

Tesina Final de Máster

Ensayo cinético de la Nitrato Reductasa en *Ulva rotundata* Bliding

Máster en Gestión Costera. U.L.P.G.C.

Alumno: Francisco Javier Medina Aguilar

Fecha: Diciembre de 2016

Tutor 1: María Ascensión Viera Rodríguez

Tutor 2: Ricardo Haroun Tabraue

Índice

1	Resumen.....	3
2	Introducción	3
2.1	Caracterización y funcionamiento de la Nitrato Reductasa (NR).....	4
2.2	Determinación de la Nitrato reductasa mediante ensayos “ <i>in vivo</i> ”	6
2.3	Determinación de la Nitrato Reductasa mediante ensayos “ <i>in vitro</i> ”	8
2.4	Ensayos cinéticos para la Nitrato Reductasa.....	10
2.5	Objetivos	11
3	Material y métodos	11
3.1	Consideraciones previas.....	11
3.2	Actividad NR	12
3.3	Coeficiente de extinción.....	13
3.4	Determinación de las constantes cinéticas	14
3.5	Ensayos sobre la influencia a corto plazo, de la luz y la concentración de nitrato, en la actividad enzimática.....	14
3.6	Ensayos sobre la influencia a largo plazo de la concentración de nitrato	14
3.7	Medidas de la actividad enzimática mensual.	15
4	Resultados	15
4.1	Constantes cinéticas.....	15
4.2	Ensayos sobre la influencia a corto plazo, de la luz y la concentración de nitrato, en la actividad enzimática.....	16
4.3	Ensayos sobre la influencia a largo plazo de la concentración de nitrato	17
4.4	Medidas de la actividad enzimática mensual.	18
4.5	Actividad enzimática vs biomasa homogeneizada.....	18
4.6	Conversión y comparación de los resultados.....	19
5	Discusión	20
6	Conclusiones.....	30
7	Bibliografía	31

1 Resumen

Estudio de viabilidad para la aplicación de una metodología “*in vitro*” en el análisis cinético de la Nitrato Reductasa (NR) a través de la oxidación de NADH durante el periodo de incubación, aplicando y modificando los protocolos propuestos por Hurd et al. (1995) y Lomas y Gilbert (2000) en *Ulva rotundata* Bliding. Se recoge en el presente documento una descripción detallada de los procedimientos seguidos y la problemática asociada a la técnica, a través de la realización de ensayos a corto y largo plazo, en algas recolectadas en la localidad de San Cristóbal, Gran Canaria, Islas Canarias, España. La aplicación de la metodología pone de relieve, la complejidad de la NR y su dependencia frente a factores internos y externos, tales como la concentración de determinados compuestos en el medio y los protocolos seguidos durante la extracción de la misma. Paralelamente se demuestra la existencia de “pools” internos de nitrato, nitrito y amonio en el interior de la célula.

2 Introducción

Las algas juegan un papel fundamental en la producción primaria y en la asimilación de los nutrientes inorgánicos tanto en profundidades oceánicas como en los estuarios y zonas costeras del planeta, siendo éstas las principales encargadas de la asimilación y síntesis de gran parte de los compuestos nitrogenados, que se encuentran en las aguas (Duarte, 1995).

El comportamiento de las grandes masas de microalgas, que colonizan los espacios oceánicos repletos de nutrientes (Upwelling), en relación a la temperatura del medio, las concentraciones de estos compuestos nitrogenados y los ciclos de luz y oscuridad, así como, su influencia en los procesos bioquímicos oceánicos, es un proceso ampliamente descrito (Eppley et al., 1969; Packard et al., 1971; Packard and Blasco, 1974). Del mismo modo, el rol de las algas en los procesos medioambientales, relativos al nitrógeno, de las zonas costeras ha sido analizado. Es conocido que en zonas costeras con alta influencia antrópica existe una relación directa entre la concentración de compuestos nitrogenados y los valores de biomasa algal del tipo oportunista como las especies de *Ulva*. (Thompson and Valiela, 1999; Corzo and Niell, 1991; Chow et al., 2012). La rápida ocupación de los espacios costeros, por este tipo de organismos, desvela una poderosa habilidad para incorporar y asimilar nutrientes que, en algunos casos deriva en problemas de sobrepoblación, que desencadenan desequilibrios en los hábitats costeros incluyendo, eutrofización, desplazamientos de especies autóctonas, eliminación del oxígeno en la zona y cambios en la cadena trófica (Bricker et al., 2003)

Esta función de “limpieza de nutrientes”, que presenta tanto el fitoplancton oceánico como las micro y macroalgas de los sistemas costeros, ha sido empleada en procesos de depuración de aguas con alto contenido en nutrientes y en cultivos multitrofos; el agua cargada de compuestos inorgánicos es aprovechada y depurada por poblaciones controladas de algas y reincorporada nuevamente al medio o al sistema (Christianson et al., 2015).

Por otra parte, el desarrollo y la inversión en la industria alimenticia, cosmética, agrícola y energética, entre otras, ha posibilitado e incorporado la aplicación de multitud de tipos de algas en los productos de uso diario.

Así, tenemos los fertilizantes agrícolas fabricados a partir de biomasa cargada de nutrientes nitrogenados, útiles para plantas superiores. Los combustibles biológicos fabricados a partir del metano liberado durante la descomposición, en presencia de oxígeno, de grandes cantidades de algas. Los polisacáridos usados en la alimentación como gelificantes y los componentes usados en la industria farmacéutica, requieren de grandes cantidades de biomasa que deben ser cultivadas en condiciones óptimas.

El hilo conductor que, de algún modo, define y regula la forma en la que se presentan los procesos o problemáticas descritas y que permitiría optimizar y regular por un lado las formas de cultivo y por otro, el comportamiento y equilibrio del sistema costero, es el ciclo del nitrógeno a nivel celular. Este incluye su asimilación en forma de compuestos nitrogenados, su transformación en compuestos fácilmente asimilables por las células vegetales y su incorporación final al talo.

Por lo descrito, se concluye de vital importancia el conocimiento del funcionamiento enzimático relativo al nitrógeno. En particular, todos los procesos que atañen a la transformación del nitrato en nitrito a través de la enzima NR, para su posterior reducción a amonio usando la Nitrito Reductasa (NiR).

2.1 Caracterización y funcionamiento de la Nitrato Reductasa (NR)

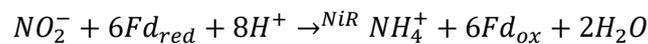
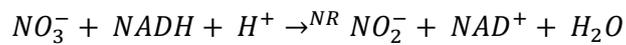
El nitrógeno es un elemento indispensable para las plantas superiores, micro y macroalgas, siendo requerido en grandes cantidades por su participación en innumerables procesos intracelulares que dan lugar a la formación de aminoácidos, enzimas, complejos enzimáticos, proteínas, ácidos nucleicos y una gran variedad de macromoléculas que contienen N y que son esenciales para la vida vegetal. El nitrógeno disponible para la mayoría de los organismos del medio marino se encuentra en forma de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN), incluyendo los iones amonio, nitrato y nitrito.

En las zonas costeras y procedente de la contaminación o de los fenómenos de upwelling el nitrato es el ión predominante, representando un 3.5% del volumen total de agua (Chow et al., 2012). Este ión, de gran ratio de absorción, juega un papel fundamental como elemento regulador de los procesos de crecimiento, morfología, reproducción y composición bioquímica de las macroalgas. Esta capacidad de absorción y almacenamiento de nitrato, cuando éste se encuentra presente en el medio, y la habilidad para usarlo cuando las condiciones ambientales se vuelven restrictivas, aporta a las especies oportunistas como *Ulva rotundata* una ventaja ecológica frente a otros organismos, prolongando su permanencia durante los periodos de estrés del hábitat.

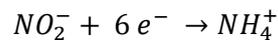
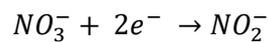
Las macroalgas pueden obtener el nitrógeno necesario, para su funcionamiento, a partir de diferentes formas iónicas, siendo el amonio y el nitrito elementos energéticamente menos costosos de incorporar, tanto a los talos de las algas, como a los tejidos celulares de plantas superiores. La consideración de que el nitrato es relativamente abundante en las aguas costeras y la toxicidad que supone, para los organismos vegetales, elevadas concentraciones de iones nitritos y amonio, en el interior de la célula, hacen que se establezca que, el ión nitrato es el elemento clave que regula la ruta metabólica del nitrógeno tanto en las macroalgas, como en plantas superiores (Hanisak and Lapointe, 1985).

La ruta metabólica del nitrógeno se inicia a partir de la incorporación de NO_3^- al interior de la célula, donde la capacidad de sintetizar y asimilar los compuestos nitrogenados depende de forma directa de dos enzimas, la NR (encargada de la transformación del nitrato en nitrito) y la nitrito reductasa (que reduce el nitrito a amonio). El nitrato es captado del agua y translocado a través de la membrana celular mediante procesos dependientes energéticamente. El exceso de nitrato se almacena en el interior de las vacuolas, mientras, una fracción del mismo es metabolizado en el citoplasma, reduciéndose a nitrito por la acción de la enzima NR con el NAD(P)H como elemento donante de electrones. El nitrito formado se traslada al cloroplasto y se reduce a amonio, para su asimilación en compuestos orgánicos, con la ferredoxina como fuente de electrones.

Todo el proceso requiere un tránsito total de 8 electrones (NR + NiR) que deben ser cedidos por algún agente reductor para verificar las siguientes relaciones estequiométricas:



Donde el nitrato es reducido a nitrito, mediante la enzima NR, usando dos electrones en el proceso. El nitrito se reduce a amonio mediante la transferencia de 6 e^- :



Como se ha indicado, tanto los iones nitrito como los iones amonio, sintetizados durante el proceso descrito, no pueden ser acumulados en el interior de las células ya que ambos son citotóxicos, su exceso provoca daños por oxidación y cambios en el pH del interior celular. Por tanto su incorporación a los compuestos orgánicos nitrogenados debe ser lo más rápida posible siendo, en algunos casos, su concentración, el factor determinante para la inhibición de la enzima (Solomonson and Barber, 1990). La asimilación del amonio tiene lugar en el interior de los cloroplastos a través de la acción de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamina 2-oxoglutaratoaminotransferasa (GOGAT).

A diferencia de lo que pueda parecer *a priori*, la NR es una enzima bastante compleja, que presenta una elevada velocidad de síntesis y una alta tasa de degradación (Ruiz Lozano and Azcón, 1996). Esta síntesis y degradación está directamente relacionada con las condiciones ambientales en las que se desarrolla la macroalga, entre ellas figuran:

- Dependencia de los procesos respiratorios y fotosintéticos. Dada la toxicidad de los iones amonio y nitrito, la falta de energía en los pasos posteriores a la metabolización del amonio provoca un aumento de las concentraciones de los citados iones en el interior de la célula. Los mecanismos de defensa celulares impiden la síntesis de más amonio o nitrito, al ser éstos tóxicos en grandes concentraciones, y se paraliza el resto de procesos de la ruta metabólica del nitrógeno.
- Presencia de Nitratos en el medio. A mayor cantidad de nitratos mayor actividad de la NR, existiendo una concentración límite, a partir de la cual la actividad enzimática se ve inhibida (Thompson and Valiela, 1999; Hurd et al. 2014).

- Presencia de Amonio. Debido a la facilidad de las células para usar el nitrógeno en una forma más reducida (amonio) y al costo energético que implica reducir el nitrato a amonio, la enzima NR se inhibe con el fin de optimizar los procesos internos y ahorrar energía (Solomonson and Barber, 1990).
- Incidencia de la radiación ultravioleta. Altos valores de incidencia de luz ultravioleta causan la desactivación de la enzima (Cabello-Pasini et al., 2010).
- Influencia del pH del medio (Corzo and Niell, 1991). Variaciones en el pH causan variaciones en los valores de actividad. Estas variaciones de pH pueden ser ocasionadas en el medio por la incorporación de aguas procedentes de la acción antrópica.
- Ciclos de luz y oscuridad (Packard et al. 1971) La enzima sigue procesos de síntesis y degradación en función de la presencia o la ausencia de luz respectivamente, activándose cíclicamente durante la noche y el día.

Por lo tanto, la medida y caracterización de esta enzima es un proceso complejo, estudiado por diferentes autores, fundamentalmente en microalgas y en menor medida en macroalgas, haciendo uso, según criterio del autor, de dos metodologías de ensayo ampliamente descritas y aplicadas de manera satisfactoria. Medidas de la actividad de la NR mediante métodos “*in situ*” o “*in vivo*” y medidas de la actividad de la NR mediante métodos “*in vitro*”.

2.2 Determinación de la Nitrato reductasa mediante ensayos “*in vivo*”

Esta metodología de ensayo usada en plantas superiores (Jaworski, 1971; Brunetti, 1976) y posteriormente aplicada en algas y plantas marinas por diferentes autores (Dipierro et al., 1977; Weidner and Kiefer, 1981 ; Davinson and Stewart, 1984 ; Brinkhuis et al., 1989), ha sido corregida y optimizada para su aplicación en especies *Ulva*. (Corzo and Niell, 1991; Lartigue and Sherman, 2002)

Los ensayos “*in vivo*” surgen de la necesidad de aproximar en la medida de lo posible los ensayos de laboratorio a la realidad. Fragmentos de los talos se introducen en un medio de incubación que permite la transferencia de los elementos del medio de ensayo hacia el interior de las células vivas y viceversa. Durante un intervalo de tiempo determinado, y en fase de oscuridad, el tejido vegetal realiza su actividad bajo condiciones controladas. Pasado este periodo de incubación, la reacción se para y se realiza una digestión del tejido junto al medio de ensayo con objeto de liberar el nitrito sintetizado ,procedente del interior de las células, para su posterior análisis mediante métodos cromatográficos o espectrofotogramétricos (Snell and Snell, 1949; García-Robledo et al. 2014). Se obtienen así, las medidas de actividad enzimática en función de la cantidad de nitrito sintetizado durante el periodo de incubación.

Uno de los pilares en el que se basa la aplicación de los ensayos “*in vivo*” es eliminar la inactivación de la enzima por la formación de iones metálicos, compuestos fenólicos y la existencia de proteasas durante el proceso de extracción de la enzima, la cual, se encuentra en el interior de las células que conforman los talos de la macroalga analizada. Esta afirmación se asienta en la principal diferencia existente entre metodologías “*in vivo*” e “*in vitro*”. En las metodologías “*in vitro*” se tritura el material vegetal en el medio de ensayo, provocando que la célula se rompa y libere todo su contenido (Corzo and Niell, 1991), mientras que, la

metodología “*in vitro*” mantiene el talo prácticamente intacto durante el proceso de análisis de actividad NR.

Por otra parte, ha sido ampliamente discutido que este método presenta algunas deficiencias, entre ellas la competencia existente por el agente reductor NADH entre la NR y la reducción del O₂ al final de la cadena respiratoria en condiciones de oscuridad (Canvin and Woo, 1979). Durante la fase oscura, el alga respira consumiendo parte de la energía aportada externamente al proceso, por lo que la formación de nitrito podría verse mermada por este proceso, reduciendo su producción y cantidad en el punto final de análisis.

Otro punto negativo es la falta de control sobre los procesos que verdaderamente ocurren en el interior de la célula. Las técnicas “*in vivo*”, no permiten evaluar de forma fiable la constante media de saturación (K_m) y la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) tanto para el sustrato como para el agente reductor (Hurd et al., 1995).

Desde otro punto de vista, es de destacar que, estos tipos de ensayos requieren de mucho tiempo, ya que requieren de largos procesos de incubación y digestión. A ello se suma la necesidad de aplicar un mayor número de aparatos y métodos de ensayo que incrementan, tanto los costos económicos como el tiempo empleado, sumado a la posibilidad de cometer errores humanos durante la realización de las múltiples etapas de la técnica descrita.

Los materiales y métodos de aplicación más frecuente en las técnicas “*in vitro*” son los optimizados por Corzo and Niell (1991), para *Ulva* spp., modificados por Thompson y Valiela en 1999 y posteriormente por Cabello-Passini et al. (2010), entre otros.

La muestra de entre 0.15 y 0.3 gramos de peso húmedo se introduce cortada en pequeños trozos dentro del tubo de ensayo junto al medio de ensayo (1.5-5ml, según autor y especie).

Para eliminar la competencia por el NADH entre la NR y los procesos respiratorios, se crea una fase anaeróbica que lleve los valores de respiración celular a cero durante el proceso de incubación. Con este fin, tubos de ensayo y muestra, pasan por un proceso de eliminación del oxígeno. Este proceso se lleva a cabo a través de dos técnicas, que no se aplican de forma simultánea. En la primera, el oxígeno es eliminado mediante la inyección de gas nitrógeno antes y después de la introducción de la muestra, mientras que, en la segunda, únicamente, se realiza el vacío después de introducir la muestra en el tubo de ensayo.

En lo que concierne al medio de ensayo, éste requiere de tres componentes básicos; un compuesto encargado de permeabilizar la membrana celular, facilitando el tránsito del nitrato, una fuente de nitrato, normalmente en forma de KNO₃, y un agente reductor.

Con respecto al compuesto encargado de permeabilizar la membrana, algunos autores coinciden en usar alcoholes como el n-propanol, en diferentes concentraciones, o surfactantes como el Tegitol NP-10, el Tritón X-100 ó el Neutronix 600. En el caso de *Ulva* spp., el compuesto permeabilizador de la membrana más aplicado suele ser un alcohol del tipo n-propanol (Thompson and Valiela, 1999; Cabello-Passini et al., 2010) y dentro de ellos el 1-propanol. Esta decisión viene reforzada por la mayor facilidad de trabajo y reducido coste, que

presenta el n-propanol. Lo indicado, sumado a que ha sido comprobado que no existen diferencias significativas entre las medidas de actividad de la NR usando los surfactantes descritos o los compuestos alcohólicos, como el n-propanol, en *Ulva* spp. (Brunetti, 1976; Corzo and Niell, 1991), avala tanto el uso de unos compuestos como de otros.

El agente reductor usado en este tipo de ensayos suele ser la glucosa. El uso de glucosa, en detrimento del uso de NADH o NADPH en el caso de *Ulva* spp., viene motivado por la interferencia que se produce a la hora de determinar colorimétricamente el nitrito formado durante el proceso de incubación en el medio de ensayo (Medina and Nicholas, 1957; Scholl et al, 1974), aunque, modificaciones posteriores, que optimizan la técnica, por un lado, oxidando el NADH restante al final del ensayo, y por otro, midiendo espectrofotogramétricamente el nitrito formado de manera continua en el medio de ensayo, parecen haber eliminado esta interferencia y potenciado el uso del NADH como agente reductor (Parson et al., 1984; Ale et al., 2011). Sin embargo, hay que destacar que, el uso de la glucosa como agente reductor ha cosechado lecturas de actividad hasta un 17% mayores que, en los casos donde se ha usado NADH como agente reductor en el medio de incubación (Corzo and Niell, 1991).

Una vez introducido el alga junto al medio de ensayo en el interior de los tubos y conseguida la fase anaeróbica, comienza la fase de incubación, donde la muestra se conserva en oscuridad durante aproximadamente una hora, entre 25-30 °C. Transcurrido este periodo de tiempo, la reacción se para mediante la adición de determinados compuestos que desnaturalizan la enzima y liberan el nitrito formado, determinándose colorimétricamente o espectrofotogramétricamente la cantidad de nitrito formado durante el tiempo de incubación, existiendo numerosas técnicas para este fin. De forma habitual, la determinación del nitrito suele ser tras una digestión ácida del tejido vegetal desarrollada por Snell and Snell (1949) y posteriormente modificada y optimizada por Hochman et al. (1986) y Parson et al. (1984).

Tras el procesado de datos y el análisis estadístico los valores de actividad se suelen expresar en moles de nitrito formados por minuto y gramo de peso húmedo.

2.3 Determinación de la Nitrato Reductasa mediante ensayos “*in vitro*”

A pesar de que la metodología “*in vivo*” ha sido la más empleada para la determinación de la NR, paralelamente, se han optimizado otras técnicas de tipo “*in vitro*”, donde, a pesar de que se ha observado la inactivación de la enzima, durante su proceso de extracción, debida a; la pérdida de cofactores claves para el funcionamiento de la misma (Solomonson and Venesland, 1972), la existencia de compuestos fenólicos (Thomas and Harrison, 1988) y la presencia de proteasas endógenas (Hurd et al., 1995), se consigue un proceso más rápido y fiable. Este método reduce los tiempos de incubación y asegura que el agente reductor y el nitrato lleguen de una forma más directa a la enzima, alcanzándose, a través de los procesos de triturado y homogeneizado, la rotura de las paredes celulares y la liberación de los componentes internos al medio de ensayo, actuando, el conjunto, como una gran célula.

De forma habitual el talo se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se tritura junto a un tampón de extracción que aísla la enzima NR. Posteriormente, y tras un proceso de decantación o centrifugado se extrae el sobrenadante y se hace reaccionar, al igual que en las técnicas “*in vivo*”, con un agente reductor y nitrato, durante un intervalo de tiempo y a una

temperatura controlada. Tras el periodo de incubación estipulado se evalúa la cantidad de nitrato formado como diferencia entre la cantidad de nitrito presente antes del periodo de incubación, y después del mismo. Para ello, se prepara un individuo control que no pasa por el proceso de incubación. De este modo, se obtiene, al igual que con las metodologías “*in vivo*”, medidas de actividad relacionadas con la cantidad de nitrito presente en el medio.

A pesar de sus ventajas en tiempo y precisión, fundamentadas, en la posibilidad de determinar con exactitud las variables cinéticas implicadas, y en la eliminación de algunas etapas como la creación de la fase anaeróbica, los resultados publicados revelan actividades ligeramente inferiores cuando se comparan los datos cosechados haciendo uso de técnicas “*in vivo*” frente a metodologías “*in vitro*”, para la misma especie de macroalga (Tabla 1). Es importante mencionar que, en algunas especies, ha sido imposible detectar valores de actividad de NR mediante ensayos “*in vitro*” (Corzo and Niell, 1991). Por otra parte, y como se ha indicado anteriormente, mediante los ensayos “*in vitro*” correctamente optimizados, en relación a la macroalga objeto de estudio, es posible obtener una mejor descripción del proceso, a través de las constantes medias de saturación (Km) y la velocidad máxima (Vmax) de consumo del sustrato, en tiempos menores que los descritos para los ensayos “*in vivo*” y con menor complejidad y cantidad de procesos.

La metodología, optimizada por Hurd et al. (1995) y extensamente aplicada por otros autores (Thompson and Valiela, 1999; Lomas et al, 2000), se centra en realizar una correcta extracción de la enzima contenida en las células del talo.

En primer lugar, desde la recolección del ejemplar, y con el fin de preservar y estabilizar la enzima durante el proceso de extracción, tanto en plantas superiores (Gegenheimer, 1990; Huber et al., 1999) como en macroalgas (Gomez-Pinchetti et al., 1992) en torno a 200 mg del talo del alga se introducen en nitrógeno líquido y se pasan por un mortero hasta obtener un polvo fino que se incorpora, junto a una determinada cantidad (entre 1-3 ml) de tampón de extracción, a baja temperatura, en un tubo de ensayo. Esta mezcla, se tritura y homogeneiza hasta obtener un fluido continuo (entre 1-3 min) a la vista, haciendo uso de una varilla de teflón, en el interior del tubo de ensayo. Al ser conocida la influencia y necesidad de obtener medios de ensayo lo más homogéneos y de la mayor calidad posible, este proceso precisa de una atención y cuidado especial, ya que este es un factor determinante tanto en la eficacia de la técnica, como en la veracidad de los datos obtenidos, (Eppley et al., 1978; Thomas and Harrison, 1988).

El tampón de extracción optimizado por Hurd et al. (1995) se basa en procurar, como se ha indicado, que la desactivación de la enzima por la aparición de proteasas, la presencia de compuestos fenólicos y la pérdida de cofactores enzimáticos no tenga lugar durante el proceso de extracción. Con este objetivo, se conforma un tampón de extracción formado a partir de un tampón fosfato (Eppley et al., 1978) con la adición de determinados compuesto claves. En primer lugar, el BSA (Bovine serum albumine), el cual, actúa como compuesto no fenólico y sirve de sustrato para todas las proteasas, frenando el conjunto de reacciones que pudieran inhibir la actividad de la enzima. Para eliminar la pérdida de cofactores enzimáticos, claves en el proceso reductor del nitrato, Hurd et al. (1995) proponen el uso de DTT (dithiothreitol). Éste previene la oxidación de los grupos thiol y favorece la estabilidad de los cofactores enzimáticos

en el medio de ensayo. En lo que respecta a la eliminación de compuestos fenólicos se suele usar EDTA (Ethylenediaminetetraaceticacid) y PVP (polivinilpilorridona), sustratos de los citados compuestos fenólicos. Es de destacar que las posibles interferencias de estos compuestos han sido testadas y contrastadas, sin afección aparente en las medidas de actividad, únicamente, la eliminación de PVP del tampón produjo un ligero aumento de las actividades para individuos de la misma especie (Hurd et al., 1995). En el tampón de extracción se añade, al igual que en el caso de los ensayos "*in vivo*", un compuesto permeabilizador de la membrana, en estas técnicas, el compuesto permeabilizante es un detergente no iónico, en contraposición al amplio uso de compuestos alcohólicos del tipo n-propanol, para la misma función en las metodologías "*in vivo*", siendo el más usado el Tritón X-100.

Tras el proceso de extracción, se separa el sobrenadante de la disolución mediante el decantado o mediante centrifugado. Se ha observado que durante centrifugado a 750 x g durante 5 minutos se pierde entre un 5-10% de la actividad enzimática (Hurd et al., 1995) frente a muestras que no pasan por el proceso de centrifugado. El sobrenadante se hace reaccionar mediante la adición del agente reductor (NADH) y una fuente de nitrato (KNO_3).

A diferencia de los ensayos "*in vivo*" el agente reductor más usado es el NADH, aplicación basada en su mayor facilidad de asimilación e incorporación a la ruta metabólica del nitrógeno, especialmente en la parte de la ruta que implica a la NR. Aunque normalmente su uso se ha desestimado por su interferencia en procesos posteriores, relativos a la determinación del nitrito formado, diversas metodologías se han desarrollado para evitar que este tipo de interferencias tengan lugar principalmente oxidando el NADH restante tras el periodo de reacción (Scholl et al., 1974).

Transcurrido el tiempo de reacción (10-20 min), a temperatura igual al lugar de recolección (15-25 °C, según autor y condiciones ambientales del alga), la reacción se detiene y se determina la cantidad de nitrito presente en la mezcla, aplicando las mismas metodologías estandarizadas y usadas para los ensayos "*in vivo*".

2.4 Ensayos cinéticos para la Nitrato Reductasa

A lo largo de los años, ambas metodologías ("*in vivo*" e "*in vitro*") han sido modificadas y optimizadas, en función de la especie objeto de estudio, atendiendo a factores como: el uso o no de determinados productos en el tampón de extracción (Hurd et al., 1995; Lomas et al., 2000), el pH y la temperatura de los medios de ensayo (Corzo and Niell, 1991) y las concentraciones de los componentes que conforman los tampones de ensayo (Thompson and Valiela, 1999). Estos datos han sido relevantes, para desarrollar nuevos protocolos y comprender infinidad de procesos internos, pero no han supuesto cambios significativos en campos como el costo económico o el tiempo de realización de los ensayos.

Tanto los ensayos de tipo "*in vivo*" como "*in vitro*" descritos, requieren de procesos de espera entre la toma de datos que superan en algunos casos la hora. En ambas metodologías se debe esperar a que tenga lugar la reacción enzimática, para posteriormente realizar la determinación de los iones nitrito formados, y aunque algunos autores han perfeccionado las técnicas de detección del nitrito, poco se ha hecho para eliminar este proceso y sustituirlo por la medida de otras variables que, intervengan de forma directa, como puede ser el consumo

de NADH durante el periodo de incubación, y que permitan eliminar ensayos posteriores y ahorrar tiempo.

La única referencia que se tiene en relación a la oxidación del NADH como medida de la actividad de la NR son los estudios desarrollados en microalgas por Lomas and Gilbert (2000). En el citado estudio, la muestra se introduce en el espectrofotómetro cada 30 s a una longitud de onda de 340 nm. La actividad de la NR se calcula a partir de la pendiente de la recta de regresión conformada con todos los valores tomados durante el periodo de incubación.

En relación a lo expuesto, se propone una modificación de los protocolos empleados hasta la fecha en macroalgas, eliminando la detección final del nitrito formado, analizando la actividad enzimática de la NR en *U. rotundata*. Con esta modificación se pretende una reducción de los tiempos de ensayo como principal ventaja y una reducción de los costos económicos al limitar el número de procesos empleados y la cantidad de reactivos usados en los mismos.

Por otra parte, la toma de medidas continuas de consumo de NADH en el homogeneizado proporcionaría una mayor precisión en el análisis del proceso enzimático, frente a las metodologías tradicionales mencionadas, que normalmente basan sus resultados en valores puntuales tomados al final del proceso de reacción.

2.5 Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Título es evaluar la aplicabilidad y funcionamiento del método basado en la medida de la actividad de la NR a través de la oxidación de NADH en macroalgas, usando como modelo la especie *Ulva rotundata*.

Para la consecución de este objetivo, se optimizan, en primer lugar, todos los factores relativos a la extracción de la enzima NR y en segundo lugar el análisis y valoración de los resultados obtenidos.

3 Material y métodos

3.1 Consideraciones previas

La especie objeto de estudio, *Ulva rotundata* Bliding (Ulvales, Chlorophyta), es un alga oportunista de crecimiento rápido, característica de las zonas costeras y estuarios con presencia media-alta de nutrientes. En las zonas costeras de la isla de Gran Canaria, se la suele encontrar próxima a lugares donde es conocida la existencia de vertidos controlados o incontrolados de aguas residuales urbanas. Presenta un talo laminar, elástico y ondulado, de bordes redondeados y formado por dos capas de células. El grosor medio del talo es de 5-7 μm y las células que lo componen presentan una forma poligonal de aristas ovaladas, con 3-4 pirenoides en sus cloroplastos (Bliding, 1968).

Los talos alcanzan entre 5-10 cm de longitud en su etapa adulta y según época del año, colonizando el interior de los charcos formados durante la bajamar, en el intermareal alto. Se desarrolla compartiendo hábitat con otras especies del mismo género (p.ej. *U. rigida*) y algas verdes de tipo filamentoso. La casi totalidad de los ejemplares recolectados presentan algas

epifitas y animales asociados. Durante el periodo de muestreo se ha observado una alternancia en la dominancia entre ambas especies de *Ulva*. Cada dos meses aproximadamente se observa la casi total desaparición de las comunidades de *Ulva* spp. que pueblan el intermareal alto, para ser posteriormente repobladas por nuevos individuos. Los talos maduran hasta alcanzar su tamaño adulto (1-2 semanas) desapareciendo al cabo de 1-2 meses.

Es de destacar que en la zona muestreada se aprecia una clara división de hábitats, entre algas rojas, principales colonizadoras del intermareal medio y algas verdes, pobladoras del intermareal superior.

La temperatura del agua en el interior de los charcos, de la zona de muestreo, oscila entre los 18 °C en pleamar (temperatura media de las aguas costeras canarias) y los 25 °C en bajamar, llegando algunas veces a valores de 30 grados, coincidiendo, estos valores, con días de elevada insolación.

Los ejemplares de *Ulva rotundata* se recogieron en la localidad de San Cristóbal, situada en la costa este de la isla de Gran Canaria, Islas Canarias, España. (28.076 N, 15.414W). La hora de recogida oscila entre las 10 y las 12 de la mañana, coincidiendo con periodos de máxima actividad de la enzima (Packard et al., 1971). Se procura recolectar ejemplares completos evitando dañar o seccionar los talos. Las muestras son trasladadas al laboratorio a la mayor brevedad posible (15-20 minutos) para la realización de los ensayos. El transporte se realiza en el interior de un contenedor de plástico transparente con agua marina preparada, 35.7 gramos de sal por litro de agua bidestilada, 30 μM KNO_3 . La temperatura del medio de transporte se iguala a la temperatura del agua en el momento de la recogida de muestras mediante un baño de 10 min en el agua del lugar de recolección.

3.2 Actividad NR

Se introducen 300 mg del talo de la *Ulva rotundata* en el interior de un tubo de ensayo de vidrio, junto a un filtro de fibra de vidrio y 2 ml del Tampón de extracción optimizado por Hurd et al. (1995) para la *Ulva* spp. Las concentraciones finales de los componentes del Tampón son 200 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ de tampón fosfato (Eppley et al., 1978). 3% volumen/volumen BSA (Bovine serum albumine), 1 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ dtt (ditriothreitol), 5 $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (Ethylenediaminetetraaceticacid) y 0,3 % Peso/volumen de PVP. pH de 8,5.

La mezcla se tritura y homogeniza en un tubo de ensayo de vidrio usando una varilla de teflón durante 2 min a 3600 rpm. a una temperatura 3-4 °C, hasta que se observa que no existen trozos de talo sin romper y que se ha formado un homogeneizado continuo al ojo humano. El homogeneizado se centrifuga a 750 x g durante 5 minutos a una temperatura de 0 °C. A continuación, se extraen 0.2 ml del sobrenadante y se depositan en cubetas de un 1ml con una concentración final de 0,1 mM de NADH y 10 mM de KNO_3 . Finalmente, la reacción se activa mediante la adición de NADH.

Instantes después de la activación de la reacción se introducen las muestras (3 réplicas), junto a sus respectivos blancos, en el espectrofotómetro (Cary100 UV-Vis) durante 10 minutos. Se toman datos continuos de absorbancia con respecto al tiempo a una longitud de onda de 340 nm (longitud de onda absorbida por el NADH).

La actividad de la NR se calcula como diferencia de la cantidad de NADH consumido a lo largo del tiempo en el homogeneizado con agente reductor y, en el mismo homogeneizado, sin agente reductor. Muestra y blanco son introducidos en el espectrofotómetro simultáneamente, a 20 °C. Las actividades se expresan en cantidad de NADH consumido por minuto y ml de homogeneizado y nmoles de nitrato consumidos por minuto y gramo de peso húmedo.

3.3 Coeficiente de extinción

Se define el coeficiente de extinción como la relación existente entre la absorbancia de un determinado compuesto y la concentración del mismo en el medio de ensayo. Esta relación, es clave para determinar la cantidad de NADH oxidado a lo largo del tiempo en las muestras analizadas. Estableciéndose una relación directa entre el consumo, o producción, de NADH en el medio, con respecto al tiempo, a través de la siguiente expresión:

$$\Delta[\text{NADH muestra}] = \text{Coef extinción} * \Delta\text{Absorbancia muestra}$$

Debido a su importancia durante el tratamiento de los resultados se calcula el coeficiente de extinción del NADH para las condiciones del laboratorio, materiales, y productos utilizados.

Se preparan por triplicado cubetas de 1ml con diferentes concentraciones de NADH (0,0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18 y 0.2mM). Para evaluar las posibles interferencias con los tampones se preparan las mismas concentraciones de NADH diluyéndolo tanto en tampón de extracción como en tampón fosfato. Las muestras se introducen en el espectrofotómetro durante 10 min a 340 nm y se toman los valores medios de absorbancia para cada concentración dada.

Al no existir diferencias significativas entre los valores de absorbancia obtenidos para las muestras analizadas con el tampón fosfato o con el tampón de extracción se realiza una media de todos los valores de absorbancia y se representan en el gráfico adjunto con su desviación estándar.

Coeficiente de extinción

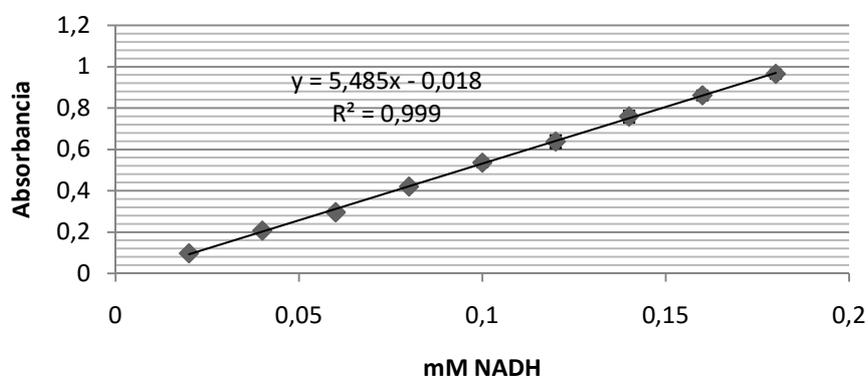


Fig.1: Valores medios de absorbancia para las concentraciones de NADH dadas. El coeficiente de extinción coincide con el valor de la pendiente de la recta $5,4855 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.4 Determinación de las constantes cinéticas

La K_m y la V_{max} de la reacción, en función de la concentración de agente reductor (NADH) y de la concentración de nitrato, se calcula y compara a través de las ecuaciones propuestas por Lineaweber-Burk, Eadie Hofstee y Hanes-Woolf.

Una correcta determinación de la K_m permite optimizar el ensayo evitando, por un lado, la inhibición de la actividad enzimática por exceso o falta de sustrato, y por otro lado, evita elevar los costos de los ensayos al determinar, experimentalmente, la cantidad exacta de sustrato que provoca la máxima actividad potencial de la enzima, bajo las condiciones de ensayo.

La obtención de las constantes cinéticas para el NADH se realiza midiendo la actividad enzimática, según el proceso descrito, para un rango de concentraciones de NADH que va de 0mM a 0.2 mM en intervalos de 0.02 mM.

En el caso del KNO_3 se evalúa la actividad para concentraciones de 100, 50, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1 y 0 mM.

3.5 Ensayos sobre la influencia a corto plazo, de la luz y la concentración de nitrato, en la actividad enzimática.

Este ampliamente demostrado que; la presencia de nitratos en el ecosistema, la incidencia lumínica y las fases de luz y oscuridad, afectan de forma directa a la actividad enzimática. (Packard et al. 1971; López-Figueroa et al. ,2002)

Para evaluar el efecto, a corto plazo, de estas variables se introducen 6 gramos de peso fresco de *Ulva rotundata*, recién recolectada en 1 litro de agua de mar preparada (35.7 gramos de sal por litro de agua bidestilada) con concentraciones de 5, 10, 25 y 50 μM de KNO_3 . Evaluándose la actividad enzimática tras 25 minutos de oscuridad. Una vez pasada la fase oscura, el alga se expone a condiciones de luminosidad ambientales y se realizan ensayos tras 15 y 45 minutos de exposición a la luz ambiente. Previo a la introducción de los ejemplares en el medio de cultivo diseñado se analiza la actividad enzimática de los ejemplares recolectados. Todas las medidas de actividad se realizan según la metodología propuesta y se expresan en nanomoles de NADH consumido por minuto y ml de homogeneizado.

3.6 Ensayos sobre la influencia a largo plazo de la concentración de nitrato

En torno a 10 gramos de *Ulva rotundata* procedentes de la zona de estudio se mantuvieron durante 10 días en cultivo, en el interior de recipientes de vidrio, sumergidos en un litro de agua marina filtrada con concentraciones de 5, 10 y 25 μM de KNO_3 con burbujeo constante. La temperatura de la cámara de cultivo se fijó a 20 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz 12 horas de oscuridad (Cabello-Pasini, 2010). El agua de los cultivos se cambia de forma diaria restableciéndose los valores iniciales.

Con el objeto de evaluar la tasa de crecimiento se extraen, por triplicado, discos de un 1 cm^2 procedentes del talo de varios ejemplares, haciendo uso de una cuchilla cilíndrica. Los discos se introducen en el interior de los medios de cultivo descritos y se mantienen bajo las mismas condiciones. En días alternos se toman fotos de los discos y se comparan las áreas medidas con respecto al área inicial, haciendo uso del programa ImageJ®. Los días impares y

en torno a las 10-12 a.m. se corta un trozo de talo sano y se congela en tubos ependhorf a -80 °C para el posterior análisis de la actividad enzimática.

3.7 Medidas de la actividad enzimática mensual.

Para establecer comparaciones con el resto de autores, durante los meses de Mayo, Julio, Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre. Se evalúa la actividad enzimática, de *Ulva rotundata* de la zona de ensayo, siguiendo la metodología propuesta.

4 Resultados

4.1 Constantes cinéticas

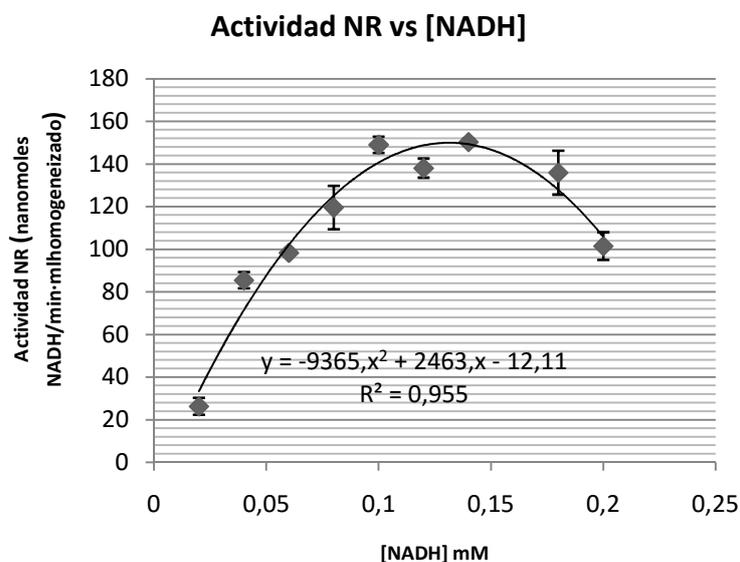


Fig. 2: Actividad enzimática en función de la concentración de NADH en el medio de ensayo. La actividad se da en nanomoles de NADH consumidos por min y ml de homogeneizado. Medias de actividad con su desviación estándar.

La Km del NADH se establece como $(0.029 \pm 0.011 \text{ mM})$. Siendo el valor de la Km dada, la media de los valores obtenidos por las diferentes rectas de regresión junto a su desviación típica. Si se incluyen en los cálculos el valor de la actividad, para la concentración de 0.16 mM la constante de saturación media para *Ulva rotundata* es 0.026 ± 0.017 .

A partir de valores superiores a 0.2 mM se observa una inhibición de la actividad enzimática derivada del exceso de sustrato en el medio homogeneizado.

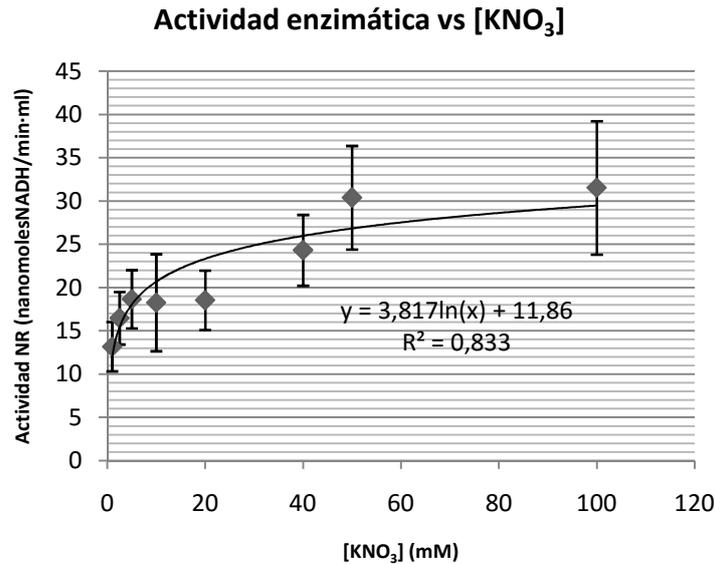


Fig. 3: Actividad enzimática en función de la concentración de KNO₃ en el medio de ensayo. La actividad se da en nanomoles de NADH consumidos por min y ml de homogeneizado. Medias de actividad con su desviación estándar.

Con respecto al valor de la constante media de saturación para el KNO₃ se encuentra que para valores inferiores a 20mM la actividad enzimática no varía significativamente, pudiendo sugerir concentraciones elevadas de nitrato almacenadas en el interior de las células.

El valor de la Km para el KNO₃ es 0.901 ± 0.45 mM.

4.2 Ensayos sobre la influencia a corto plazo, de la luz y la concentración de nitrato, en la actividad enzimática.

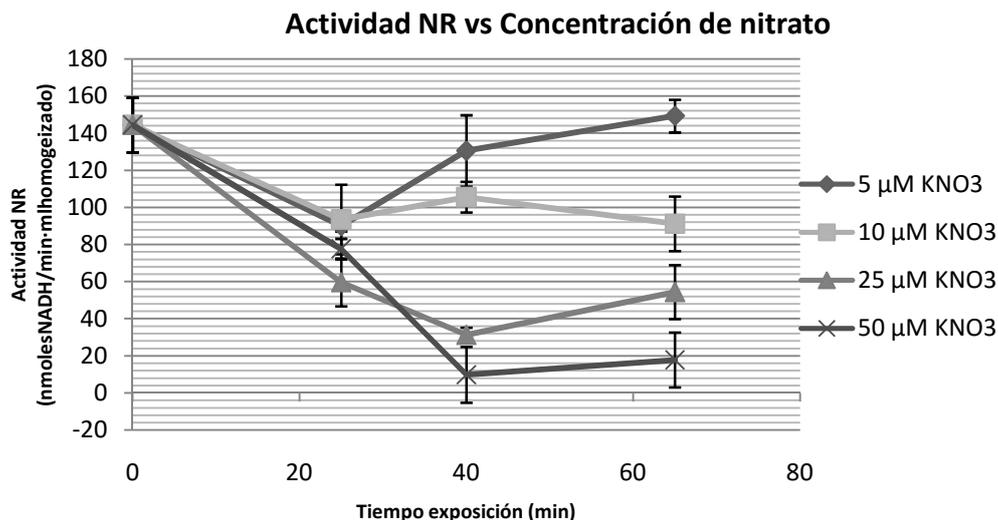


Fig. 4: Actividad enzimática en función del tiempo de exposición a la luz para 4 concentraciones de nitrato en el agua de cultivo. Final de la fase oscura 25 min, coincidente con el inicio de la fase luminosa. Los valores de actividad se dan en nanomoles de NADH consumidos por minuto y mililitro de homogeneizado

Con respecto a los ejemplares sometidos a condiciones de oscuridad durante un periodo de tiempo de 25 min se aprecia un descenso de un 44.45 ± 10.5 % en la actividad de

todos los ejemplares cultivados independientemente de la concentración de nitrato presente en el medio, siendo más acusada la disminución de la actividad para concentraciones superiores a los 25 μM .

Finalizado el periodo de oscuridad, la actividad de los individuos que se encuentran en agua con concentraciones inferiores a 5 μM sigue una progresión ascendente hasta alcanzar y superar, en algunos casos (3.03%), la actividad inicial del alga tras 45 minutos expuesta a la luz ambiente. El alga mantenida en agua con concentraciones de 10 μM recupera parte de su actividad inicial (8.23%) tras 15 minutos expuesta a la luz ambiente, pero vuelve a caer de forma no significativa tras 45 min de exposición a la luz mostrando una actividad final un 36.07% inferior con respecto a la actividad inicial.

En los individuos mantenidos en concentraciones de 25 y 50 μM se observa un decrecimiento de la actividad de la NR, aun habiéndose iniciado el fotoperiodo. Para posteriormente estabilizar su actividad en niveles un 79 % y un 85 % menor que la actividad inicial para concentraciones de 25 y 50 μM respectivamente. Es de destacar que tras 45 min de fotoperiodo los valores de actividad siguen siendo relativamente inferiores a los recogidos tras la fase oscura un 15% y un 75 %, respectivamente.

4.3 Ensayos sobre la influencia a largo plazo de la concentración de nitrato

Las algas cultivadas bajo condiciones controladas presentaron una respuesta clara a la concentración de nitratos presente en el medio (fig. 5). Partiendo de las mismas condiciones ambientales en el punto de muestro, tras el primer día sumergidas en diferentes concentraciones de nitrato los valores de actividad se estabilizan, para luego caer de forma drástica, para concentraciones de 5 y 10 μM , en torno al séptimo día de cultivo. Los ejemplares cultivados en concentración 25 μM de KNO_3 presentan una actividad baja pero constante a lo largo de todo el periodo de cultivo. Durante los primeros 5 días de cultivo los valores de actividad son de media un 84 % y un 66 % superior para concentraciones de 5 y 10 μM con respecto a los valores medidos para la concentración 25 μM .

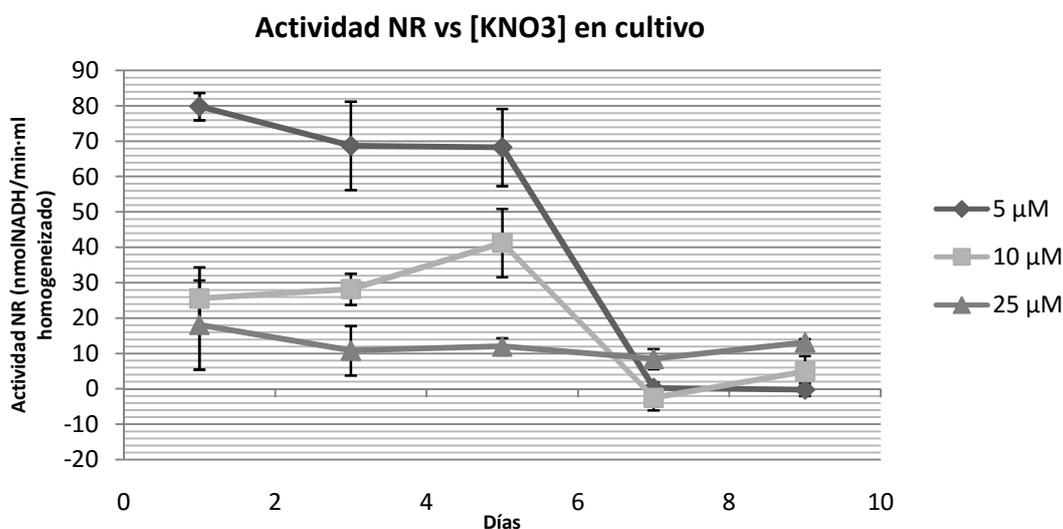


Fig.5: Actividad enzimática diaria para diferentes concentraciones de nitrato en el agua de cultivo. Los valores de actividad se dan en nanomoles de NADH consumidos por minuto y mililitro de homogeneizado.

4.4 Medidas de la actividad enzimática mensual.

En la figura 6 está representada la actividad enzimática en *U. rotundata* en relación al período de año que fue recolectada. Durante el periodo de optimización de los ensayos, las algas recogidas y analizadas presentan un comportamiento estacional. Los valores de actividad alcanzan su máximo en el mes de septiembre, donde la actividad es 2 veces superior a la actividad medida durante los meses de Octubre y Noviembre. La actividad durante los meses de Julio y Agosto es prácticamente inexistente, siendo éstas hasta 7 veces inferior que los valores máximos medidos en el mes de septiembre.

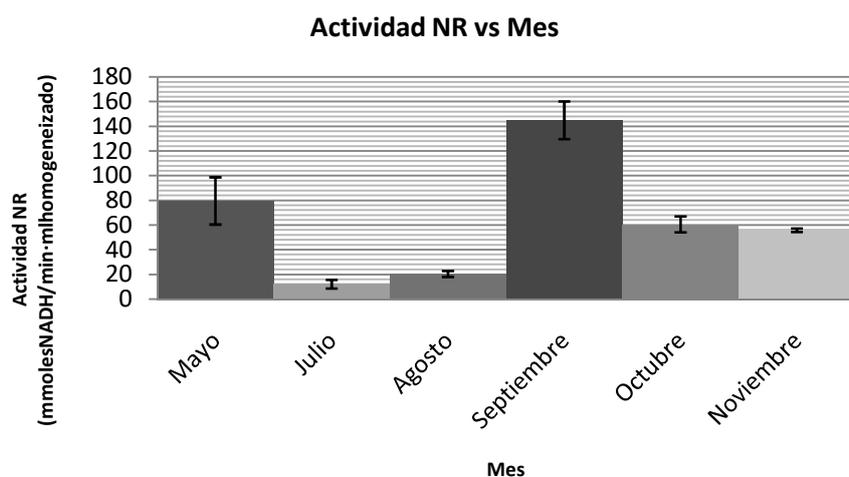


Fig. 6: Actividad enzimática en función de la época del año recolectada. Los valores de actividad se dan en nanomoles de NADH consumidos por minuto y mililitro de homogeneizado

4.5 Actividad enzimática vs biomasa homogeneizada

En la figura 7 se muestra la relación entre la actividad enzimática respecto a la biomasa algal utilizada. Se observa una relación directamente proporcional entre los mg de alga homogeneizados y la actividad registrada, siendo dos veces superior usando 300 mg que usando 122 mg de alga en el homogeneizado.

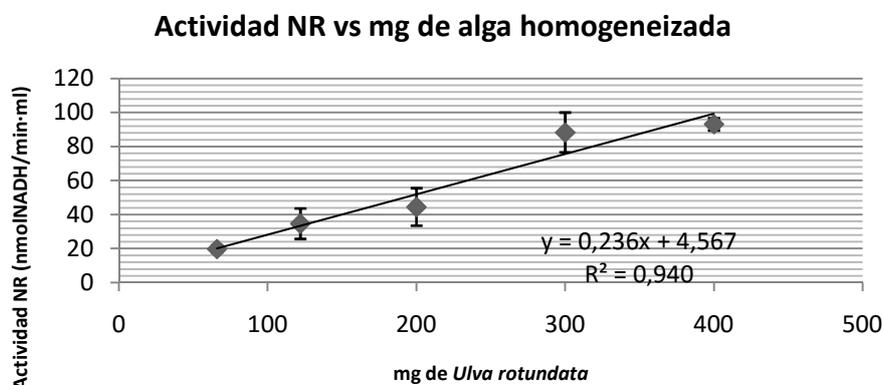


Fig. 7: Actividad enzimática en función de la cantidad de alga (mg) en el homogeneizado. Los valores de actividad se dan en nanomoles de NADH consumidos por minuto y mililitro de homogeneizado. Todas las muestras se homogenizan en 2 ml de tampón de extracción

4.6 Conversión y comparación de los resultados

Con el fin de comparar los datos obtenidos con otros estudios realizados con anterioridad, se convierten los valores de actividad expresados en nmoles NADH reducidos por minuto y ml de homogeneizado a nmoles de NO_3^- reducidos por minuto y gramo de peso húmedo.

Se asume que la densidad del homogeneizado es 0.15 gramos por ml de homogeneizado y que por cada mol de NADH reducido se reduce un mol de NO_3^- . Los valores registrados oscilan entre 980 -0nanomoles de NO_3^- consumidos por minuto y gramo de alga.

Tabla I: Actividad enzimática para diferentes especies de macroalgas expresada en nanomoles de NO_3^- reducidos por min y gramo de alga. Fuente Hurd et al. (1995), Young et al (2005).

Especie	Ensayo	Actividad (nmoles NO_3^- / grs·min)	Fuente
Chlorophyta			
<i>Ulva rotundata</i>	"in vitro"	490	Presente estudio
<i>Ulva lactuca</i>	"in situ"	0.42	Murthy et al. 1986
<i>Ulva rigida</i>	"in situ"	3.8	Corzo and Niell 1992
<i>Ulva fenestrata</i>	"in situ"	5.9	Gao et al. 1992
	"in situ"	29.3	
<i>Ulva sp.</i>	"in vitro"	9.3	Hurd et al 1995
<i>Ulva sp.</i>	"in vitro"	37.3	Young et al. 2005
	"in vitro"	45.9	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	"in vitro"	26.7	Thomas and Harrison 1988
	"in situ"	0.8	
	"in situ"	4.2	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	"in situ"	13.8	Maier and Pregnall 1990
Phaeophyta			
<i>Giffordiamichellae</i>	"in situ"	10	Weidner and Kiefer 1981
<i>Macrocystis angustifolia</i>	"in vitro"	3.3	Haxen and Lewis 1981
	"in vitro"	11.7	
<i>Macrocystis intergrifolia</i>	"in vitro"	9.61	Hurd et al. 1995
<i>Laminaria digitata</i>	"in vitro"	3.3	Davinson and Stewart 1984
	"in vitro"	5.3	
<i>Laminaria saccharina</i>	"in situ"	4.8	Davinson and Davinson 1987
<i>Laminaria japonica</i>	"in situ"	0.17	Brinkhuis 1989
<i>Costariacostatatum</i>	"in vitro"	10.7	Hurd et al. 1995
<i>Sargassum filipendula</i>	"in situ"	5.8	Maier and Pregnall 1990
<i>Fucus gardneri</i>	"in vitro"	0	Thomas and Harrison 1988
	"in situ"	0	
	"in situ"	6	
<i>Fucus gardneri</i>	"in vitro"	5.73	Hurd et al. 1995
	"in vitro"	35.99	
	"in vitro"	1.5	
Rhodophyta			

<i>Petroglossumnicaeense</i>	"in situ"	0.4	Dipierro et al. 1977
<i>Porphyrazeoensis</i>	"in vitro"	33.2	Araki et al. 1979
<i>Porphyra perforata</i>	"in vitro"	20.8	Thomas and Harrison 1988
	"in situ"	25	
	"in situ"	41.7	
<i>Porphyra umbicalis</i>	"in situ"	19.2-158	Hernandez et al. 1993
<i>Porphyrasp.</i>	"in vitro"	4	Hurd et al. 1995
<i>Corallinavancouviensis</i>	"in vitro"	22.6	Hurd et al. 1995

5 Discusión

En el presente trabajo decidimos aplicar una metodología "in vitro" para la evaluación de la actividad enzimática en el alga verde *Ulva rotundata* por dos motivos. En primer lugar, porque la aplicación de las metodologías "in vivo" no se considera óptima, ya que mantiene el alga en un periodo de incubación que intenta emular las condiciones del medio, pero en condiciones de oscuridad. El uso de la fase oscura durante una larga incubación en los ensayos "in vivo" es hasta cierto punto contradictoria, ya que, la enzima se inhibe en la oscuridad (Packard et al., 1971; Chow et al. 2004). Esta inactivación es bastante rápida, en torno a una o dos horas, por lo que debería esperarse una pérdida significativa de la actividad enzimática derivada de este fenómeno. Los ensayos tipo "in vivo" no parecen solucionar esta problemática ya que, según los datos recogidos en el presente estudio, la enzima va perdiendo actividad a medida que el tiempo de incubación aumenta. Esta pérdida de actividad no es cuantificable y se estaría subestimando el poder reductor de la NR al medir la cantidad de nitrito formado tras el periodo de incubación. Tras una media hora de incubación debe de existir un punto crítico, no descrito, donde los valores de actividad alcancen un "plateau", no medido por estas técnicas, donde la actividad sea relativamente inferior a la del inicio del periodo de incubación. Por lo que, si se desea medir actividades potenciales máximas y no solo caracterizar la enzima se debería evitar la aplicación de esta técnica. En segundo lugar, medir el consumo de NADH mediante metodologías "in vivo" requeriría de la medida, a intervalos, del NADH presente en el medio de incubación a lo largo del tiempo, se debería extraer un 1 ml del agua de ensayo cada cierto tiempo e introducirla en el espectrofotómetro. Esto haría necesario disponer de medios de incubación de gran volumen y aportaría complejidad al tratamiento de datos al cambiar de forma continua la relación biomasa-volumen del medio de incubación.

Por otro lado, la posibilidad de hacer uso de un espectrofotómetro multicarril, donde siguiendo metodologías "in vitro", muestra y blancos se pueden introducir de forma simultánea para evaluar de forma continua la oxidación de NADH, y no punto a punto, hace más conveniente el uso de las técnicas "in vitro". En defensa de lo expuesto, y según datos del presente estudio, el análisis continuo de la oxidación de NADH provee información de las varianzas en la tasa de actividad en el interior del homogeneizado. En las lecturas obtenidas, la pérdida de actividad durante la fase de incubación, la cual tiene lugar en oscuridad, durante 10 minutos, parece no disminuir la actividad enzimática. Como se aprecia en la figura 8, las rectas, cuando la enzima está activa presentan tendencias fuertes y claras y no existen cambios en las

pendientes de la misma a lo largo del tiempo, que indiquen cambios en la actividad, por lo que se concluye que el periodo de incubación en oscuridad y con incidencia de luz UV en el interior del espectrofotómetro, aplicado en el ensayo, no afecta a la actividad medida.

La medida de la NR a través de la oxidación de NADH es un método que desconocemos haya sido aplicado en macroalgas. Por ese motivo se normalizan los datos obtenidos para compararlos con los recopilados por Hurd et al. (1995) y Young et al. (2005) expuestos en la tabla 1 y obtenidos por diferentes metodologías.

En lo que respecta a los valores medios de actividad obtenidos, se observa que estos son de un orden de magnitud superior a los recogidos por el resto de autores, se cree que en relación a la competencia existente por el NADH entre la NR y el oxígeno al final de cadena respiratoria (Canvin and Woo, 1979), el método expuesto presenta una clara desventaja. La pérdida de concentración de NADH observada puede ser debida a la suma de estos dos procesos, los cuales, ocurren de manera simultánea dentro del homogeneizado. Puede ser que parte del NADH esté siendo consumido por la fosforilación oxidativa en la etapa final del proceso respiratorio para producir ATP. Corregir este fenómeno, pasaría por la realización correcta de los blancos de la muestra. Sin embargo, esta posibilidad no existe de forma clara. Por un lado, realizar los blancos sin añadir una fuente de nitrato a la alícuota, pero si agente reductor, es la opción más lógica y de aplicación más extendida (Lomas and Gilbert, 2000). No obstante, la existencia de pools internos de nitrato desvirtuaría esta medida, y restar la actividad de este blanco a la actividad de la muestra daría como resultado, en la mayoría de los ensayos propuestos, actividades nulas o significativamente inferiores que no se ajustan a la realidad, ya que, restaríamos a la muestra tanto la fase respiratoria como el proceso enzimático derivado de la existencia de pools internos de NO_3^- . Por otro lado, la creación de un blanco de muestra donde sólo se evalúe la actividad basal de la enzima, sin añadir agente reductor, pero si una fuente extra de nitrato, daría como resultado actividades claras de la enzima debida al incremento del KNO_3 pero limitadas por la ausencia de NADH, que en pequeñas concentraciones puede favorecer ambos procesos (K_m 0,029mM).

Teniendo en cuenta lo descrito, en el presente estudio se realizan los dos tipos de blanco, dando como resultado, según lo indicado, que el uso de un blanco con agente reductor es inviable, por lo que la segunda opción fue la seguida a pesar de considerarse que no describe de manera fiable el proceso, ya que, no se le resta completamente a la muestra los procesos respiratorios derivados del incremento de la concentración de NADH, sobrestimándose por tanto las medidas de actividad y siendo esta la razón por la cual los datos recogidos difieren en gran medida con los presentados por otros autores. En lo que respecta a las metodologías "in vivo", la creación de una fase anaeróbica durante el ensayo, a pesar de su costo temporal, parece ser una fuerte ventaja competitiva, que aporta una solución rápida y sencilla a esta problemática. No obstante, conformar un medio de incubación con presiones negativas o un medio cargado de N_2 cuando se aplica el vacío o la inyección de nitrógeno, respectivamente, no parece ser una solución del todo acertada. En uno, se crea un estado que no se asemeja a la realidad. La presión atmosférica no suele presentar valores negativos, más bien, todo lo contrario, a nivel del mar alcanza su valor máximo, y por otro lado, la inyección de gas nitrógeno podría ser un aporte no controlado de nitrógeno a la célula, a pesar de la dificultad de la misma para asimilarlo del aire.

En apoyo a la técnica propuesta, atendiendo a los datos y en relación a lo expuesto en el párrafo anterior, se observa que, los valores pico recogidos durante la fase luminosa, cuando la concentración de nitrato no inhibe la enzima, son superiores a los cosechados tras la fase de oscuridad. Este hecho demuestra que a pesar de que se considere que la técnica está midiendo la combinación de respiración y actividad enzimática, y siendo imposible separar de forma clara ambos procesos, parece existir una mayor concordancia con lo que debería ocurrir por los procesos enzimáticos que por la fase respiratoria. Tanto en oscuridad como en fase luminosa la respiración debería mantenerse constante, hecho que no ocurre en los ensayos realizados, donde, tras un periodo de oscuridad, la enzima pierde gran parte de su actividad.

Con respecto al periodo de acondicionamiento previo al ensayo utilizado por algunos autores (Thomas and Harrison, 1988), se ha observado que, una vez el alga ha sido recolectada del área de estudio, y se somete a otro ambiente, la enzima pierde parte de su actividad. Y aunque bajo determinadas concentraciones ($<5\mu\text{M}$) se producen aumentos de actividad, los valores iniciales de actividad sólo fueron superados en un número reducido de casos de estudio. Por ello en el presente estudio se estima que someter al alga a un periodo de aclimatación, bajo determinadas condiciones, puede ser contraproducente. Los ejemplares se trasladaron al laboratorio a concentraciones de $30\mu\text{M KNO}_3$, asumiéndose, según los resultados obtenidos, pero no pudiendo cuantificarse, que existe una pérdida de actividad durante este tiempo debida a la elevada concentración de nitrato en el medio de transporte y al cambio brusco de hábitat. En muchos de los casos la composición del agua de transporte, cultivo y aclimatación no se asemeja a la composición real del medio.

En el presente estudio, se usaron dos aguas diferentes, una de cultivo y otra de mantenimiento. El agua de cultivo era agua filtrada procedente de la costa noreste de la isla, mientras que el agua de los ensayos a corto plazo era agua marina artificial creada en el laboratorio, no obstante, no se observaron diferencias en los comportamientos del alga derivadas del uso de un agua u otra. Consideramos que durante los ensayos existen otros factores más relevantes a la hora de determinar la actividad máxima de la enzima y su comportamiento en los ensayos realizados. Estos factores son, en primer lugar, proceso de extracción, incluyendo temperatura, centrifugado y cantidad de alga en el homogeneizado y en segundo lugar, la concentración de iones nitrato y nitrito en el interior celular.

En lo que respecta al proceso de extracción de la enzima, y particularmente en relación al tampón de extracción, el uso de determinados productos ha sido discutido en numerosas ocasiones (Hurd et al. 1995). No obstante, en el presente estudio no se observa inhibición de la actividad enzimática derivada del uso del tampón de extracción utilizado en la bibliografía (Hurd et al., 1995). Para la misma composición, concentración y pH, en el tampón, se recogen tanto actividades nulas o insignificantes, como valores elevados de la misma (fig. 8), siendo el causante, el resto de variables que regulan el proceso de extracción. Factores como; la velocidad de centrifugado y la cantidad de alga usada parecen ser determinantes a la hora de obtener actividades significativas. Velocidades de centrifugado de $4000 \times g$ durante 10 minutos llegan a inhibir la actividad enzimática de forma considerable, mientras que velocidades excesivamente bajas ($<750 \times g$) son inviables porque no separan el sobrenadante de forma correcta y se incorporan residuos a la alícuota que pueden modificar los valores de absorbancia medidos. La densidad del homogeneizado junto con la cantidad de talo usado en

la preparación de las muestras no inhibe *per se* la actividad, no obstante, si se usa menos de 30 mg de alga por ml de tampón de extracción, se observa que los valores de actividad pueden ser nulos o demasiado pequeños para poder establecer comparaciones. Por otro lado, la señal recibida en estos casos presenta una elevada dispersión. De igual modo, densidades superiores a 200 mg por ml de homogeneizado presentan severos problemas a la hora de triturar los ejemplares, a pesar de reportar mayores valores de actividad.

La temperatura durante la extracción parece ser otro parámetro de elevada influencia. Es necesario mantener el alga y homogeneizado en torno a 3-4 °C como máximo durante la totalidad del proceso y hasta la introducción de la muestra a 20 °C en el interior del espectrofotómetro. Muestras mantenidas a temperaturas próximas a la del hielo desde su recolección hasta su evaluación manifiestan mejores respuestas que aquellas mantenidas a temperatura superiores a los 10°C, y significativamente superiores a aquellas que han estado expuestas a temperatura ambiente durante la extracción.

El uso de nitrógeno líquido, recomendado para la estabilización y la extracción de la enzima (Gomez-Pinchetti, 1992), puede ser un punto a tener en cuenta. Hemos observado que la variación de las condiciones ambientales durante periodos cortos de tiempo tiene un impacto cuantificable en la actividad enzimática. La posibilidad de poder aislar la enzima y “congelar” su actividad, desde el momento de su recogida hasta su posterior ensayo, se muestra bastante seductora. A esto habría que añadir las ventajas del N₂ líquido en lo que concierne al mantenimiento de temperaturas estables y por debajo de los 3°C durante todo el proceso de extracción. La simplificación de la etapa de triturado que, por un lado, rigidiza y le añade fragilidad al talo de *U. rotundata*, y que por otro lado, facilita el homogeneizado, demuestra la necesidad de probar la influencia del N₂ líquido en la metodología propuesta.

De todo esto se concluye que quizás el uso de N₂ líquido más filtrar y decantar el homogeneizado, en vez de centrifugar, u optimizar aún más la velocidad y el tiempo de centrifugado permita lecturas de mayor intensidad y calidad.

En relación a la conclusión expuesta, las rectas de la figura 8 demuestran la inactivación de la enzima en homogeneizados con la misma cantidad de alga, misma concentración de agente reductor y misma concentración de nitrato. Cuando la enzima se inactiva se recogen datos que se asemejan a las rectas de los blancos, donde los valores de absorbancia no presentan una tendencia clara. Ésta es una fuerte ventaja de los análisis cinéticos, la interpretación de las curvas registradas permite discernir entre procesos de extracción llevados a cabo correctamente, donde la enzima está presente, y procesos en los cuales ésta ha sufrido una inactivación debida principalmente a fallos durante su aislamiento y extracción. Los ensayos realizados que presentan este tipo de tendencias son repetidos. Para minimizar los errores muestra y blanco proceden del mismo homogeneizado. En el caso que alguna de las réplicas otorgue como resultado curvas parecidas a la expuesta en la figura 8 (izquierda) se elimina. Por otro lado, esta aleatoriedad en la toma de datos es demasiado frecuente y condicionante, y en muchos de los casos se requiere de demasiadas repeticiones para obtener valores fiables.

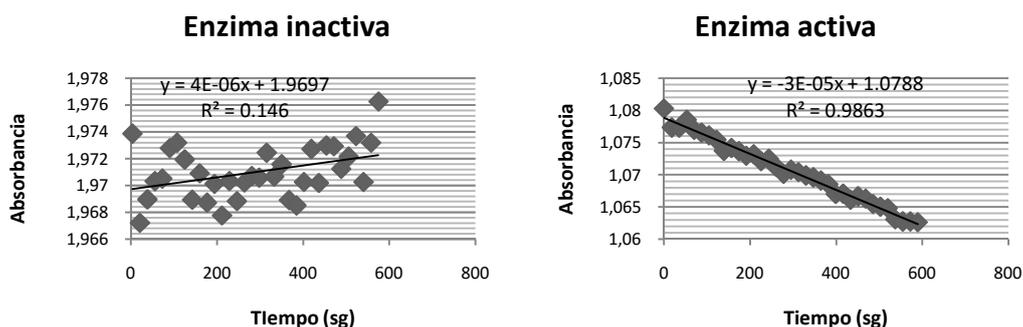


Fig 8. Comparación entre los valores de absorbancia que presenta una enzima activa e inactiva dentro del homogeneizado.

En cuanto al segundo factor, la relación que existe entre los iones nitrato, nitrito y amonio con la enzima es un poco extraña. Primero hay que tener en cuenta que cuando se evalúa la afección de la concentración de nitrato en el interior celular mediante el cálculo de la K_m , se obtiene que la actividad potencial máxima no cambia significativamente en función del aumento de la concentración de nitrato, y que la célula almacena el nitrato restante en pools internos a la espera de la incorporación de un agente reductor (NADH) (fig. 2). Es más, los valores medios de la K_m del KNO_3 coinciden con los propuestos por otros autores. Sin embargo, cuando la concentración del medio de cultivo, tanto a largo como a corto plazo, cambia, se observa que la actividad enzimática guarda una relación directa con ella pero opuesta a lo que expresa la literatura consultada (Cabello-Pasini et al., 2011). En este estudio las concentraciones de $5\mu\text{M NO}_3^-$ reportaron más actividad que las de 25 y 50 μM . Sin embargo, para la mayor parte de autores a mayor concentración de nitrato en el agua mayor ratio de absorción y mayor actividad enzimática (Havens et al., 2001), pudiendo ser la actividad enzimática un indicador de la tasa de incorporación de nitrato al interior celular (Davinson and Stewart. 1984; Young et al., 2005). Lo observado en el estudio indica que para concentraciones bajas de nitrato la actividad es mayor que para concentraciones altas, estando su concentración límite en torno a los 10-15 μM . Este hecho sugiere una inhibición en la actividad de la enzima cuando el alga se encuentra en concentraciones altas de nitrato, pero no en la captación de nitrato, ya que, es de destacar que, independientemente de la concentración de nitrato en el medio, el análisis aleatorio del agua tras un día de cultivo dio como resultado que la concentración de nitrato era nula o prácticamente indetectable. Esta citada inhibición enzimática, puede ser debida a la presencia de demasiados iones nitrito o amonio en el interior de las células, derivado de un bloqueo de las rutas metabólicas que siguen a la NR, cuya regulación puede ser más dependiente de las concentraciones internas, de estos componentes, que de las externas (Pregnall et al., 1987, Thomas and Harrison, 1988). A pesar de que la enzima NR debería demostrar mayor actividad, quizás la célula activa algún mecanismo de protección, reduciendo su actividad, con el fin de sintetizar primero el nitrito o amonio, antes de que este alcance concentraciones críticas en el interior del cloroplasto. Puede ser que bajo las condiciones de ensayo, tanto los iones nitrito, como amonio, se encuentren atascados en algún proceso posterior dependiente de la respiración o la fotosíntesis, donde la cantidad de ferredoxina, o la ausencia de energía en forma de ATP o ADP, pueda estar limitando la síntesis de amonio o la incorporación del mismo (Chow et al. 2004), siendo este comportamiento un patrón común tanto en ensayos a largo como a corto

plazo. Si el medio de cultivo carece de los oligoelementos necesarios para el alga (medio de cultivo únicamente enriquecido con KNO_3) puede darse la rotura de la cadena metabólica del nitrógeno, al no disponer el alga, como se ha indicado, de los compuestos necesarios para procesar nitrito o incorporar amonio. Esto podría explicar porque el alga continúa bajando los valores de actividad después de la fase oscura, en los ensayos a corto plazo, y tras un día en cultivo, para concentraciones elevadas de NO_3^- .

En lo que respecta a las variables cinéticas. La enzima parece tener una fuerte dependencia del NADH. A bajas concentraciones la actividad enzimática prácticamente se anula llegando incluso a observarse valores de producción de NADH. Por otro lado, los datos sugieren una inhibición de la actividad cuando los valores de concentración superan los 0.2 mM NADH. Dato a destacar, ya que, para algunos autores, 0.2mM es la concentración optima para la realización del ensayo (Hurd et al., 1995; Lomas y Gilbert, 2000; Young et al. 2005). El análisis de las alícuotas, sin la adición de agente reductor ni fuente de nitrato, también pone de manifiesto la dependencia descrita. Sin la adición de NADH, la enzima reduce su actividad observándose, como era de esperar, comportamientos similares a los registrados en los ensayos donde la concentración de NADH es nula. Si se comparan los valores de la constante media de saturación con los datos ofrecidos por otros investigadores (Hurd et al., 1995), la obtenida es de un orden de magnitud inferior, 0.02 frente a 0.18-0.24mM (para *Fucus gradneri*), sugiriendo que pequeñas concentraciones de NADH en el interior celular llevan a la enzima a su máxima actividad. Esta rápida activación puede ser también derivada de la fosfoliración oxidativa la cual está captando el NADH aportado para la producción de ATP.

En contraposición, y según se interpreta en el presente estudio, la actividad enzimática parece no tener una relación directa con la cantidad de KNO_3 disuelta en el medio de ensayo, y por consiguiente en la célula. A partir de concentraciones relativamente altas (20 mM) los valores de actividad permanecen prácticamente iguales, sugiriendo altos contenidos de NO_3^- almacenado en el interior de las células, en concentraciones que se estiman próximas a 20mM. En apoyo a esta afirmación, el análisis de los blancos revela fuertes actividades para homogeneizados carentes de KNO_3 añadido. Los valores de actividad, medidos en los blancos, coinciden con los valores de actividad registrados para concentraciones situadas entre los 0-20mM KNO_3 . Siguiendo esta observación, para el cálculo y la representación del K_m se toman valores de las muestras sin contar la interacción de los blancos. Su uso, revelaría valores de actividad nulos que no se asemejan con lo que realmente ocurre en el interior del homogeneizado con relación a la actividad enzimática. Contar con los blancos daría, como se ha indicado, la diferencia de actividad. Esta observación apoya la existencia de "pools" de nitrato en el interior de las células. (Hurd et al. 1995; Thompson and Valiela 1999; Lomas and Gilbert, 2000).

Los valores de las constantes cinéticas para el KNO_3 coinciden con los datos propuestos por otros autores (Hurd et al, 1995; Lomas and Gilbert, 2000). Sin embargo, su correcta optimización pasaría por su cálculo, modificando pH y temperatura. Los valores de pH y temperatura proceden de estudios previos que establecen, máximos de actividad, en *Ulva* spp., para valores de pH y temperatura de 8-9 y 20-25 °C respectivamente. (Corzo and Niell, 1991).

El punto de inflexión observado en las medidas de actividad, registradas durante el cultivo, se relaciona con un fallo durante el proceso de extracción de la enzima, motivo por el cual los cultivos fueron repetidos varias veces y siendo otra razón que justifica el uso de nitrógeno líquido con el fin de conservar la enzima en las mismas condiciones en las que fue recolectada el alga. No obstante, esta bajada de actividad coincide con el inicio de una degradación de los ejemplares (fig. 9) que parece explicar los bajos valores de actividad detectados al final del cultivo. La concentración de nitrito no parece estar relacionada con este fenómeno a largo plazo. Otros autores (Chow, 2004; Ale et al., 2011) exponen, para medios de cultivo similares, crecimientos mayores y valores de actividad NR constantes a lo largo del tiempo. Atendiendo a la actividad en los días previos al inicio de la degradación (día 5) su comportamiento es el esperado. En condiciones óptimas de sustrato el alga realiza su actividad de forma normal. La pérdida de actividad en los últimos días del ensayo tiene varias explicaciones posibles. En primer lugar, podría ser resultado del estrés sufrido por los ejemplares durante el periodo de cultivo. De forma diaria, eran sacados del medio, secados y pesados. Realizar los cambios de agua cada dos o tres días podría conservar los ejemplares con mayor calidad. Se ha observado que, algas mantenidas en cultivo, donde no existe interacción humana con el medio, presentan mejor aspecto que aquellas cultivadas bajo condiciones más estrictas. Por otro lado, la luz usada (fluorescente) podría presentar en su composición parte de radiación UV (Cabello-Pasini et al., 2011) que incida negativamente en los procesos fotosintéticos y respiratorios, derivando en un cuello de botella que paralice las rutas metabólicas del nitrógeno y provoque la degradación de los ejemplares. Otro dato a tener en cuenta, es la entrada de los ejemplares en periodo de reproducción ya que, es conocido que bajo situaciones de estrés el alga entra en fase reproductora con el fin de asegurar la continuidad de la especie en el ecosistema. Fotos tomadas con el microscopio, de los ejemplares cultivados, tomadas al final del ensayo, ponen de manifiesto la entrada en ciclos reproductivos en casi la totalidad de los individuos (fig. 10). Otra posible explicación, de la degradación de ejemplares y la pérdida de actividad, es que, durante la recolección de ejemplares se observa la elevada presencia de organismos animales asociados al alga. Éstos fueron eliminados, en su mayor parte, antes de iniciar la fase de cultivo, encontrándose algunos de ellos muertos tras los primeros días de cultivo. La existencia de estos organismos puede jugar un rol principal en la conservación del talo y en el mantenimiento de los procesos biológicos que regulan el funcionamiento de *U. rotundata* a largo plazo (Young et al. 2005).

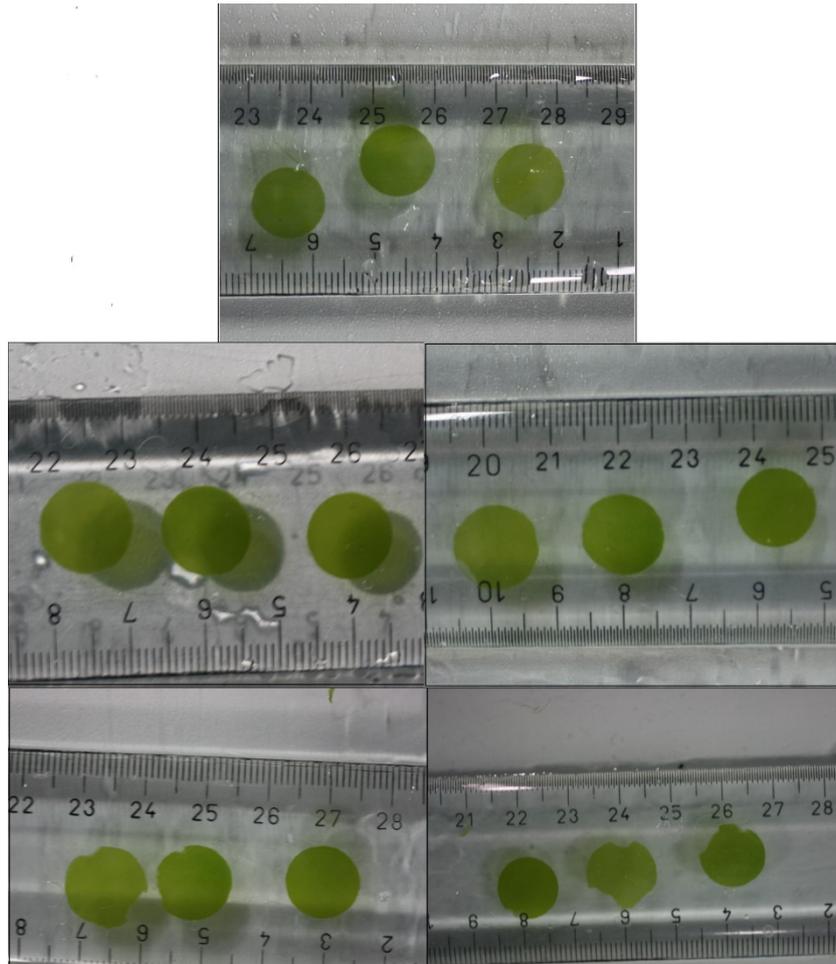


Fig. 9: De arriba abajo y de izquierda a derecha. Secuencia fotográfica en los días impares para los discos cultivados junto a los ejemplares. Se observa una fuerte tasa de degradación que tiene comienzo a partir del día 5 de ensayo.

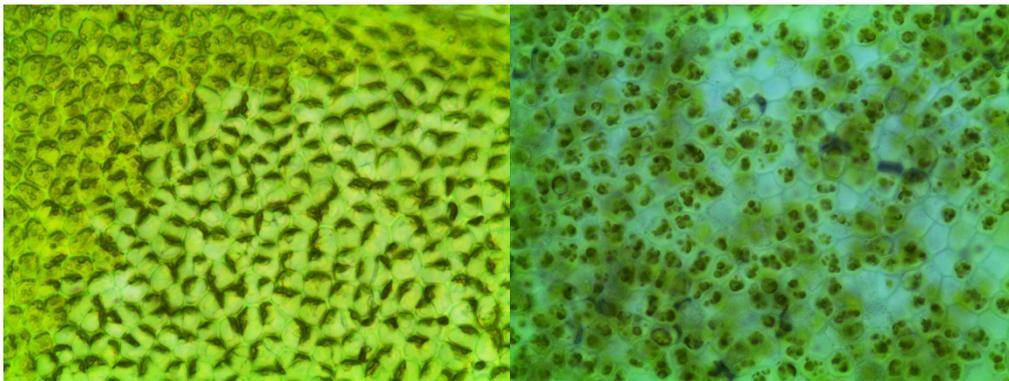


Fig. 10: Fotos microscópicas tomadas al final del periodo de cultivo. Se observan los gametos formados en el interior de las células y la rotura de la membrana para liberarlos al medio.

Los valores registrados (fig. 11) muestran una tendencia clara al crecimiento, aunque menor a lo expuesto por otros autores (Pérez-Mayorga et al., 2011; Ale et al., 2011; Sun et al., 2015). Se concluye que los crecimientos registrados durante los primeros 5 días de ensayo se deben a la incorporación de compuestos nitrogenados en el interior del alga. Sin embargo, y a pesar de que el crecimiento es continuo, pasado el día 5 de ensayo y hasta el final del mismo, pensamos que, este crecimiento se debe a la entrada de los ejemplares en fase reproductiva.

Tal y como se aprecia en la figura 10 se produce un hinchamiento de las células derivada de la presencia de gametos en su interior. Por otro lado, las células vacías y muertas suponen mayor área que las células vivas, lo que podría desvirtuar las medidas de crecimiento obtenidas.

En lo que respecta a la relación existente entre la NR y el crecimiento, los datos de crecimiento parecen secundar la idea de la existencia de una rotura de la ruta metabólica del nitrógeno, los ejemplares sanos crecen de igual forma tanto en concentraciones bajas como altas de nitrato (tasa de crecimiento muy similar), considerando datos de los primeros 5 días de ensayo. Puede ocurrir que independientemente de la concentración de nitrato en el medio el ratio de incorporación de N a los talos sea el mismo para todos los ejemplares, considerándose este valor relativamente bajo, por la ausencia de oligoelementos en el agua de ensayo, y constante. Sin embargo, se observa una diferencia notable, alcanzar este valor límite de concentración de amonio sería más sencillo para ejemplares con alta concentración de nitratos en el agua que para los de baja concentración. La enzima debe trabajar más y durante un mayor intervalo de tiempo en concentraciones bajas de nitrato que en altas concentraciones. Quizás en el intervalo de un día la enzima NR sature de iones nitrito la célula, para elevadas concentraciones de nitrato, para luego reducir su actividad y sintetizar solo lo necesario, mientras que, para bajas concentraciones la incorporación de iones nitrato es más lenta y la enzima necesita estar trabajando continuamente y a mayor velocidad para conseguir las mismas condiciones de saturación. El cálculo de la concentración de nitrógeno en los talos de los ejemplares antes y después del cultivo podría aclarar esta problemática pudiendo comparar la cantidad real de nitrógeno que ha atravesado toda la ruta metabólica para todas las concentraciones estudiadas.

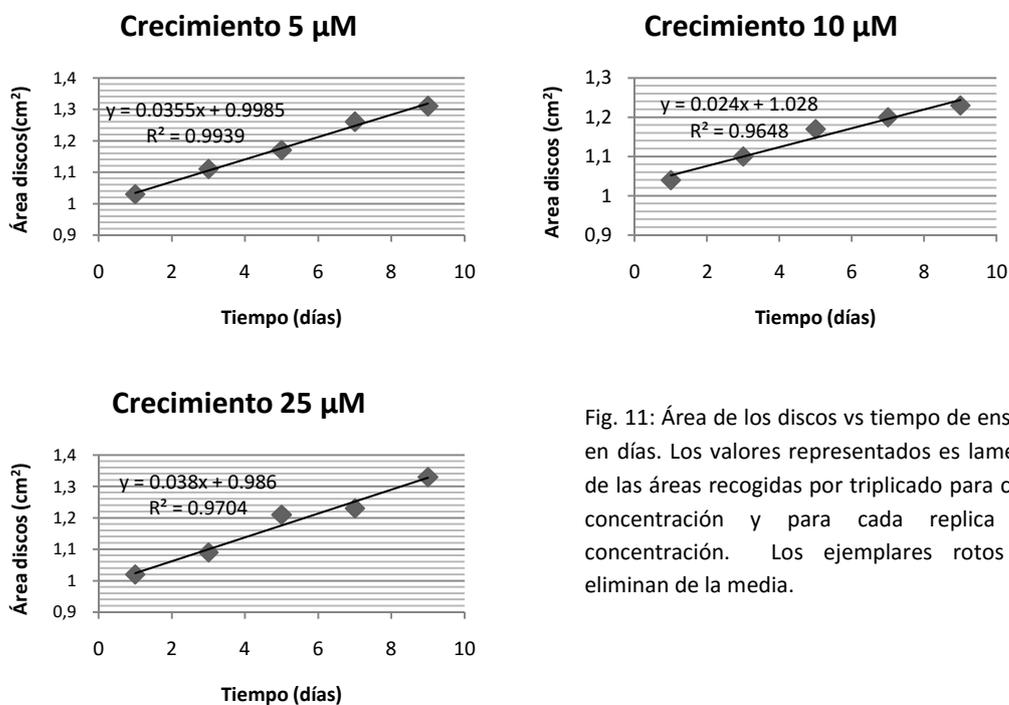


Fig. 11: Área de los discos vs tiempo de ensayo en días. Los valores representados es la media de las áreas recogidas por triplicado para cada concentración y para cada replica de concentración. Los ejemplares rotos se eliminan de la media.

De lo expuesto se concluye que la determinación de la actividad enzimática en ejemplares cultivados, depende de más factores a parte de la concentración de nitrato en el medio de cultivo. El aporte de oligoelementos o el cultivo del alga en el agua de la zona de estudio, previamente analizada y caracterizada, podría esclarecer la interferencia de factores como la presencia de hierro, amonio o nitrito en las lecturas de actividad.

Una variable que queda claramente definida en el proceso es la influencia de la luz a la NR, para todas las concentraciones de nitrato estudiadas, el sometimiento del alga a una fase de oscuridad lleva de la mano una reducción de la actividad enzimática descrita previamente por Packard et al. (1971). Esta inactivación puede ser debida a una falta de energía en forma de NADH derivada de la inhibición de los procesos fotosintéticos.

El comportamiento estacional de la actividad enzimática de los ejemplares recolectados es una característica descrita con anterioridad por otros autores, que se fundamenta en la variación de las concentraciones de los compuestos nitrogenados que enriquecen el medio costero. En función de la concentración de estos compuestos, la actividad del alga se ve acentuada o deprimida (Thompson and Valiela, 1999; Sun K., 2015). En nuestra zona de estudio, las variaciones de actividad observadas parecen ser debidas a la variación de las concentraciones de ión nitrato y amonio en el medio. Uno de los mayores emisarios submarinos de la isla, que vierte aguas residuales, de dudoso tratamiento secundario al medio, desemboca unos cientos de metros más al norte del área estudiada. Teniendo en cuenta que, la corriente predominante en la zona es N-S, la carga de nutrientes de este emisario, que se relaciona con una densidad poblacional bastante elevada, en torno a 100.000 personas, puede estar alcanzando las poblaciones de algas de la zona, siendo éste, en un clima como el canario, donde las diferencias en cuanto a temperatura y luminosidad no parecen variar de forma significativa a lo largo del año, uno de los factores determinantes de las variaciones de actividad observadas. De todo lo anterior, se concluye que la pérdida de actividad, durante los meses de Julio y Agosto, se debe, por un lado, a los periodos vacacionales, donde una parte de la población de la ciudad, la abandona, con la consecuente reducción de aportes de compuestos nitrogenados al medio, derivados de una menor densidad de población potencialmente contaminante. Por otro lado, la mayor incidencia solar durante la época estival provoca el aumento de la temperatura, en el interior de los charcos, en las fases de bajamar, y la fotoinhibición de los pigmentos, pudiendo esto, derivar en una disminución de la actividad enzimática al no encontrarse el alga en condiciones óptimas para el desarrollo de su ciclo vital. Esta explicación parece contradecir lo expuesto a lo largo del ensayo, menores concentraciones de nitrato mayor actividad, no obstante, la gran capacidad de dilución del medio marino y la falta de exactitud, al reproducir las condiciones ambientales en el laboratorio, hacen posible que, por un lado, las concentraciones de los compuestos nitrogenados, que alcanzan el hábitat, sean relativamente bajas, pero significativamente superiores entre si durante los meses de estudio, y no se llegue a inhibir la enzima, pero si existan diferencias significativas de actividad, y que por otro lado, y como se ha descrito, la composición del agua de cultivo y ensayo no se la óptima

En relación al comportamiento de los ejemplares cultivados y ensayados a corto plazo, la composición del agua de la zona de estudio, puede ser clave para entender los resultados obtenidos. En un agua, con fuerte acción antrópica, donde prácticamente no existen industrias agrícolas que, como en otras zonas costeras del planeta provocan aumentos en la concentración de nitratos, el agua de la zona de estudio es un agua residual eminentemente urbana, donde la concentración de amonio y urea se estima bastante elevada. El alga puede estar incorporando este amonio directamente del medio, al llegar la muestra al laboratorio, con las reservas de amonio repletas, no necesita sintetizar nitrito para incorporar nitrógeno, con la consecuente disminución de su actividad enzimática. No obstante, caracterizar correctamente la zona, y depurar posibles afecciones, pasaría por un análisis de la composición y calidad del agua.

6 Conclusiones

En primer lugar, se concluye que el proceso de extracción de la enzima es una etapa clave y compleja durante los ensayos. En lo que respecta a la NR y su alta sensibilidad a los factores externos, controlar y optimizar los procesos de triturado y centrifugado, parece ser más crítico y clave que la composición del tampón de extracción cuyos componentes e influencias están claramente definidos. Se estima de mayor importancia, para la obtención de buenos resultados, la realización de un proceso de extracción correcto y controlado, haciendo uso de nitrógeno líquido desde el momento de la recogida hasta el ensayo, eliminando así, posibles interacciones del alga con el medio de cultivo y transporte. Mientras menos se manipulen los individuos, y menos tiempo se sometan a condiciones diferentes a las del hábitat, se obtendrá una mejor caracterización del proceso enzimático eliminando variables que afectan de forma indirecta a las medidas de actividad.

La optimización de la metodología propuesta pasaría por la separación clara de los procesos que interfieren en la medida de la NR, principalmente consumo de NADH en la cadena respiratoria. En el presente estudio no se ha conseguido separar los procesos respiratorios de la actividad enzimática, por lo que, y a pesar de que nuestra motivación era la reducción de costes económicos y menor duración de los análisis, la evaluación de la actividad enzimática a través de la formación de nitrito parece ser, hasta el momento, una técnica más precisa y fiable que la propuesta.

Si se consigue eliminar la interferencia con la fase respiratoria, el uso de un método cinético, midiendo de forma continua el NADH oxidado es una mejora sustancial de los ensayos “*in vitro*” clásicos. La presente metodología, tras su optimización, añadiendo el uso de nitrógeno líquido, calculando los valores óptimos de pH y temperatura para las constantes cinéticas, y separando claramente los procesos respiratorios y enzimáticos, permite un análisis más profundo de lo que ocurre en el interior del homogeneizado durante el periodo de reacción. La toma continua de valores de absorbancia de NADH abre una nueva posibilidad en lo que respecta a los cambios e inestabilidad de la NR. Esta técnica permitiría eliminar la necesidad de crear medios de cultivo previos al análisis enzimático, ya que, el uso de un espectrofotómetro multicarril permite analizar directamente la influencia de factores como la concentración de iones amonio y nitrito en el interior del homogeneizado. Lo expuesto, sumado a la reducción en los tiempos de ensayo, y en los costos económicos, avala la

posibilidad y la intención de optimizar, aplicar y mejorar la metodología propuesta en la misma y en otras macroalgas del género *Ulva*, así como, en otras especies de macroalgas del intermareal de estuarios y zonas costeras.

7 Bibliografía

Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S. (2011). Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *Journal of Applied Physiology*, 23: 345-351.

Bliding, C. (1968). A critical survey of European taxa in Ulvales, Part II. *Ulva*, *Ulvaria*, *Monostroma*, *Kornmannia*. *Botaniska Notiser* 121: 535-629, 47 figs.

Bricker, S. B., Ferreira, J. G. and Simas, T. (2003). An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status. *Ecological Modelling*, 169(1): 39-60.

Brinkhuis, B. H., Renzhi, L., Chaoyuan, W. and Xun-Sen, J. (1989). Nitrite uptake transients and consequences for in vivo algal nitrate reductase assays. *Journal of Physiology*, 25: 539-545.

Brunetti, A. H. (1976). Observation on pulse methods in NQR. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 9(3): 164.

Cabello-Pasini, A., Macías-Carranza, V., Abdala, R., Korbee, N. and Figueroa, F. L. (2011). Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Physiology*, 23(3): 363-369.

Canvin, D.T. and Woo, K. C. (1979). The regulation of nitrate reduction in spinach leaves. *Canadian Journal of Botany*, 57: 1155-1160.

Chow, F. (2012). *Nitrate Assimilation: The Role of In Vitro Nitrate Reductase Assay as Nutritional Predictor*, Applied Photosynthesis, Dr Mohammad Najafpour (Ed.), InTech.

Chow, F., De Oliveira, M. C. and Pedersén, M. (2004). "in vitro" assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. *Journal of Plant Physiology*, 161(7): 769-776.

Christianson, L., Lepine, C., Tsukuda, S., Saito, K., and Summerfelt, S. (2015). Nitrate removal effectiveness of fluidized sulfur-based autotrophic denitrification biofilters for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 68: 10-18.

Corzo, A., and Niell, F. X. (1991). Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the "in situ" method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 146(2): 181-191.

Davinson, I. R. and Stewart, W. D. P. (1984). Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Longitudinal and transverse profiles of nitrate reductase activity within the thallus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 74: 201-210.

- Dipierro, S., Perrone, C. and Felicini, G.P. (1977). In vivo nitrate reductase assay in *Petroglossum nicaense*(Duby) Schotter (Rhodophyta, Phylloporaceae). *Phycologia*, Vol. 16: 179-182.
- Duarte, C. M. (1995). Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. *Ophelia*, 41(1): 87-112.
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. and Kroneck, P. M. H. (1999). Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature*, 400(6743): 476-480.
- Eppley, R. W., Coatsworth, J. L. and Solórzano, L. (1969). Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 14(2): 194-205.
- Eppley, R. W., Koeller, P. and Wallace Jr., G. T. (1978). Stirring influences the phytoplankton species composition within enclosed columns of coastal sea water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 32(3): 219-239.
- Figueroa, F. L. and Gómez, I. (2001). Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *Journal of Applied Physiology*, 13(3): 235-248.
- Figueroa, F. L., Bonomi Barufi, J., Malta, E. J., Conde-Álvarez, R., Nitschke, U., Arenas, F. and Stengel, D. B. (2014). Short-term effects of increasing CO₂, nitrate and temperature on three mediterranean macroalgae: Biochemical composition. *Aquatic Biology*, 22: 177-193.
- García-Robledo, E., Corzo, A., and Papaspyrou, S. (2014). A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry*, 162: 30-36.
- Gegenheimer, P. (1990). Preparation of extracts from plants. *Methods in Enzymology*, 182: 174-193.
- Gómez-Pinchetti, J. L., Ramazanov, Z., and García-Reina, G. (1992). Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis in the red alga *Soliera filiformis* (Gigartinales: Rhodophyta). *Marine Biology*, 114(2): 335-339.
- Granbom, M., Chow, F., Lopes, P. F., De Oliveira, M. C., Colepicolo, P., De Paula, E. J. and Pedersén, M. (2004). Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany*, 78(4): 295-305.
- Hanisak, M. D. and Lapointe, B. E. (1985). Productivity and nutrition of marine biomass systems in Florida. *Symposium Papers - Energy from Biomass and Wastes*: 111-126.
- Havens, K. E., Hauxwell, J., Tyler, A. C., Thomas, S., McGlathery, K. J., Cebrian, J. and Hwang, S. (2001). Complex interactions between autotrophs in shallow marine and freshwater ecosystems: Implications for community responses to nutrient stress. *Environmental Pollution*, 113(1): 95-107.

- Hochman, A., Nissany, A., Wynne, D., Kaplan, B. and Berman, T. (1986). Nitrate reductase: An improved assay method for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 8(2):385-392.
- Hurd, C. L., Berges, J. A., Osborne, J. and Harrison, P. J. (1995). An "in vitro" nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). *Journal of Physiology*, 31: 835–843.
- Hurd, C. L., Harrison, P. J., Bischof, K. and Lobban, C. S. (2014). *Seaweed ecology and physiology, second edition*. pp. 1-551.
- Jaworski, E. G. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(6): 1274-1279.
- Lartigue, J. and Sherman, T. D. (2002). Field assays for measuring nitrate reductase activity in *enteromorpha sp.* (Chlorophyceae), *Ulva sp.* (Chlorophyceae), and *Gelidium sp.* (Rhodophyceae). *Journal of Physiology*, 38(5): 971-982.
- Lomas, M. W., and Gilbert, P. M. (2000). Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Physiology*, 36(5): 903-913.
- López-Figueroa, F., Jiménez, C., Viñepla, B., Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., Flores-Moya, A. and Häder, D. P. (2002). Effects of solar UV radiation on photosynthesis of the marine *Angiosperm posidonia oceanica* from southern Spain. *Marine Ecology Progress Series*, 230: 59-70.
- Medina, A. and Nicholas, D. J. D. (1957). Interference by reduced pyridine nucleotides in the diazotization of nitrite. *BBA - Biochimica Et Biophysica Acta*, 23(C): 440-442.
- Packard T.T. and D. Blasco (1974) Nitrate reductase activity in upwelling regions 2. Amonia and light dependence. *Tethys*, 6 (1-2): 269-280.
- Packard T.T., Blasco, D., Maclsaac, J.J. and Dugdale, R.C. (1971). Variations of nitrate reductase activity in marine phytoplankton. *Investigaciones pesqueras*, 35: 209-219.
- Parsons, T.R., Maita, Y. and Lalli, C.M. (1984) *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, Oxford.
- Pérez-Mayorga, D. M., Ladah, L. B., Zertuche-González, J. A., Leichter, J. J., Filonov, A. E. and Lavín, M. F. (2011). Nitrogen uptake and growth by the opportunistic macroalga *Ulva lactuca*(*linnaeus*) during the internal tide. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 406(1-2): 108-115.
- Pregall, A. M., Smith, R. D., and Alberte, R. S. (1987). Glutamine synthetase activity and free amino acid pools of eelgrass (*Zostera marina* L.) roots. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 106(3), 211-228.
- Ruiz-Lozano, J. M. and Azcón, R. (1996). Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 60(2-3): 175-181.

Scholl, R.L., Harper, J.E. and Hageman, R.H. (1974). Improvements of nitrite color development in assays of nitrate reductase by phenazinemetosulfate and zinc acetate. *Plant Physiology*, 53: 825-828.

Snell, F. D. and Snell, C.T. (1949). *Colorimetric Methods of Analysis*. 3rd edition, Van Nostrand, Princeton, New Jersey, Vol. 2: 804.

Solomonson, L. P. and Barber, M. J. (1990). Assimilatory Nitrate Reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 225-253.

Solomonson, L. P. and Vennesland, B. (1972). Properties of a nitrate reductase of *Chlorella*. *BBA - Bioenergetics*, 267(3): 544-557.

Sun, K., Li, R., Li, Y., Xin, M., Xiao, J., Wang, Z., and Pang, M. (2015). Responses of *Ulva prolifera* to short-term nutrient enrichment under light and dark conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 163:56-62.

Thomas, T. E. and Harrison, P. J. (1988). A comparison of in vitro and in vivo nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. *Botanica Marina*, 31(2): 101-108.

Thompson, S. M. and Valiela, I. (1999). Effect of nitrogen loading on enzyme activity of macroalgae in estuaries in Waquoit bay. *Botanica Marina*, 42(6): 519-529.

Weidner, M. and Kiefer, H.(1981). Nitrate reduction in the marine brown alga *Giffordia mitchellae*. *PflanzenphysioT.*, 104: 341-351.

Young, E. B., Lavery, P. S., Van Elven, B., Dring, M. J. and Berges, J. A. (2005). Nitrate reductase activity in macroalgae and its vertical distribution in macroalgal epiphytes of seagrasses. *Marine Ecology Progress Series*, 288: 103-114.