

Laboratorio de Bioquímica (Cátedra de Química Orgánica)
Facultad de Ciencias
Universidad de Murcia

Fosforilación acoplada a nitrito y nitrato reductasa en *Micrococcus denitrificans* (*)

por
F. Sabater

(Recibido para publicar el 30 diciembre 1965)

KLUYVER y VERHOEVEN (5) demostraron que el microorganismo *Micrococcus denitrificans* es capaz de crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato. FEWSON y NICHOLAS (3) propusieron un mecanismo de transporte de electrones desde NAD hasta nitrato similar al hallado por los mismos autores (2) en *Pseudomonas aeruginosa*. En este último organismo YAMANAKA y col. (7) hallaron que durante la respiración del nitrato se producía fosforilación. Posteriormente esta fosforilación acoplada a la reducción de nitrato ha sido hallada por varios autores en otros organismos y WHATLEY (6) lo hizo para el caso de *M. denitrificans*, en el cual encontró que también la reducción de nitrito va acompañada de fosforilación, aunque con un cociente P/nitrito muy bajo.

En el presente trabajo se estudia la fosforilación que acompaña a la reducción de nitrito comparada con la correspondiente a nitrato y se establecen relaciones entre actividad reductasa y

fosforilación a través de la acción del ADP y del fosfato inorgánico.

Material y métodos

El organismo *Micrococcus denitrificans* se cultiva en condiciones anaeróbicas en un medio con la siguiente composición en g/l: nitrato potásico, 10; glucosa, 10; peptona, 10; fosfato dipotásico, 1; sulfato magnésico heptahidrato, 0,5; cloruro férrico, 0,003. Se separan las células por centrifugación a $3.000 \times g$ durante 15 minutos y se lavan con solución fisiológica de ClNa hasta que el sobrenadante no da reacción de nitritos. Se suspenden en tampón Tris 0,05 M de pH 7,5 y se someten durante 10 minutos a la acción de ultrasonidos en aparato Mullard (20 kc/seg) a 4° C. Eventual-

(*) Este trabajo se realizó en parte en la Estación de Investigación de Long Ashton de la Universidad de Bristol (Inglaterra).

mente se realizó la desintegración por trituración con alúmina en mortero con buenos resultados. La suspensión se centrifuga 30 minutos a $20.000 \times g$ y el sobrenadante se usa como extracto libre de células.

La actividad nitrato reductasa se mide por valoración del nitrito formado, por el procedimiento de FEWSON y NICHOLAS (4). La actividad nitrito reductasa se sigue por desaparición del nitrito, el cual se valora según el mismo método que en el caso de nitrato reductasa. La presencia de ambas reductasas no interfiere en la medida de nitrato reductasa, pues para ésta se usa un extracto diluido cinco veces, con lo que la capacidad para reducir nitrito se hace despreciable.

Simultáneamente al estudio de las actividades reductasa se hacen ensayos con el mismo medio de reacción, pero en el que el fosfato está marcado con P^{32} a fin de estudiar la fosforilación; para seguir ésta, una vez detenida la reacción por adición de ácido tricloroacético hasta una concentración final de 4 %, se centrifuga y de 1 ml de sobrenadante se extrae el fosfato inorgánico no incorporado según AVRON (1) y se mide la radiactividad en el residuo no extraído.

Excepto cuando se especifiquen otras condiciones, el medio de reacción tiene la siguiente composición: tampón Tris de pH 7,5, 50 μ moles (de Tris); nitrito o nitrato sódico, 2 μ moles; fosfato dipotásico, 2 μ moles; para estudios de fosforilación este fosfato lleva P^{32} en cantidad suficiente para dar 5 cuentas por segundo (fondo de 0,2 c/s) por cada 0,1 μ mol de fosfato; NADH, 1 μ mol; ADP variable desde 0,01 a 0,3 μ moles; glucosa, 10 μ moles; hexokinasa (Sigma Chem. Co.), 10 μ gramos; extracto, 0,1 ml; volumen total, 1,5 ml.

Las reacciones se realizan en tubo Thumberg a fin de evitar, en lo posible, otros tipos de fosforilación. Tiempo de reacción: 30 min; temperatura: 30° C.

Resultados y discusión

Fosforilación en la reducción de nitrito

Se hicieron los ensayos en presencia y ausencia de nitrito y en ambos casos se observó incorporación de fosfato a la materia orgánica. La observada en ausencia de nitrito puede ser verdadera fosforilación (acción de polinucleótido fosforilasa o triosa fosfato deshidrogenasa, puesto que existe NAD en el medio) o a reacciones de intercambio del tipo Fosfato 32 + ATP \rightleftharpoons Fosfato + ATP 32 .

En cualquier caso la concentración de ADP afecta de diferente forma, según haya o no nitrito en el medio. En la fig. 1

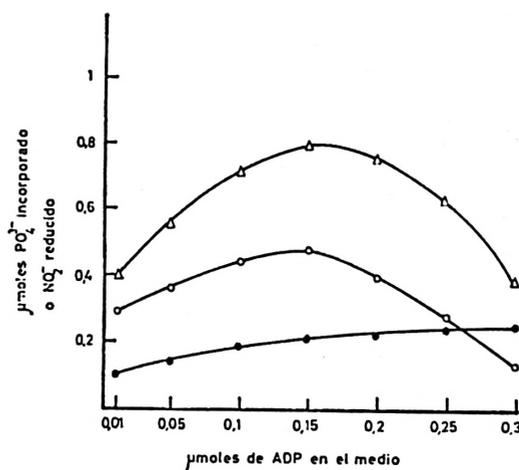


FIG. 1. Nitrito reductasa y fosforilación con cantidades variables de ADP y 2 μ moles de fosfato.

- Δ Nitrito reducido durante la reacción.
- \circ Fosfato incorporado durante la reacción.
- \bullet Fosfato incorporado en ausencia de nitrito.

puede apreciarse un efecto inhibitorio por grandes concentraciones de ADP (mayores de 0,15 μ moles en 1,5 ml) sobre la fosforilación debida a nitrito reductasa, efecto que no se produce en ausencia de nitrito.

El que la actividad nitrito reductasa se inhiba por exceso de ADP de la mis-

ma forma que la fosforilación a ella acoplada puede significar a) que una alta concentración de ADP inhiba primariamente la acción reductasa y, como consecuencia, la fosforilación acoplada a dicha acción se verá también inhibida; b) que el ADP inhiba primariamente a la fosforilación y que la actividad nitrito reductasa resulte paralelamente inhibida, para lo cual reductasa y fosforilación han de estar íntimamente acopladas. Parece ser correcta la segunda interpretación en vista de los resultados obtenidos con nitrato en lugar de nitrito.

Fosforilación en la reducción de nitrato

La fig. 2 representa la actividad nitrato reductasa y la correspondiente fosforilación en función de la concentración de ADP. Se observa que altas concentra-

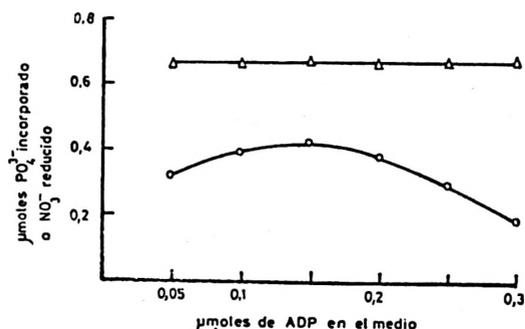


FIG. 2. Nitrato reductasa y fosforilación con cantidades variables de ADP y 2 μmoles de fosfato.

○ Fosfato incorporado durante la reacción.
 Δ Nitrato reducido durante la reacción.

ciones del último inhiben la fosforilación, pero no afectan a la reducción de nitrato, de donde se deduce que el ADP inhibe primariamente la fosforilación acoplada a la acción de nitrato o nitrito reductasa, pero mientras que en el caso del nitrito la actividad reductasa y la fosforilación están íntimamente acopladas, el enzima nitrato reductasa puede actuar independientemente del proceso de fosforilación.

Dependencia entre ADP y fosfato

La acción inhibitora de altas concentraciones de ADP desaparece al elevar la concentración de fosfato en el medio. La fig. 3 representa los resultados de en-

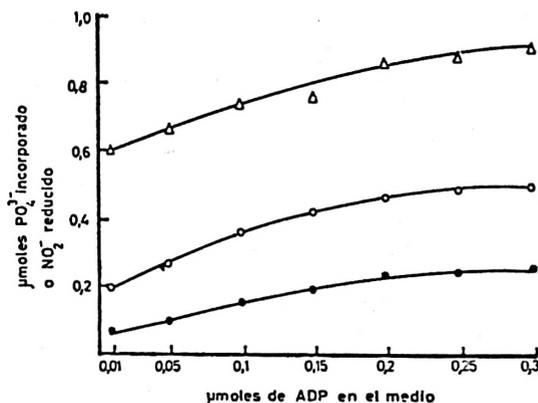


FIG. 3. Nitrito reductasa y fosforilación con cantidades variables de ADP y 10 μmoles de fosfato.

Δ Nitrito reducido durante la reacción.
 ○ Fosfato incorporado durante la reacción.
 ● Fosfato incorporado en ausencia de nitrito.

sayos realizados en las mismas condiciones que los correspondientes a la fig. 1, con la única diferencia de que en el medio de reacción hay 10 en lugar de 2 μmoles de fosfato. De nuevo la acción reductasa es paralela a la fosforilación acoplada a ella.

A fin de aclarar si la interrelación ADP-fosfato pueden interpretarse en términos de un simple equilibrio, se realizaron ensayos, cuyos resultados se representan gráficamente en la fig. 4. En dichos ensayos se estudia a lo largo del tiempo la fosforilación que tiene lugar con concentración elevada de ADP (0,3 μmoles por 1,5 ml) y cantidades diferentes de fosfato. Cuando ésta es alta (10 μmoles por 1,5 ml) la fosforilación en presencia de nitrito es mayor que en su ausencia, lo que se corresponde con los últimos valores de la derecha de la figura 3. Cuando la cantidad de fosfato es

baja (2 μ moles en 1,5 ml) la fosforilación en presencia de nitrito se hace aún menor que en su ausencia, lo que concuerda con los últimos valores de la derecha de la fig. 1. Al cabo de 10 minutos de reacción, a los medios que contienen 2 μ moles de fosfato por 1,5 ml se añade la cantidad calculada de solución 0,5 M de

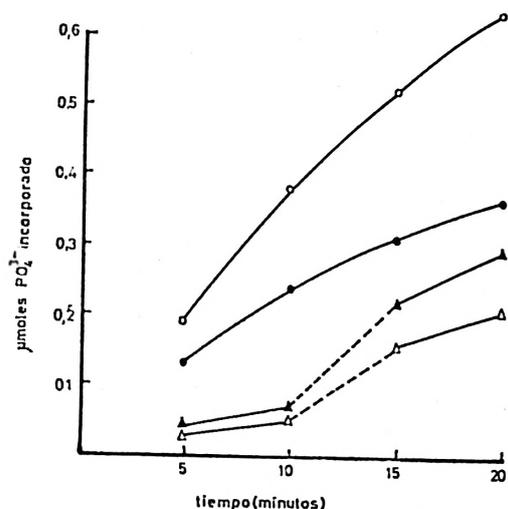


FIG. 4. Ensayo de reversibilidad de la interacción ADP-fosfato. Excepto en lo que se especifica, la concentración de los reactivos es igual que en los demás ensayos, pero el medio de reacción tiene un volumen 5 veces mayor y se toman muestras de 1,5 ml cada 5 minutos.

- Fosforilación con 0,3 μ moles de ADP y 10 μ moles de fosfato por cada 1,5 ml en presencia de nitrito.
- Como el anterior, pero en ausencia de nitrito.
- △ Fosforilación con 0,3 μ moles de ADP y 2 μ moles de fosfato por cada 1,5 ml en presencia de nitrito; a los 10 minutos se sube la concentración de fosfato a 10 μ moles por cada 1,5 ml sin variación sensible de volumen.
- ▲ Como el anterior, pero en ausencia de nitrito.

fosfato, tal que sin variar sensiblemente el volumen de reacción (un 1 %) su concentración pase a 10 μ moles por cada 1,5 ml, o sea, en condiciones en que el

fosfato debería anular el efecto inhibitor del ADP, según la fig. 3, pero resulta que el ADP sigue inhibiendo, pues, aunque las fosforilaciones netas sufren un brusco incremento (debido a la mayor concentración de fosfato), aún sigue siendo menor en presencia que en ausencia de nitrito.

Resulta, pues, que la acción inhibitor del ADP no es reversible y que para evitarla con altas concentraciones de fosfato, éste ha de estar presente en el medio desde el principio, lo que hace pensar que el verdadero inhibitor no sea el ADP, sino alguna sustancia cuya formación depende del ADP en exceso (con menos de 0,15 μ moles no se observa inhibición), en cuyo caso una gran cantidad de fosfato hace que más ADP esté implicado en la fosforilación y menos en la formación del inhibitor.

Resumen

En *M. denitrificans* altas concentraciones de ADP inhiben nitrito, pero no nitrato reductasa y también la fosforilación acoplada a ambos enzimas, pero un exceso de fosfato evita la inhibición. Se deduce que nitrito reductasa actúa íntimamente acoplada a la fosforilación, mientras que nitrato reductasa no lo está.

Summary

Phosphorylation coupled with nitrite and nitrate reductase in *Micrococcus denitrificans*.

During the enzymic reduction of nitrite or nitrate in cell free extracts from anaerobically grown *M. denitrificans*, phosphorylation takes place, as judged by the incorporation of P^{32} into the organic fraction. Large amounts of ADP inhibit both phosphorylations as well as nitrite (but not nitrate) reductase; it follows that nitrite reductase acts tightly coupled to phosphorylation. The inhibi-

tory action of ADP disappears by increasing the concentration of phosphate and this effect cannot be explained in terms of a single equilibrium.

Bibliografía

- (1) AVRON, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 257, 1960.
- (2) FEWSON, C. A. and NICHOLAS, D. J. D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 3 P., 1960.
- (3) FEWSON, C. A. and NICHOLAS, D. J. D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 208, 1961.
- (4) FEWSON, C. A. and NICHOLAS, D. J. D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 335, 1961.
- (5) KLUYVER, A. J. and VERHOEVEN, W. : *Leeuwenhoek Ned. Tijdschr.*, **20**, 357, 1954.
- (6) WHATLEY, F. R. : *Plant Physiol. Proc. Ann. Meetings*, **37**, VII, 1962.
- (7) YAMANAKA, T., OYA, A. and OKUNUKO, K. : *J. Biochem.*, **51**, 253, 1962.

