultivo (véase Resultados sección III. 4.12.).

Esta inhibición producida por el nitrato podría compartir el mismo mecanismo que la efectuada por el amoníaco. El nitrato, al metabolizarse, produce en último término amonio, el cual, una vez incorporado a esqueletos carbonados, ejercería su acción inhibidora sobre la incorporación del nitrato.

Al igual que el amonio, la metilamina y el arseniato, aunque no son metabolizables por la célula, actúan

también como potentes desacoplantes de la fosforilación fotosintética. Ambos han sido descritos como eficaces agentes inactivantes de la nitrato reductasa. Así, la adición a un cultivo de células, creciendo autotróficamente a la luz, de 15 mM de metilamina o 30 mM de arseniato, produce la inactivación de la nitrato reductasa en periodos de tiempo no inferiores a 30 minutos (Maldonado *et al.*, 1974), habiéndose sugerido que su efecto desacoplante, al provocar un aumento en el nivel celular de piridín nucleótidos reducidos y ADP, conduciría a la inactivación del enzima por reducción, proceso en el que el ADP ejercería un notable efecto cooperativo (Losada y Guerrero, 1978). En nuestras condiciones experimentales, la metilamina, a concentraciones muy bajas (1 mM), inhibe la incorporación de nitrato (fig. 4) sin llegar a afectar sensiblemente la actividad de la nitrato reductasa, cuando ésta se ensaya en los pertinentes extractos celulares (Tabla III). El arseniato también inhibe la incorporación de nitrato, si bien, en este caso se requieren concentraciones superiores a 15 mM (fig. 5).

Por otro lado, cabe señalar que la acción de diversos agentes desacoplantes, como CCCP (Ullrich *et al.*, 1974), 2,4-dinitrofenol (Ahmed y Morris, 1967) y FCCP

(Ohmori *et al.*, 1977), provoca la inhibición casi inmediata de la incorporación del nitrato, habiéndose propuesto que el paso de este ión a través de la membrana celular es dependiente de ATP. Además, el efecto desacoplante de estos compuestos, cuando se utilizan a altas concentraciones, puede provocar, en periodos de tiempo mayores (30 a 60 minutos) la inactivación de la nitrato reductasa, probablemente como consecuencia del incremento en los niveles intracelulares de poder reductor y ADP (Chaparro *et al.*, 1976). Esta inactivación se reflejaría oportunamente en la incorporación de nitrato contribuyendo a su inhibición, ya que estas células carecen de sistema vacuolar, por lo que son incapaces de almacenar cantidades apreciables de este anión.

En la última década, se ha estudiado intensamente el papel de la luz solar como agente regulador de muchos procesos metabólicos. En unos casos, dicha regulación está íntimamente unida a la actividad fotosintética de los organismos; sin embargo, en otros casos ha podido establecerse claramente que la fotomodulación de muchos fenómenos es independiente del aparato fotosintético, siendo debida a

respuestas provocadas por la excitación de fotorreceptores específicos, como fitocromo, flavinas, etc. .

La modulación de la actividad enzimática, modelo muy generalizado de actuación de la luz como agente regulador, se ha estudiado en el caso de enzimas relacionados con la asimilación del CO_2 . Aquí, la luz, es capaz de regular su actividad cambiando el estado de oxido-reducción de la proteína, cambio que está gobernado por el nivel de poder reductor celular, el cual es regulado, en última instancia, por la luz, a través de la maquinaria fotosintética. El grupo de Buchanan ha puesto de manifiesto la existencia de un mecanismo de regulación que es común para los siguientes enzimas: fructosa 1,6 difosfatasa, fosforribulosa kinasa, sedoheptulosa 1,6 difosfatasa, NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y NADP-malato deshidrogenasa, a través de un sistema en el que interviene la ferredoxina, que en su forma reducida, y mediante un enzima flavínico, la tiorredoxina reductasa, reduce a la tiorredoxina, proteína con alto contenido en grupos sulfhidrilos, que activaría, por reducción, a los enzimas antes citados (Schurman *et al.*, 1976; Wolosiuk y Buchanan, 1977; Wolosiuk *et al.*, 1977).

La conexión entre los procesos fotosintéticos y la asimilación del nitrato parece, en el momento actual, fuera de toda duda. Recientemente, se ha demostrado que en cianobacterias, el poder reductor requerido en la reducción asimilatoria del nitrato, es suministrado de forma directa a través de la ferredoxina (Candau *et al.*, 1976; Ortega *et al.*, 1976), mientras que en algas verdes y plantas superiores, la conexión, aunque no tan inmediata, se realiza a través de los piridín nucleótidos, que son reducidos por el sistema fotosintético (Paneque *et al.*, 1969).

Dado que las distintas cualidades de la luz solar, concretamente la luz azul y la roja son, a partir de una determinada intensidad, igualmente efectivas para producir rendimientos óptimos de fotosíntesis (Tabla IV), podría esperarse que la asimilación del nitrato fuese independiente de la cualidad de la luz.

Nuestros resultados indican, por el contrario, que células de *Chlorella*, cuya velocidad de fotosíntesis es similar, tanto en luz blanca como en azul o roja, no muestran valores semejantes de velocidad de incorporación de nitrato: la luz azul no llega a alcanzar, en los mejo-

res casos, el 60% de la velocidad que se mide en luz blanca (Fig. 9). La luz roja tampoco es capaz de igualar el efecto de la luz blanca y, a intensidades por debajo de 200 W/m^2 , es todavía mucho menos efectiva que la luz azul (Fig. 10). Únicamente se obtienen velocidades comparables a las de luz blanca, cuando las células se iluminan simultáneamente con luz roja y azul (Tabla V).

Aparicio *et al.* (1976) describieron un mecanismo de fotoactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* y hojas de espinaca, que era específico de la luz azul. En este caso, la acción directa de la luz sobre el componente flavínico del enzima, provocaría la fotooxidación de la proteína y, en consecuencia, su reactivación.

Jones *et al.* (1976) describieron también un efecto activador de la luz azul sobre la nitrato reductasa de plántulas de maíz y guisante. El nivel de actividad enzimática de las plántulas tratadas con la luz azul de baja intensidad, era 2 ó 3 veces superior al encontrado en las plántulas sometidas a la luz roja.

En nuestras condiciones, no hemos podido encon-

trar diferencias significativas en los niveles de actividad nitrato reductasa, correspondientes a células iluminadas con distintas cualidades de luz: blanca, azul y roja (Tabla IX)

En la Tabla VI puede verse que, al contrario de lo que ocurre en la incorporación del nitrato, la asimilación del nitrito y del amonio no se afecta por la cualidad de la luz. Este resultado nos permite sugerir que la acción de la luz en la asimilación del nitrato, debe situarse directamente sobre la incorporación del mismo y no sobre pasos posteriores del metabolismo del nitrógeno.

Cuando las células consumen nitrato y lo excretan como amonio por no poderlo fijar a esqueletos carbonados, la incorporación del nitrato se hace independiente del tipo de iluminación (Tabla X), sugiriendo que para observar una respuesta diferencial en la incorporación del nitrato por los distintos tipos de luz, se requiere que el amonio se esté asimilando en esqueletos carbonados o, simplemente, que el CO_2 esté siendo fijado.

El DCMU, inhibidor de la cadena de transporte de electrones en fotosíntesis, produce una inhibición en

la incorporación del nitrato a la luz, siendo dicha inhibición revertida por la adición de glucosa. Este hecho permite pensar que el poder reductor requerido para la reducción del nitrato pueda obtenerse, bien por la maquinaria fotosintética, o bien por la metabolización de la glucosa que proporcionaría poder reductor y esqueletos carbonados. De hecho, las células de *Chlorella*, en oscuridad y utilizando glucosa como fuente de carbono y energía, asimilan nitrato a velocidades similares a las observadas en condiciones fototróficas, independientemente de la presencia de DCMU.

En células de *Chlorella fusca* tratadas con DCMU que incorporan nitrato en oscuridad utilizando glucosa, la luz azul de alta intensidad provoca una fotoestimulación de la asimilación del nitrato que se traduce en un incremento de su velocidad de incorporación superior al 100%. La luz roja, en estas condiciones, no produce, sin embargo, efecto estimulador alguno y el nivel de velocidad que se observa en su presencia es igual al obtenido en oscuridad (figs. 14 y 15).

El mismo grado de estimulación se obtiene con bajas intensidades de luz azul (3.5 W/m^2), lo cual hace suponer que se trate de un fenómeno de trascendencia fisiológica. Además, esta fotoestimulación de la incorporación del nitrato dependiente de glucosa, producida por la luz azul parece ser específica para el ión nitrato ya que ni la incorporación del nitrito, ni la del amoníaco, se afectan por la iluminación con luz azul (Tabla VIII) y las respectivas velocidades de incorporación son iguales que en oscuridad.

En contraste con los sistemas de regulación que modulan la actividad de los distintos enzimas de la asimilación del CO_2 , dependientes, como vimos, de fotosíntesis a través de la ferredoxina, el mecanismo de regulación de la asimilación del nitrato por luz azul, parece operar totalmente al margen de la maquinaria fotosintética, fundamentalmente por las siguientes razones:

- 1) El DCMU detiene la incorporación fototrófica del nitrato.
- 2) En presencia de glucosa y DCMU, la intensidad luminosa necesaria para producir la fotoestimulación en la asimilación de nitrato, es lo suficientemente baja como para supo

ner que es incapaz de provocar la fotólisis del agua.

3) El hecho de que la luz roja no sea capaz de estimular la incorporación de nitrato dependiente de glucosa, excluye la posibilidad de que la fotofosforilación cíclica, que no es inhibida por DCMU, pueda estar involucrada en este mecanismo.

4) La longitud de onda de azul que se mostró más efectiva en el aumento de la velocidad de incorporación de nitrato (457 nm), no se corresponde con el máximo de absorbancia de la zona azul del espectro de absorción de la clorofila, lo cual sugiere que el pigmento fotorreceptor debe ser de otra naturaleza (Tabla VII).

Kovallic y Gaffron (1966) encontraron que la luz azul de baja intensidad estimulaba el consumo de oxígeno en mutantes de *Chlorella* que carecían de clorofila. Posteriormente, Ogasawara y Miyachi (1970) observaron que los niveles intracelulares de sustratos oxidables, principalmente oxalacetato, aumentaban bajo similares condiciones de iluminación interpretando que el aumento del consumo de oxígeno dependiente de luz azul se debía precisamente al incremento de los niveles intracelulares de estos sustratos oxidables.

Este estímulo de la actividad respiratoria, posiblemente contribuya a aumentar los niveles celulares de ATP a expensas de poder reductor. Si la acción de la luz azul sobre la asimilación del nitrato fuese indirecta, es decir, consecuencia de una alteración de los niveles de ATP y poder reductor, tanto el consumo de nitrito, como el de amoniaco deberían verse afectados, puesto que su asimilación es también dependiente, tanto del poder reductor, como de la carga energética celulares. Puesto que en nuestras condiciones, las velocidades de incorporación de nitrito y amonio no se afectan, parece pues que el efecto de la luz se circunscribe a la asimilación del nitrato, bien a nivel de entrada del ión en la célula, bien a nivel de su reducción hasta nitrito.

V. CONCLUSIONES

1. La cinética de incorporación de nitrato que muestran células de *Chlorella fusca* creciendo exponencial y fototroficamente, con CO_2 como fuente de carbono, es de tipo lineal y estrictamente dependiente de luz. En estas mismas condiciones, la cinética de incorporación del nitrito tiene tres fases, una primera donde el nitrito se incorpora activamente; a continuación, otra fase en la que la velocidad disminuye y, finalmente, una tercera fase donde la velocidad vuelve a aumentar, haciéndose lineal hasta que todo el nitrito es consumido por las células.
2. El nitrito y el amoníaco, productos intermedios en la asimilación del nitrato, provocan, a bajas concentraciones, una rápida inhibición de la incorporación del nitrato al añadirse a una suspensión celular creciendo en condiciones fototróficas, con CO_2 y nitrato como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La inhibición producida por nitrito o por amoníaco no tiene lugar si estos iones no son asimilados por las células.

3. El arseniato y la metilamina, desacoplantes de la fosforilación fotosintética, producen, al igual que el amonio y el nitrito, una inhibición de la incorporación del nitrato.
4. La inhibición de la incorporación del nitrato producida por bajas concentraciones de amoníaco, que sólo tiene lugar cuando este ión está siendo incorporado en esqueletos carbonados, podría afectar la entrada de nitrato hasta la célula o su posterior reducción. En nuestras condiciones, sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasas, ensayadas *in vitro* al añadir el amonio, lo cual sugiere que la entrada del nitrato en la célula puede ser el proceso que se afecta por la presencia del amoníaco.
5. El efecto inhibitorio del amoníaco sobre la asimilación del nitrito es inmediato cuando su adición se efectúa en la tercera fase, mientras que en la primera este efecto se manifiesta únicamente 30 minutos después de ser añadido el amoníaco. Como en el caso del nitrato, el amonio debe ser asimilado por la célula para que se produzca esta inhibición.

6. La luz azul y la luz roja son incapaces de mostrar velocidades de incorporación de nitrato comparables a las obtenidas con luz blanca en cultivos de células creciendo autotróficamente.
7. La luz azul es notablemente más efectiva que la roja en la incorporación del nitrato a intensidades inferiores a 200 W/m^2 .
8. La acción conjunta de las luces azul y roja produce una velocidad de incorporación de nitrato similar a la que proporciona la luz blanca.
9. La incorporación de nitrito y amoníaco por células creciendo a la luz, con CO_2 como fuente de carbono, es independiente de la cualidad de luz actínica.
10. El efecto de la luz azul y roja en la incorporación fototrófica del nitrato no se ha podido relacionar con variaciones en los niveles celulares de la actividad nitrato reductasa ensayada *in vitro*.

11. El DCMU detiene la incorporación del nitrato en células que crecen en condiciones fototróficas, con CO_2 como fuente de carbono. La adición de glucosa anula este efecto inhibitor producido por el DCMU.
12. La luz azul, pero no la roja, incluso a baja intensidad, muestra un claro efecto estimulador de la incorporación de nitrato en oscuridad dependiente de glucosa y en presencia de DCMU. Dicho efecto estimulador es totalmente independiente del aparato fotosintético.
13. La incorporación en oscuridad del nitrito y del amoníaco, dependiente de glucosa y en presencia de DCMU no se estimula por la luz azul.

VI. BIBLIOGRAFIA

- AHMED, J. y MORRIS, I. (1967) Arch. Microbiol., 56, 219-222.
- APARICIO, P.J. (1971) Tesis Doctoral, Anales de la Universidad Hispalense, Serie Ciencias, n°13.
- APARICIO, P.J., KNAFF, D.B. y MALKIN, R. (1975) Arch. Biochem. Biophys., 169, 102-107.
- APARICIO, P.J., ROLDAN, J.M. y CALERO, F. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 1071-1077.
- ARNON, D.I. (1949) Plant Physiol., 24, 1-15.
- BAILEY, J.L. (1967) En *Techniques in Protein Chemistry*, 2°Ed., p.340, Elsevier, Amsterdam.
- BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. (1969) Ann. Rev. Plant Physiology., 20, 495-522.
- BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. (1972) *Photophysiology*, vol. 7, p.85, editada por A.C. Giiose, Academic Press, New York.
- BJÖRN, G.S. y BJÖRN, L.O. (1976) Physiol. Plant., 36, 277-304.
- BURNS, R.C. y HARDY, R.W.F. (1975) En *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*, editada por A. Kleinzeller, G.F. Springer y H.G. Wittman, Springer Verlag, New York, p. 47.

- BUTZ, R.G. y JACKSON, W.A. (1977) *Phytochem.*, 16, 409-417.
- CANDAU, P. (1978) Tesis Doctoral en preparación.
- CANDAU, P., MANZANO, C. y LOSADA, M. (1976) *Nature*, 262, 715-717.
- CAWSE, P.A. (1967) *Analyst*, 92, 311-315.
- CHANTAROTWONG, W., MUFFAKER, R.C., MILLER, B.L. y GRANSTEDT, R.C. (1976) *Plant Physiol.*, 57, 519-522.
- CHAPARRO, A., MALDONADO, J.M., DIEZ, J., RELIMPIO, A.M. y LOSADA, M. (1976) *Plant Sci. Letters*, 6, 335-342.
- CHIBA, S. e ISHIMOTO, M. (1973) *J. Biochem.*, 73, 1315-1318.
- DIEZ, J. (1978) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- DIEZ, J., CHAPARRO, A., VEGA, J.M. y RELIMPIO, A.M. (1977) *Planta*, 137, 231-234.
- DOMANSKI-KADEN, J. y SIMONIS, W. (1972) *Arch. Mikrobiol.*, 87, 11-28.
- EISELE, R. y ULLRICH, W.R. (1975) *Planta*, 123, 117-123.
- EISELE, R. y ULLRICH, W.R. (1977) *Plant Physiol.*, 59, 18-21.

- ERLANGER, B.F. (1978) 6th Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Resúmenes, p. 95.
- FLORENCIO, J. (1978) Tesina de Licenciatura, Universidad de Sevilla.
- FLORES, E., GUERRERO, M.G. y LOSADA, M. (1978a) XVII Reunión de la S.E.B., Resúmenes, p. 108.
- FLORES, E., MANZANO, C., CANDAU, P. y GUERRERO, M.G. (1978b) III Reunión S.E.F.V., Resúmenes, n°66.
- FOWDEN, L. (1967) Ann. Rev. Plant Physiol., 18, 85-106.
- GUERRERO, M.G. y GUTIERREZ, M. (1977) Biochim. Biophys. Acta, 482, 271-285.
- GUERRERO, M.G. y VEGA, J.M. (1975) Arch. Microbiol., 102, 91-94.
- HAYSTEAD, A., DHARMAWARDENE, M.W.N. y STEWART, W.D.P. (1973) Plant Sci. Letters, 1, 439-445.
- HEIMER, Y.M. y FILNER, P. (1971) Biochim. Biophys. Acta, 230, 362-372.
- HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003.
- HEWITT, E.J. (1975) Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 73-100.

- HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. y NOTTON, B.A. (1976) En *Plant Biochemistry*, 3^a Ed., p. 663, editado por J. Bonner y J.E. Varner, Academic Press, New York.
- JONES, R.W. y SHEARD, R.W. (1977) *Plant Sci. Letters*, 8, 305-311.
- KAMIYA, A. y MIYACHI, S. (1974) *Plant Cell Physiol.*, 15, 927-937.
- KESSLER, E. (1955) *Nature*, 176, 1069-1070.
- KNUTSEN, G. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 103, 495-502.
- KOWALLIK, W y GAFFRON, M. (1966) *Planta*, 69, 92-95.
- KUMAGAI, T. y ODA, Y. (1973) *Plant Cell Physiol.*, 14, 1107-1112.
- LAFFERTY, M.A. y GARRET, R.M. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7555-7567.
- LORIMER, G.H., GEWITZ, H., VOLCKER, V., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 6074-6079.
- LOSADA, M. (1974) En *Metabolic Interconversion of Enzymes*, p.257, editado por E.M. Fischer, E.G. Krebs, H. Neurath y E.R. Stadtman, Springer Verlag, Berlin.

- LOSADA, M. (1975/76) *J. Mol. Catal.*, 1, 245-264.
- LOSADA, M. (1976) En *Reflections on Biochemistry*, p. 73, editado por B.L. Horecker, L. Cornudella y J. Oró, Pergamon Press, Oxford.
- LOSADA, M. (1977) *Investigación y Ciencia*, 7, 6-18.
- LOSADA, M. y GUERRERO, M.G. (1978) En *Topics in Photosynthesis*, vol. 3., editado por J. Barber, Elsevier, Amsterdam.
- LOSADA, M. y PANEQUE, A. (1971) En *Methods in Enzymology*, vol. 23, editado por A. San Pietro, Academic Press, New York, p. 487.
- LOSADA, M., APARICIO, P.J. y PANEQUE, A. (1969) En *Progress in Photosynthesis Research*, vol. III, p.1504, editado por H. Metzner, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen.
- LOSADA, M., PANEQUE, A., APARICIO, P.J., VEGA, J.M., CARDENAS, J. y HERRERA, J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1009-1015.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MALDONADO, J.M., PUEYO, C. y CHAPARRO, A. (1974) *Rev. Real Acad. Cien. Madrid*, 68, 633-642.

- MANZANO, C., CANDAU, P., GOMEZ-MORENO, C., RELIMPIO, A.M.
y LOSADA, M. (1976) *Molec. Cell. Biochem.*, 10,
161-169.
- MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1976) *Phytochemistry*, 15, 873-885.
- MIFLIN, B.J. y LEA, P.J. (1977) *Ann. Rev. Plant Physiol.*,
28, 299-329.
- MINOTTI, P.L., WILLIAMS, D.C. y JACKSON, W.A. (1969) *Planta*,
86, 267-271.
- MOHANTY, B. y FLETCHER, I.S. (1976) *Plant Physiol.*, 58,
152-155.
- MUÑOZ, V. y BUTLER, W. (1975) *Plant Physiol.*, 55, 421-426.
- NOTTON, B.A., FIDO, R.M. y HEWITT, E.J. (1977) *Plant Sci.*
Letters, 8, 165-170.
- OGASAWARA, N. y MIYACHI, S. (1969) *En Progress in Photosyn-*
thesis, vol. 3, p.1653, editado por H. Metzner,
Verlag C. Lichtenstein, Munich.
- OGASAWARA, N. y MIYACHI, S. (1970) *Plant Cell Physiol.*, 11,
1-14.
- OHMORI, M., OHMORI, K. y STROTMANN, H. (1977) *Arch. Mikro-*
biol., 114, 225-229.

- OREBAMJO, T.O. y STEWART, G.R. (1975) *Planta*, 122, 27-36.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F. y CARDENAS, J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 885-891.
- ORTEGA, T., CASTILLO, F., CARDENAS, J. y LOSADA, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 823-831.
- PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 202-204.
- PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CATALINA, L. y LOSADA, M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 149-151.
- PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CARDENAS, J., VEGA, J.M. y LOSADA, M. (1969) *FEBS Letters*, 3, 57-59.
- PEARSON, C.J. y STEER, B.T. (1977) *Planta*, 137, 107-112.
- PISTORIUS, E.K., FUNKHOUSER, E.A. y VOSS, M. (1978) *Planta*, 141, 279-282.
- PISTORIUS, E.K., GEWITZ, H.S., VOSS, H. y VENNESLAND, B. (1976) *Planta*, 128, 73-80.
- POFF, K. y BUTLER, W.L. (1975) *Plant Physiol.*, 55, 427-429.
- PRATT, L.H. (1978) *Photochem. Photobiol.*, 27, 81-105.
- PRESTI, D. y DELBRUCK, M. (1978) *Plant, Cell & Environment*, 1, 81-100.

- PRESTI, D., HSO, W.Jr. y DELBRUCK, M. (1978) Photochem. Photobiol., 26, 403-405.
- RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 118, 58-71.
- RAO, K.P. y RAINS, D.W. (1976a) Plant Physiol., 57, 55-58.
- RAO, K.P. y RAINS, D.W. (1976b) Plant Physiol., 57, 59-62.
- RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1973) Plant Sci. Letters, 1, 105-113.
- ROLDAN, J.M., CALERO, F. y APARICIO, P.J. (1978) Z. Pflanzenphysiol., en prensa.
- SARGENT, M. y BRIGGS, W.R. (1967) Plant Physiol., 42, 1504-1510.
- SCHLOEMER, R.H. y GARRETT, R.H. (1974a) J. Bacteriol., 118, 259-269.
- SCHLOEMER, R.H. y GARRETT, R.H. (1974b) J. Bacteriol., 118, 270-274.
- SCHOPFER, P. (1977) Annu. Rev. Plant. Physiol., 28, 223-252.
- SCHURMAN, P., WOLOSUIK, R.A., BREAZEALE, V.B. y BUCHANAN, B.B. (1976) Nature, 263, 257-258.

- SNELL, E.D. y SNELL, C.T. (1949) En *Colorimetric Methods of Analysis*, p.840, D. Van Nostrand Company, New York.
- SOLOMONSON, L.P., LORIMER, G.H., HALL, R.L., BORCHERS, R. y BAILEY, J.L. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 4120-4127.
- SOLORZANO, L. (1969) *Limnol. Oceanogr.*, 14, 799-801.
- STEMLER, A. y GOVINDJEE, (1973) *Plant Physiol.*, 52, 119-123.
- STROTMANN, H. (1967) *Planta*, 73, 376-380.
- SYRETT, P.J. y LEFTLEY, J.W. (1976) En *Perspectives in Experimental Biology*, vol. 2, p.221, editado por N. Sunderland, Pergamon Press, Oxford.
- SYRETT, P.J. y MORRIS, J. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 566-575.
- THACKER, A. y SYRETT, P.J. (1972) *New Phytol.*, 71, 423-433.
- ULLRICH, W.R. (1974) *Planta*, 116, 143-152.
- ULLRICH, W.R. (1978) 1st Meeting of the Federation of European Societies of Plant Physiology, Resúmenes.
- ULLRICH-EBERIUS, C.I. (1973) *Planta*, 115, 25-36.

- VAN DER VELDE, H.H. y HEMRIKA-WAGNER, A.M. (1977) *Plant Sci. Letters*, 11, 145-149.
- VEGA, J.M. (1976) *Arch. Microbiol.*, 109, 237-242.
- VEGA, J.M. y KAMIN, H. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 896-909.
- VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1973) *Biochem. J.*, 133, 701-708.
- VEGA, J.M., CARDENAS, J. y LOSADA, M. (1978) En *Methods in Enzymology*, en prensa.
- VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1971) *Plant Physiol.*, 48, 294-299.
- VENNESLAND, B. y GUERRERO, M.G. (1978) En *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6, editado por M. Gibbs y E. Latzko, Springer Verlag, Berlin, en prensa.
- VOSKRESENSKAYA, N.P. (1972) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 219-234.
- WARBURG, O. y NEGELEIN, E. (1920) *Biochem. Z.*, 110, 66-115.
- WOLOSIUK, R.A., BUCHANAN, B.B. y CRAWFORD, N.A. (1977) *FEBS Letters*, 81, 253-258.

YATES, M.G. (1976) TIBS, 1, 17-20.

ZALOKAR, M. (1955) Arch. Biochem., 56, 318-325.

ZUMFT, W.G. (1976) Naturwissenschaften, 63, 457-464.

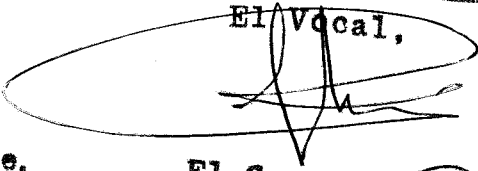
el Tribunal integrado por los señores
de la fecha, para juzgar la tesis
Fernando Palero Sanjafo
"Estudio a nivel celular de la actividad
del citrat en el hongo Papil. aspidospori del
anuncio y de la luz azul"
y otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum laude

Sevilla, 20 de DICIEMBRE 78

El Vocal,



El Vocal,



J. F. López Sá

Presidente,



El Secretario,

