

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

VITTORIA DI MARTINO RIGANO, VINCENZA VONA, LUIGI  
MANZO, CATELLO DI MARTINO, CARMELO RIGANO

## Regolazione dell'assorbimento dell'ammonio nell'alga unicellulare *Cyanidium caldarium*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 81 (1987), n.3, p. 305–315.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1987\\_8\\_81\\_3\\_305\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1987_8_81_3_305_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di  
ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le  
copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

*Atti Acc. Lincei Rend. fis.*  
(8), LXXXI (1987), pp. 305-315

**Fisiologia vegetale.** — *Regolazione dell'assorbimento dell'ammonio nell'alga unicellulare Cyanidium caldarium.* Nota di VITTORIA DI MARTINO RIGANO, VINCENZA VONA, LUIGI MANZO, CATELLO DI MARTINO e CARMELO RIGANO, presentata (\*) dal Corrisp. E. MARRÈ.

ABSTRACT. — *Control of ammonium uptake in the unicellular red alga Cyanidium caldarium.* Cells of *Cyanidium caldarium*, a unicellular acidophilic thermophilic non-vacuolate red alga, cultivated in batch under conditions of excess ammonium assimilated ammonium at a rate of 0,32  $\mu\text{mol/h/mg}$  cell dry weight, and assimilation was up to 85% inhibited in darkness. By contrast, cells grown in chemostat under conditions of nitrogen limitation assimilated ammonium at a 3-fold higher rate, and assimilation was only 34% inhibited in darkness.

Assimilation of ammonium was linear with time with all type of cells and under all the conditions tested.

Batch-grown cells submitted to conditions of nitrogen starvation attained, after about 72 h, a 3-fold higher capacity to assimilate ammonium; beside, these N-starved cells, like N-limited chemostat cells, assimilated ammonium also in the dark at a rate which was only 15% lower than in the light. After ammonium addition (and assimilation), the capacity of these cells to take up ammonium costantly decreased in the time during 7 h period of light/dark cycles. However, the loss of capacity was less pronounced in the light and it was almost total in the dark.

It is suggested that these variations in the overall capacity and in the pattern of ammonium assimilation in light and darkness in cells submitted to different nitrogen conditions depend on control phenomena which involve the participation of two distinct uptake systems, or of two glutamine synthetase/glutamate synthase systems, sharing different regulatory properties.

KEY WORDS: Unicellular algae; *Cyanidium caldarium*; ammonium uptake.

RIASSUNTO. — Cellule di *Cyanidium caldarium*, alga rossa unicellulare non vacuolata termofila ed acidofila, cresciute in « batch » su terreno contenente ammonio in eccesso, assimilavano l'ammonio linearmente nel tempo con una velocità di 0,32  $\mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco cellulare. Condizioni di buio o di assenza di  $\text{CO}_2$  provocano una immediata inibizione dell'assorbimento dell'ammonio.

Se cellule cresciute in condizioni di eccesso d'ammonio venivano risospese in un terreno privo d'azoto in condizioni di illuminazione continua e di aerazione con aria arricchita del 5% di  $\text{CO}_2$ , esse dopo 72 ore di affamamento d'azoto mostravano una velocità di assimilazione dell'ammonio 3 volte più alta di quella di partenza, ed acquistavano la capacità di assimilare l'ammonio anche al buio con una velocità però, del 15% più basse rispetto alla luce. Dopo l'aggiunta dell'ammonio la velocità con cui le cellule affamate

(\*) Nella seduta del 24 aprile 1987.

d'azoto assimilavano l'ammonio diminuiva nel tempo ma in maniera diversa alla luce ed al buio. Dopo 5 ore, infatti, esse diventavano totalmente incapaci di assimilare ammonio al buio, mentre presentavano ancora la capacità di assimilare ammonio alla luce, anche se con velocità ridotta.

Viene ipotizzato che le variazioni di attività di assorbimento dell'ammonio riscontrati alla luce ed al buio in cellule sottoposte a differenti condizioni di nutrizione azotata possono essere dovuti a molteplici fenomeni di controllo che agendo a livello di due distinti sistemi di permeasi o di due sistemi GS/GOGAT, sono capaci di modulare l'assimilazione dell'ammonio in funzione sia dello stato azotato interno della cellula che del suo stato carbonioso e delle condizioni di luce e buio.

Nelle alghe unicellulari l'assimilazione dei substrati azotati, quali nitrato ed ammonio, può dipendere dalle condizioni di luce o buio, e dalla disponibilità o meno di una sorgente esogena di carbonio [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Per quanto riguarda il nitrato, ad esempio, in condizioni di crescita autotrofa, l'assorbimento di questo substrato nutritivo è inibito al buio ed in assenza di anidride carbonica. Sono state avanzate ipotesi le quali suggeriscono che l'inibizione possa avvenire a livello di ingresso del nitrato nella cellula [5, 8, 9].

Anche l'assimilazione dell'ammonio è inibita al buio o in assenza di CO<sub>2</sub> [4, 6]; tuttavia, se le cellule sono poste in condizioni di affamamento d'azoto, come osservato in *Chlamydomonas reinhardtii* [4], o, cresciute in chemostato in condizioni d'azoto limitante la crescita, come osservato in *Cyanidium caldarium* [10, 11], l'assimilazione dell'ammonio può avvenire sia alla luce che al buio; in *C. caldarium*, inoltre, sia al buio che alla luce la mancanza di CO<sub>2</sub> non provoca nelle cellule limitate d'azoto una inibizione immediata, ma causa una diminuzione tempo-dipendente della velocità di assimilazione dell'ammonio [10, 11]. Nelle cellule ipernutrite d'azoto, invece, la mancanza di CO<sub>2</sub> o il buio causano una inibizione pressoché totale ed immediata [11].

Questi risultati lasciano supporre che nelle alghe, similmente ad altri organismi [12, 13, 14, 15], esistono dei rigorosi meccanismi di controllo che regolano il processo di assimilazione dell'ammonio in funzione sia dello stato azotato della cellula, che del suo stato generale di nutrizione (carbonioso, ad esempio), che molto probabilmente agiscono a livello di assorbimento.

Ulteriori osservazioni riguardanti questi fenomeni, effettuate con l'alga unicellulare *C. caldarium*, saranno riportate e discusse in quest'articolo.

#### MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati eseguiti con il ceppo 0206 di *Cyanidium caldarium* (Tilden) Geitler, alga unicellulare acidofila e termofila, fornitoci dal Prof. T.D. Brock dell'Università del Wisconsin, che lo ha isolato a partire da acque termali acide (pH 1,5) dello Yellowstone National Park (USA).

L'alga veniva coltivata in laboratorio a pH 1,9 in condizioni di illuminazione continua, di aerazione con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>, ed alla tempe-

ratura di 42 °C, in bottiglie di Roux (coltura in « batch ») con terreno contenente ammonio in eccesso (20 mM), oppure in chemostato in coltura continua con terreno contenente una concentrazione di azoto limitante per la crescita. La velocità di diluizione della coltura continua in chemostato era di 0,25/giorno: la diluizione veniva fatta con terreno contenente una concentrazione di nitrato pari a 2 mM. Per ulteriori dettagli rimandiamo a quanto detto in un precedente articolo [16].

Le cellule, raccolte mediante centrifugazione a bassa velocità, venivano risospese in terreno privo d'azoto aggiustato a pH 1,9 (mediante aggiunta di acido solforico) alla densità di 2-4 mg peso secco di cellule/ml. Il peso secco cellulare veniva calcolato comparando il volume cellulare, ottenuto centrifugando una quantità nota di sospensione di cellule in un tubo ematocrito, contro peso secco su una curva di taratura. Le sospensioni cellulari erano poste a 40 °C alla luce o al buio, come descritto nel testo, e venivano insufflate con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>. Gli esperimenti avevano inizio con l'aggiunta d'ammonio (come solfato d'ammonio).

La velocità di assorbimento era misurata come scomparsa d'ammonio dal mezzo esterno, saggiata in continuo con un elettrodo ad ammoniaca posto in una cameretta di reazione. Una pompa peristaltica a due vie campionava e mandava continuamente nella cameretta di reazione la sospensione cellulare ed una soluzione di NaOH 0,2 M, necessaria, quest'ultima, per trasformare NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in NH<sub>3</sub> misurabile dall'elettrodo. L'elettrodo era connesso ad un analizzatore di ioni (Orion 901) tarato direttamente in valori di concentrazione, collegato a sua volta ad una stampante che registrava i valori di concentrazione dell'ammonio ad ogni minuto. L'apparato completo di misura e registrazione dell'ammonio è stato descritto precedentemente [10].

## RISULTATI

### *Assimilazione dell'ammonio in cellule cresciute in chemostato.*

Cellule di *Cyanidium caldarium*, cresciute in chemostato in condizioni di azoto limitante la crescita, erano raccolte mediante centrifugazione e risospese in un mezzo privo d'azoto alla densità di 2,7 mg peso secco di cellule/ml. Alla sospensione cellulare, termostata a 40 °C (in tubi incamiciati collegati ad un termostato) ed insufflata con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>, veniva immediatamente aggiunto ammonio alla concentrazione finale di 8 mM (tempo zero), e quindi si misurava la scomparsa di tale ione dal mezzo esterno.

Come mostrato nella fig. 1, l'esperimento aveva inizio con un periodo di luce, cui seguiva un periodo di buio ed infine un secondo periodo di luce. Nel primo periodo di luce l'assimilazione dell'ammonio era lineare nel tempo e presentava una velocità di 0.61  $\mu$ moli/ora/mg peso secco di cellule. Anche dopo oscuramento l'assimilazione dell'ammonio era lineare del tempo, ma la sua velocità rispetto alla luce era ridotta, anche se solo del 35%; riportando la so-

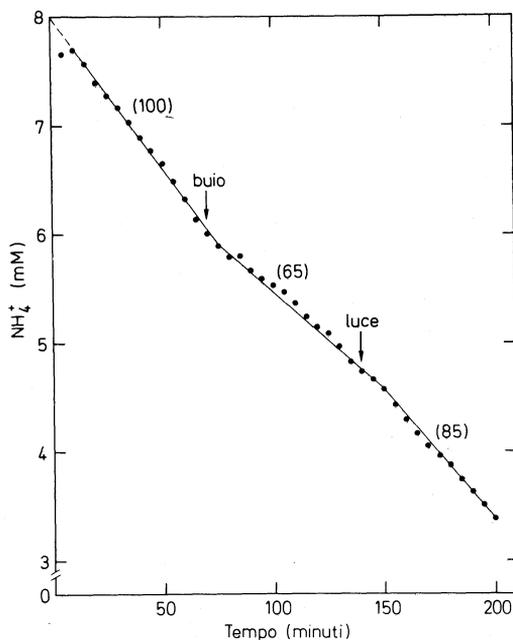


Fig. 1. - Assorbimento di ammonio, in periodi alterni di luce e buio, in una sospensione di *Cyanidium caldarium* preparata con cellule cresciute in chemostato in condizione di azoto limitante. La sospensione, contenente per ml 2,7 mg peso secco di cellule, era posta a 40 °C, alla luce, ed era insufflata con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>. L'esperimento aveva inizio con l'aggiunta di ammonio alla concentrazione finale 8 mM; al tempo indicato dalla prima freccia la sospensione cellulare era trasferita al buio e, successivamente di nuovo alla luce (seconda freccia). La scomparsa dell'ammonio dal mezzo esterno era seguita come indicato in Materiale e Metodi. I numeri in parentesi indicano le percentuali di attività misurate nei vari periodi di luce e di buio, ponendo uguale a 100 il valore di attività iniziale calcolato nel primo periodo di luce. L'attività iniziale era di 0,61 μmoli NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assorbite/ora/mg peso secco di cellule.

sospensione cellulare alla luce, si aveva un incremento della velocità di assorbimento dell'ammonio, che non raggiungeva però il valore iniziale, ma, risultava ora più bassa del 15%.

#### *Assimilazione dell'ammonio in cellule cresciute in « batch ».*

Cellule cresciute in « batch » in terreno contenente un'elevata concentrazione d'ammonio, erano raccolte, lavate e risospese in un mezzo privo d'azoto, come descritto sopra. La sospensione di cellule, contenente 3,5 mg peso secco di cellule/ml, veniva divisa in due parti che erano poste alla luce, insufflate con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>, e termostatate a 40 °C. Delle due parti, una veniva lasciata in queste condizioni per alcuni giorni; l'altra, invece, rifornita d'ammonio alla concentrazione finale di 5 mM, veniva subito saggiata per la scomparsa di questo ione.

Come mostrato in fig. 2, l'assimilazione dell'ammonio durante un primo periodo di luce avveniva in maniera lineare nel tempo e ad una velocità pari a

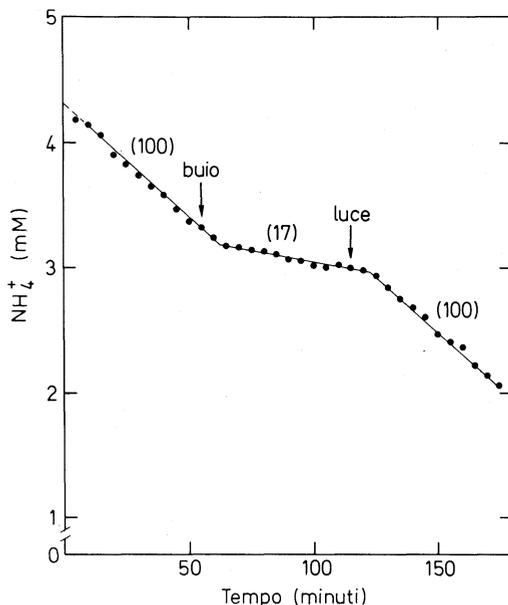


Fig. 2. - Assorbimento di ammonio in periodi alterni di luce e buio in una sospensione di *Cyanidium caldarium* preparata con cellule cresciute in « batch » in terreni contenenti ammonio in eccesso (20 mM). La sospensione conteneva 3,5 mg di peso secco di cellule/ml. Il procedimento sperimentale era come descritto nella fig. 1. L'attività iniziale era di 0,32  $\mu\text{moli NH}_4^+$  assorbite/ora/mg peso secco di cellule.

0,32  $\mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco di cellule. Dopo oscuramento si aveva immediatamente una quasi totale inibizione dell'assorbimento dell'ammonio che avveniva ora ad una velocità pari al 15% di quella iniziale. Se la sospensione cellulare veniva nuovamente illuminata, la velocità di assorbimento dell'ammonio subiva un incremento, raggiungendo un valore pari a quello iniziale.

#### *Assimilazione dell'ammonio in cellule sottoposte a carenza d'azoto.*

Come detto sopra, cellule di *C. caldarium* cresciute in condizioni d'eccesso d'azoto, risospese in un mezzo senza azoto, venivano incubate per alcuni giorni a 40 °C, in condizioni di illuminazione continua e di aerazione con aria arricchita del 5% di CO<sub>2</sub>.

Un'aliquota di queste cellule, prelevata dopo 24 ore di incubazione, mostrava in un primo periodo di luce una velocità di assimilazione dell'ammonio pari a 0,73  $\mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco di cellule (velocità iniziale), e dopo oscuramento mostrava, invece, una velocità di 0,27  $\mu\text{moli/ora}$ , che corrispondeva al 37% della velocità iniziale misurata alla luce (fig. 3). Dopo un nuovo trasferimento alla luce, la velocità di assimilazione dell'ammonio aumentava raggiungendo il 66% di quella iniziale, mentre un ulteriore trasferimento al buio causava una inibizione del 100%. Se a questo punto le cellule erano trasferite alla luce, si osservava una ripresa dell'attività di assimilazione dell'ammonio pari al 50% del valore iniziale.

La rimanente aliquota della sospensione cellulare posta in carenza d'azoto veniva saggiata per la capacità di assimilare l'ammonio, dopo 48 ore, alternando periodi di luce e di buio, per la durata di 7 ore.

Come mostrato nella fig. 4, la velocità iniziale dell'assimilazione dell'ammonio, misurata alla luce, era pari a  $0,96 \mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco di cellule,

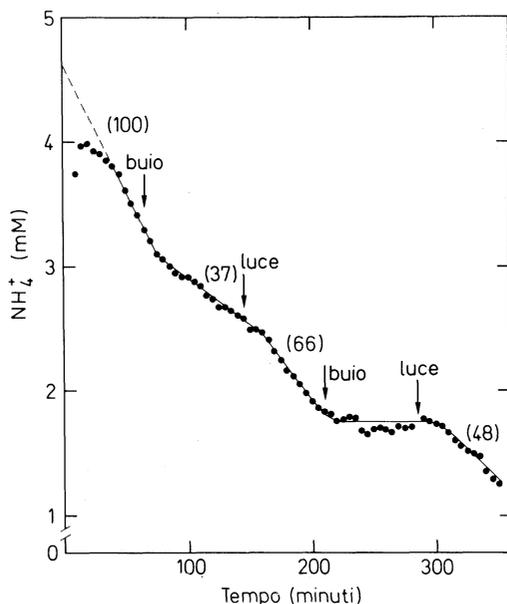


Fig. 3. - Assorbimento di ammonio durante periodi alterni di luce e buio in cellule di *Cyanidium caldarium* cresciute in « batch » in condizioni di eccesso di ammonio (20 mM) e sottoposte a carenza d'azoto per 24 ore. Il procedimento sperimentale era come riportato in fig. 1. L'attività iniziale era di  $0,73 \mu\text{moli NH}_4^+$  assorbite/ora/mg peso secco di cellule.

e quindi di 1.3 volte più alta rispetto alla velocità misurata nelle cellule prelevate il giorno prima, e di ben 3 volte più alta di quella delle cellule di partenza. Dopo trasferimento al buio, l'assimilazione era sempre lineare nel tempo, ma la sua velocità si abbassava al 64% di quella iniziale, per risalire all'80% se le cellule venivano nuovamente illuminate. In un periodo di buio seguente, la velocità di assimilazione dell'ammonio si abbassava al 40% della velocità iniziale e si riportava al 65% durante un successivo periodo di illuminazione. Durante un ulteriore periodo di oscuramento, infine, la velocità si abbassava ad appena il 10% di quella iniziale, per riportarsi al 50% dopo illuminazione.

Da un confronto fra le figg. 2, 3 e 4 si nota come nelle cellule ipernutrite e poste in carenza di azoto, si abbia sia un incremento tempo dipendente delle attività iniziali di assorbimento dell'ammonio, sia l'acquisto della capacità di assimilare l' $\text{NH}_4^+$  anche al buio, che era quasi inesistente nelle cellule di partenza.

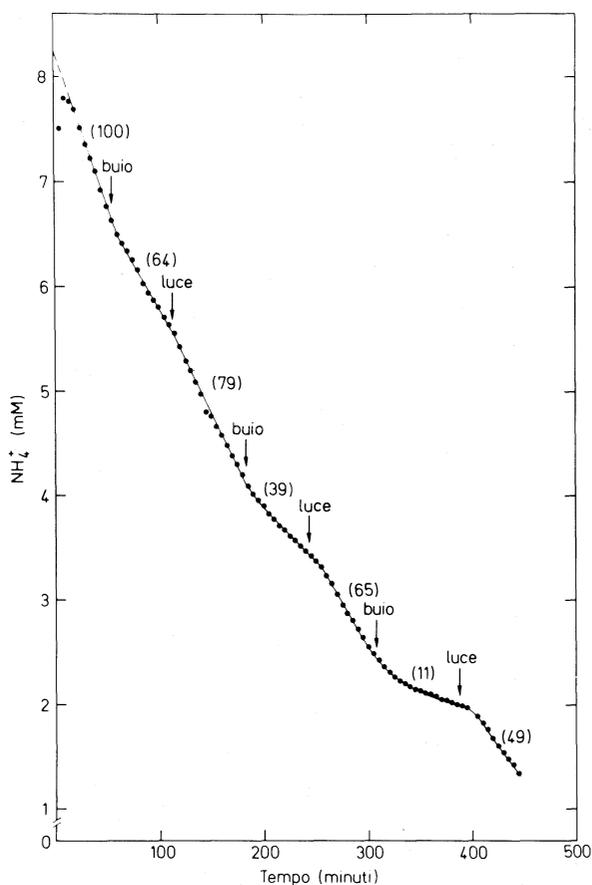


Fig. 4. - Assorbimento di ammonio durante periodi alterni di luce e buio in cellule di *Cyanidium caldarium* cresciute in « batch » in terreno contenente ammonio in eccesso (20 mM), e sottoposte a carenza d'azoto per 48 ore. Il procedimento sperimentale era come riportato in fig. 1. L'attività iniziale era di  $0,96 \mu\text{moli NH}_4^+$  assorbite/ora/mg peso secco di cellule.

#### DISCUSSIONI

Le cellule di *Cyanidium caldarium* cresciute in chemostato in condizioni di azoto limitante la crescita, come è stato notato anche precedentemente [10, 11], hanno la capacità di assimilare l'ammonio con maggiore velocità rispetto alle cellule cresciute in « batch » in condizioni di eccesso d'azoto. Le cellule cresciute in chemostato hanno, inoltre, la capacità di assimilare l'ammonio sia alla luce che al buio (anche se al buio la velocità è di poco più bassa), mentre le cellule cresciute in « batch » assimilano l'ammonio soltanto alla luce e risultano inibite per l'85% al buio.

Se le cellule di *C. caldarium* cresciute in eccesso d'azoto vengono poste in condizioni di carenza d'azoto, esse presentano, gradualmente nel tempo, un incremento della capacità di assimilare l'ammonio che dopo 72 ore raggiunge

una velocità 3 volte più alta delle cellule di partenza. Questo è un fenomeno generale osservato anche in altre alghe [4, 16, 17], nei batteri [15] e nella pianta acquatica *Lemna* [18]. Quello che è interessante notare, però, è che in *Cyanidium* queste cellule affamate hanno la capacità di assimilare l'ammonio anche al buio (le cellule di partenza erano, invece, inibite al buio) ad una velocità che è di appena il 15% più bassa rispetto alla luce. L'affamamento d'azoto, quindi, tende a portare le cellule ipernutrite d'azoto nello stesso stato di funzionalità delle cellule cresciute in chemostato in condizioni di azoto limitante.

Il processo globale di assimilazione dell'ammonio coinvolge la partecipazione di un sistema di permeasi [12, 13, 14] e del sistema glutammina sintetasi/glutammato sintasi [19] per l'incorporazione dell'ammonio in composti organici. Il fatto che in *C. caldarium* l'assimilazione dell'ammonio possa avvenire al buio (anche se solo nelle cellule affamate) suggerisce che questo processo non necessariamente dipende dalla fotosintesi. Pertanto la dipendenza dalla luce dell'assimilazione dell'ammonio nelle cellule ipernutrite d'azoto non sembra necessariamente indicare una impossibilità di generare al buio l'ATP e gli scheletri di carbonio necessari per l'incorporazione dell'ammonio.

Come detto sopra, le cellule affamate presentano una velocità di assorbimento dell'ammonio di ben 3 volte maggiore di quella delle cellule, ipernutrite di partenza, ed il loro trasferimento dalla luce al buio inibisce solo parzialmente (36%) il processo di assorbimento. Dopo 7 ore, però, dall'aggiunta dell'ammonio (durante le quali le cellule venivano sottoposte a 3 periodi di luce alterni a 3 periodi di buio), l'assimilazione dell'ammonio, che gradualmente è andata riducendosi, avviene alla luce ancora con una velocità pari al 50% di quella iniziale, mentre al buio avviene con una velocità pari al 10%, con una inibizione, quindi, fra luce e buio pari all'80%. L'incapacità acquisita nel tempo da tali cellule sottoposte ad un regime di ipernutrizione azotata di assimilare l'ammonio al buio non può essere attribuita ad un esaurimento delle riserve carboniose interne, che, di sicuro, sono largamente rigenerate nei periodi di luce, e, quindi, come suggerito sopra, l'inibizione dell'assimilazione dell'ammonio al buio non può dipendere da una mancanza dei relativi scheletri di carbonio.

L'andamento nel tempo delle variazioni di velocità dell'assorbimento dell'ammonio nelle cellule ipernutrite d'azoto sottoposte ad affamamento prima, e ad ipernutrizione dopo, richiede un'ulteriore analisi. Le cellule ipernutrite assimilano l'ammonio con una velocità di  $0,35 \mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco di cellule, e vengono inibite non appena poste al buio. In tali cellule, quindi, quasi tutta l'attività è dipendente da luce ma, dopo 72 ore di affamamento, esse assimilano l'ammonio con una velocità pari a  $0,96 \mu\text{moli/ora/mg}$  peso secco di cellule alla luce, e con una velocità di  $0,61 \mu\text{moli/ora}$  al buio, con un tasso di inibizione al buio, quindi, di appena il 36%. Nelle cellule poste in carenza d'azoto, perciò, la differenza di velocità di assimilazione fra luce e buio, che rappresenta la frazione di attività dipendente da luce, è pari a  $0,37 \mu\text{moli/ora}$ . Se si considera che tale valore corrisponde al valore della velocità con cui le cellule ipernutrite assimilavano l'ammonio esclusivamente alla luce prima di essere sottoposte ad affamamento, se ne deduce che la carenza d'azoto determina un aumento nel tempo

(confrontare le figg. 2, 3, 4) soltanto dell'attività non dipendente da luce, mentre lascia invariata l'attività dipendente da luce.

Le cellule affamate sottoposte, a loro volta, ad ipernutrizione d'ammonio ed a periodi alterni di luce e buio per un periodo di 7 ore, passano gradualmente da una velocità iniziale di assimilazione dell'ammonio pari a  $0,91 \mu\text{moli/ora mg}$  peso secco di cellule alla luce, e di  $0,61$  al buio (inibizione del 36%), ad una velocità di  $0,50 \mu\text{moli/ora}$  alla luce, e di  $0,11$  al buio (inibizione dell'80%), con un'attività, quindi, dipendente da luce pari a  $0,39 \mu\text{moli/ora}$ , ripristinando le condizioni delle cellule ipernutrite di partenza (cresciute in batch). Cellule affamate d'azoto, perciò, sottoposte ad ipernutrizione d'ammonio, subiscono nel tempo una perdita di capacità di assimilare l'ammonio che interessa esclusivamente l'attività non dipendente da luce, e che, apparentemente, non interessa l'attività dipendente da luce.

I fenomeni osservati sopra hanno significato di meccanismo di controllo, e, per spiegare come questi funzionano si possono fare più ipotesi. Si potrebbe postulare, ad esempio, che nelle cellule ipernutrite la luce rappresenti uno stimolo necessario perché composti carboniosi fluiscano verso la via metabolica dell'assimilazione dell'ammonio, stimolo che apparentemente diventa gradualmente non necessario nelle cellule sottoposte ad affamamento.

Questa ipotesi, però, sarebbe valida nel caso che l'inibizione al buio nelle cellule ipernutrite fosse quasi totale (come, in effetti, si verifica), e che fosse completamente assente nelle cellule affamate (che, invece, non si verifica). Né tale ipotesi può spiegare come mai nei due tipi di cellule siano presenti valori quasi uguali di attività dipendente da luce, e non variabili nel tempo al variare delle condizioni di nutrizione azotata, né perché, invece, siano variabili nel tempo soltanto i valori dell'attività non dipendente da luce. Tali variazioni nel tempo dell'attività non dipendente da luce, inoltre, sono troppo lente perché si possa pensare ad uno stimolo positivo da luce (o negativo da buio) su sistemi preesistenti; il loro andamento, invece, indica chiaramente un coinvolgimento di processi di sintesi e degradazione di proteine. Ad uno stimolo positivo da luce (o negativo da buio) su un sistema preesistente si può invece pensare per quanto concerne le variazioni di attività che si osservano nel passare dalla luce al buio e viceversa che, in questo caso, sono quasi immediate.

Un'altra ipotesi, invece, più plausibile, è che *C. caldarium* posseda un sistema di permeasi per l'ammonio costitutivo e munito di attività strettamente dipendente da luce, ed un sistema induttivo non dipendente da luce. La ipotetica presenza del primo sistema sia nelle cellule ipernutrite d'azoto che nelle cellule affamate, renderebbe conto del fatto che i valori di attività dipendente da luce sono uguali nei due tipi di cellule, e non soggette a variazioni apprezzabili nel tempo al mutare della nutrizione azotata. Il secondo sistema, invece, che potrebbe essere reprimibile da ammonio e dereprimibile da condizioni di carenza d'azoto, formandosi esclusivamente nelle cellule limitate o affamate d'azoto e venendo degradato in seguito all'aggiunta di ammonio a tali cellule, sarebbe responsabile delle variazioni di attività nel tempo osservate al mutare delle condizioni azotate della cellula. Tale ipotesi è suffragata dal fatto che si-

stemi di permeasi induttivi sono stati trovati nelle alghe [16, 17], nei batteri [15] e in Lemna [18].

Si potrebbe ipotizzare pure che *C. caldarium* possenga due sistemi glutamina sintetasi/glutammato sintasi (GS/GOGAT), uno, induttivo, a localizzazione citoplasmatica e derepresso soltanto in cellule affamate o limitate d'ammonio, ed un altro, costitutivo, a localizzazione cloroplastica. Il primo sistema potrebbe essere tale da rendere la cellula capace di assimilare l'ammonio al buio a spese delle riserve di carbonio, mentre il secondo la renderebbe capace di assimilare l'ammonio soltanto alla luce utilizzando i prodotti della fotosintesi. Questa ipotesi si basa sul fatto che in *Chlamydomonas* è stata messa in evidenza la presenza di un sistema GS/Fd-GOGAT a localizzazione cloroplastica, responsabile di un'assimilazione dell'ammonio dipendente dalla fotosintesi, e di un sistema GS/NADH-GOGAT, a localizzazione citoplasmatica, responsabile di un'assimilazione al buio [20].

La presenza di due sistemi di permeasi, o di due sistemi GS/GOGAT, muniti di differenti proprietà di regolazione, può in effetti rappresentare un eccellente mezzo di controllo e modulazione dell'assimilazione dell'ammonio in funzione delle condizioni globali di nutrizione delle cellule. In condizioni di affamamento o di limitazione d'azoto, infatti, la derepressione di un sistema indipendente dalla fotosintesi, e capace di assimilare l'ammonio a spese delle riserve carboniose interne, consente alla cellula di assorbire ad ogni istante, ed a prescindere dalle condizioni di luce o di buio, ogni eventuale traccia d'ammonio che si renda disponibile nel mezzo esterno. La cellula, in condizioni di un ottimale stato azotato interno, è in grado, attraverso il controllo della sintesi proteica, di non sviluppare questo sistema; essa, inoltre, se già lo possiede, è in grado di degradarlo. Nel caso, invece, delle cellule ipernutrite d'azoto dove il sistema induttivo è represso, potrà essere operante soltanto il sistema costitutivo. Essendo però tale sistema dipendente da luce e, come detto in un precedente articolo [11], da CO<sub>2</sub>, l'assimilazione dell'ammonio potrà avvenire soltanto quando tutti i fattori nutritivi necessari per la crescita sono largamente disponibili.

#### Ringraziamenti.

Gli Autori ringraziano il Prof. T.D. Brock per aver gentilmente fornito il ceppo di *C. caldarium* utilizzato per questo lavoro.

Questo lavoro è stato eseguito con finanziamenti del Ministero della Pubblica Istruzione e del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] P.J. SYRETT e I. MORRIS (1963) - *The inhibition of nitrate assimilation by ammonia in Chlorella*, « Biochim. Biophys. Acta », 67, 566-575.
- [2] B.R. GRANT (1968) - *The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation by Dunaliella tertiolecta*, « J. Gen. Microbiol. », 54, 327-336.

- [3] B.R. GRANT e I.M. TURNER (1969) - *Light stimulated nitrate and nitrite assimilation in several species of algae*, « Comp. Biochem. Physiol. », 29, 995-1004.
- [4] A. THACKER e P.J. SYRETT (1972) - *The assimilation of nitrate and ammonium by Chlamydomonas reinhardii*, « New Phytol. », 71, 423-433.
- [5] E. FLORES e M.G. GUERRERO (1980) - *Properties of nitrate utilization in Anacystis nidulans attributable to a nitrate transport system*, in « Book of abstracts of II Congress FESPP Sociedad Espanola de Fisiologia Vegetal, Santiago de Compostela », p. 345.
- [6] J.V. CULLIMORE e A.P. SIMS (1981) - *Pathway of ammonia assimilation in illuminated and darkened Chlamydomonas reinhardii*, « Phytochemistry », 20, 933-940.
- [7] F.J. FLORENCIO e J.M. VEGA (1983) - *Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by Chlamydomonas reinhardii. Photoproduction of ammonium*, « Planta », 158, 288-293.
- [8] V. DI MARTINO RIGANO, A. MARTELLO, C. DI MARTINO e C. RIGANO (1985) - *Effect of CO<sub>2</sub> and phosphate deprivation on the control of nitrate, nitrite and ammonium metabolism in Chlorella*, « Physiol. Plant. », 63, 241-246.
- [9] R. EISELE e W.R. ULLRICH (1977) - *Effect of glucose and CO<sub>2</sub> on nitrate uptake and coupled OH<sup>-</sup> flux in Ankistrodesmus braunii*, « Plant. Physiol. », 59, 18-21.
- [10] V. DI MARTINO RIGANO, V. VONA, C. DI MARTINO e C. RIGANO (1986) - *Effect of darkness and CO<sub>2</sub> starvation on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation in the unicellular alga Cyanidium caldarium*, « Physiol. Plant. », 68, 34-38.
- [11] V. DI MARTINO RIGANO, V. VONA, C. DI MARTINO e C. RIGANO (1987) - *Regulatory aspects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> utilization in the acidophilic thermophilic unicellular red alga Cyanidium caldarium*, « New Phytol. », 105, in press.
- [12] D. KLEINER (1981) - *The transport of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> across biological membranes*, « Biochim. Biophys. Acta », 639, 41-52.
- [13] S. BOUSSIBA, C.M. RESCH e J. GIBSON (1984) - *Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria*, « Arch. Microbiol. », 138, 287-292.
- [14] A.N. RAI, P. POWELL e W.D.P. STEWART (1984) - *Evidence for an ammonium transport system in free-living and symbiotic cyanobacteria*, « Arch. Microbiol. », 137, 241-246.
- [15] A. JAYAKUMAR, I. SCHULMAN, D. MACNEIL e E.M. BARNES Jr. (1986) - *Role of the Escherichia coli glnALG operon in the regulation of ammonium transport*, « J. Bacteriol. », 166, 281-284.
- [16] P.J. SYRETT, K.J. FLYNN, C.J. MOLLOY, G.K. DIXON, A.M. PEPLINSKA e R.C. CRESSWELL (1986) - *Effects of nitrogen deprivation on rates of uptake of nitrogenous compounds by the diatom Phaeodactylum tricornutum Bohlin*, « New Phytol. », 102, 39-44.
- [17] J. SCHLEE e E. KOMOR (1986) - *Ammonium uptake by Chlorella*, « Planta », 168, 232-238.
- [18] W.R. ULLRICH, M. LARSSON, C.M. LARSSON, S. LESCH e A. NOVACKY (1984) - *Ammonium uptake in Lemna gibba G 1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake*, « Physiol. Plant. », 61, 369-376.
- [19] B.J. MIFLIN e P.J. LEA (1976) - *The path of ammonia assimilation in the plant kingdom*, « Trends Biochem. Sci. », 1, 103-106.
- [20] J.M. VEGA (1986) - *Enzymology of the assimilation of ammonium in the green alga Chlamydomonas reinhardii. Advanced course on inorganic nitrogen metabolism. Book of abstracts*, p. 89, Jarandilla de La Vera, Spagna.