
ÍNDICE GENERAL

1-. INTRODUCCIÓN	1
1.1-. Clasificación de los seres vivos	1
1.1.1-. Dominio <i>Archaea</i>	3
1.1.2-. Halófilos	5
1.1.3-. <i>Haloferax mediterranei</i>	9
1.2-. Ciclo del nitrógeno. Reducción asimilativa del nitrógeno	10
1.2.1-. Entrada de nitrato, nitrito y amonio extracelulares	12
1.2.2-. Reducción del nitrato a amonio	15
1.2.3-. Asimilación de amonio	20
1.3-. Regulación de los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasas (Nas y NiR)	21
2-. OBJETIVOS	24
3-. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1-. Microorganismo	25
3.2-. Regulación de los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasas asimilativas (Nas y NiR).....	25
3.2.1-. Condiciones de cultivo	25
3.2.2-. Obtención de extractos enzimáticos.....	27
3.2.3-. Ensayos enzimáticos.....	28
3.2.3.a. <i>Ensayo de la actividad Nas (MV-Nas)</i>	28
3.2.3.b. <i>Ensayo de la actividad NiR (MV-NiR)</i>	28
3.2.4-. Cuantificación de la concentración de proteína de los extractos enzimáticos y de las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio presentes en el medio de cultivo	29
3.2.5-. Extracción de bacterioruberinas	30
3.2.6-. Cuantificación de ácidos orgánicos excretados al medio de cultivo	30
3.3-. Purificación y caracterización de nitrato y nitrito reductasas asimilativas y ferredoxina.....	31
3.3.1-. Condiciones de cultivo	31
3.3.2-. Obtención de extractos enzimáticos.....	31
3.3.3-. Purificación de las enzimas y de ferredoxina.	32
3.3.3.a. <i>Purificación de Nitrato Reductasa asimilativa</i> ...	32

3.3.3.b. Purificación de Nitrito Reductasa asimilativa....	33
3.3.3.c. Obtención de ferredoxina	33
3.3.4-. Ensayos enzimáticos.....	33
3.3.4.a. Ensayo de la actividad Nas (MV-Nas)	33
3.3.4.b. Ensayo de la actividad NiR (MV-NiR)	34
3.3.4.c. Ensayo de la actividad Nas (Fd-Nas)	34
3.3.4.d. Ensayo de la actividad NiR (Fd-NiR)	34
3.3.5-. Determinación de la masa molecular relativa	34
3.3.6-. Electroforesis	35
3.4-. Productos y reactivos.....	35

4-. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y NIVELES DE ACTIVIDAD

Nas Y NiR ASIMILATIVAS DE *Haloferax mediterranei*:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1-. Efecto del pH sobre los medios de cultivo.....	37
4.2-. Crecimiento y niveles de actividad Nas y NiR asimilativa en medios de cultivo con diferentes concentraciones de nitrato	43
4.2.1-. Crecimiento y actividades en medios con 100 mM nitrato	43
4.2.2-. Crecimiento y actividades en medios con concentraciones de nitrato inferiores a 100 mM	46
4.3-. Crecimiento y niveles de actividad Nas y NiR asimilativas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de nitrito	48
4.4-. Inducción de las actividades MV-Nas y MV-NiR en función de la fuente de nitrógeno	51
4.5-. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Ausencia de nitrógeno	53
4.5.1-. Transferencia de células a medios de cultivo con una fuente de nitrógeno	53
4.5.2-. Transferencia de células a medios de cultivo con dos fuentes de nitrógeno.....	58
4.6-. Reabsorción de nitrito provocada por la adición de amonio a células crecidas en medios de cultivo con nitrato	61
4.7-. Efecto del MSX en las actividades enzimáticas ...	65
4.8-. Efecto del cloranfenicol	67

4.9-. Efecto de la rifampicina.....	69
4.10-. Efecto del wolframio en el crecimiento celular y en la actividad Nas.....	71
4.11-. Modificación en la síntesis de bacterioruberinas en función del pH del medio de cultivo. Efecto de la fuente de nitrógeno	73
Conclusiones de los estudios de regulación	82

5-. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Nas y NiR

ASIMILATIVAS: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
5.1-. Purificación de Nas y NiR asimilativas.....	84
5.1.1-. Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativas durante el desarrollo del cultivo (medio mínimo 100 mM KNO ₃).....	84
5.1.2-. Purificación de nitrato reductasa asimilativa (Nas)	86
5.1.3-. Purificación de nitrito reductasa asimilativa (NiR)	91
5.2-. Caracterización de las enzimas.....	95
5.2.1-. Efecto del ditionito sódico (DT) en la determinación colorimétrica del nitrito	95
5.2.2-. Caracterización de Nas	96
5.2.2.a. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas.....	97
5.2.2.b. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas	98
5.2.2.c. Efecto del pH sobre la actividad Nas.....	99
5.2.2.d. Efecto de la temperatura y la concentración de sal sobre la actividad Nas.....	101
5.2.2.e. Energías de activación para la actividad Nas....	103
5.2.2.f. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.....	104
5.2.2.g. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad Nas.....	105
5.2.2.h. Valores de K_m para el MV, nitrato y ferredoxina	107
5.2.2.i. Espectro de absorción UV-visible de la Nas de <i>Haloferax mediterranei</i>	109
5.2.2.j. Cuantificación del molibdeno presente en la Nas de <i>Haloferax mediterranei</i>	111

5.2.3-. Caracterización de NiR asimilativa	114
5.2.3.a. Determinación del producto de reacción de la NiR asimilativa	114
5.2.3.b. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa	115
5.2.3.c. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR asimilativa.....	115
5.2.3.d. Efecto del pH sobre la actividad NiR asimilativa	116
5.2.3.e. Efecto de la temperatura y la concentración de sal sobre la actividad NiR asimilativa	119
5.2.3.f. Energías de activación para la actividad NiR asimilativa.....	120
5.2.3.g. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.....	121
5.2.3.h. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad NiR asimilativa	122
5.2.3.i. Valores de K_m para el MV, nitrito y ferredoxina	124
5.2.3.j. Espectro de absorción de la NiR asimilativa de <i>Haloferax mediterranei</i>	127
Conclusiones de los estudios de purificación y caracterización de Nas y NiR asimilativas	129
6-. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FERREDOXINA EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
6.1-. Obtención de ferredoxina (Fd)	130
6.2-. Espectro de absorción de la ferredoxina de <i>Haloferax mediterranei</i>	132
6.3-. Espectro de RMN de la ferredoxina de <i>Haloferax mediterranei</i>	133
6.4-. Ensayos de actividad MV-DT-Fd-Nas yMV-DT-Fd-NiR	136
6.5-. Función de la ferredoxina de <i>Haloferax mediterranei</i> en la reducción asimilativa del nitrógeno	137
Conclusiones de los estudios de purificación y caracterización de la ferredoxina	138
7-. CONCLUSIONES GENERALES	139

8-. BIBLIOGRAFÍA	140
9-. APÉNDICE DE TABLAS.....	158

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Árbol filogenético universal	2
Figura 1.2. Evolución del dominio <i>Archaea</i>	4
Figura 1.3. Fotografía de las Salinas de Santa Pola, Alicante.	5
Figura 1.4. Fotografía de <i>Haloferax mediterranei</i>	8
Figura 1.5. Ciclo biológico del nitrógeno	11
Figura 1.6. Reducción asimilativa del nitrógeno	12
Figura 1.7. Estructura de las nitrato reductasas	16
Figura 1.8. Elementos implicados en la reducción asimilativa del nitrógeno	18
Figura 4.1. Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativas durante el desarrollo del cultivo	44
Figura 4.2. Excreción de nitrito al medio de cultivo	44
Figura 4.3. Posible relación entre la actividad NiR y las [NO ₂ ⁻] intra y extracelulares	45
Figura 4.4. Medios de cultivo con concentraciones de NO ₃ ⁻ inferiores a 100 mM.....	46
Figura 4.5. Consumo de NO ₃ ⁻ en medios de cultivo con una concentración inicial inferior a 100 mM	47
Figura 4.6. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de NO ₂ ⁻	48
Figura 4.7. Inducción de las actividades MV-Nas y MV-NiR asimilativas	51
Figura 4.8. Influencia del cambio de la fuente de nitrógeno (NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ o ausencia de nitrógeno)	54
Figura 4.9. Influencia del cambio de la fuente de nitrógeno (NO ₂ ⁻)	56
Figura 4.10. Recuperación de las actividades Nas y NiR asimilativas	57
Figura 4.11. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno (2 fuentes de nitrógeno).....	59
Figura 4.12. Efecto de la adición de 5 mM de sulfato amónico en un medio mínimo con 100 mM NO ₃ ⁻	61
Figura 4.13. Efecto de la adición de 5 mM sulfato amónico o 5 mM acetato amónico en medios mínimos con 5 mMNO ₃ ⁻	63
Figura 4.14. Transferencia de células crecidas en 100 mM NO ₃ ⁻ a medio mínimo con 5 mM NH ₄ ⁺	64
Figura 4.15. Efecto del MSX sobre el crecimiento y las	

actividades enzimáticas.....	65
Figura 4.16. Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas.....	68
Figura 4.17. Efecto de la rifampicina sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas.....	70
Figura 4.18. Efecto del wolframio y el molibdeno sobre el crecimiento y la actividad Nas	72
Figura 4.19. Fotografía de los medios de cultivo de <i>Haloferax mediterranei</i>	73
Figura 4.20. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (NO ₃ ⁻ , medio mínimo).....	76
Figura 4.21. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (NO ₂ ⁻ , medio mínimo).....	77
Figura 4.22. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (acetato amónico y sulfato amónico, medio mínimo)	78
Figura 4.23. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (medios mínimos con dos fuentes de nitrógeno)	79
Figura 4.24. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (medios máximos con acetato amónico)80	
Figura 4.25. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de <i>Haloferax mediterranei</i> en fase estacionaria (medios máximos a diferente pH)	81
Figura 5.1. Cromatograma de Sepharosa-4B.....	86
Figura 5.2. Cromatograma de DEAE-celulosa (Nas)	87
Figura 5.3. Cromatograma de Sephacryl S-300 (Nas)	88
Figura 5.4. SDS-PAGE (Nas)	90
Figura 5.5. Cromatograma de DEAE-celulosa (NiR).....	91
Figura 5.6. Cromatograma de Q-Sepharosa (NiR).....	92
Figura 5.7. Cromatograma de Sephacryl S-300 (NiR)	93
Figura 5.8. SDS-PAGE (NiR).....	94

Figura 5.9. Efecto del DT en la determinación colorimétrica del NO ₂ ⁻	96
Figura 5.10. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas	97
Figura 5.11. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas	98
Figura 5.12. Dependencia de la actividad Nas respecto del valor de pH a 60 y 40 °C	100
Figura 5.13. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad Nas	102
Figura 5.14. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad Nas.....	104
Figura 5.15. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la Nas para el MV (MV-Nas)	108
Figura 5.16. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la Nas para la Fd (Fd-DT-Nas)	108
Figura 5.17. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la Nas para el NO ₃ ⁻ (MV-Nas)	109
Figura 5.18. Espectro de absorción de la Nas purificada	110
Figura 5.19. Representación esquemática de la estructura característica de los grupos Fe-S.....	111
Figura 5.20. Representación esquemática de la estructura característica del cofactor de molibdeno.....	112
Figura 5.21. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa.....	115
Figura 5.22. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR	116
Figura 5.23. Dependencia de la actividad NiR respecto del valor de pH a 60 y 40 °C	117
Figura 5.24. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad NiR asimilativa.....	119
Figura 5.25. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad NiR asimilativa	121
Figura 5.26. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la NiR para el MV (MV-NiR)	125
Figura 5.27. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la NiR para la Fd (Fd-DT-NiR)	126
Figura 5.28. Representación doble-inversa para el cálculo de K _m de la NiR para el NO ₂ ⁻ (MV-NiR)	126

Figura 5.29. Espectro de absorción de la NiR purificada	127
Figura 6.1. SDS-PAGE (Fd)	131
Figura 6.2. Espectro de absorción de la Fd purificada	132
Figura 6.3. Espectro super WEFT 1H RMN de la ferredoxina...	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Composición del agua de sales	26
Tabla 4.1. Valores de pH y [acetato] de los medios de cultivo en fase estacionaria	40
Tabla 4.2. Evolución del pH del medio en el tiempo.....	42
Tabla 4.3. D.O de cultivos con NO_2^- en fase estacionaria	50
Tabla 4.4. Variaciones de las concentraciones finales de nitrato, nitrito y amonio tras el crecimiento de <i>Haloferax</i> <i>mediterranei</i> hasta fase estacionaria	60
Tabla 4.5. Resumen de las D.O y pH de medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno en fase estacionaria	75
Tabla 5.1. Resumen del proceso de purificación de la Nas.....	89
Tabla 5.2. Resumen del proceso de purificación de la NiR	92
Tabla 5.3. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la Nas .	103
Tabla 5.4. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad Nas	105
Tabla 5.5. Valores de K_m (Nas)	107
Tabla 5.6. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la NiR..	120
Tabla 5.7. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad NiR asimilativa.....	123
Tabla 5.8. Valores de K_m (NiR asimilativa).....	124
Tabla 6.1. Variación de las señales del espectro de RMN con la temperatura	135
Tabla 6.2. Medidas de actividad Nas y NiR asimilativa en presencia de Fd y MV	136