

1-. INTRODUCCIÓN.

1.1-. CLASIFICACIÓN DE LOS SERES VIVOS.

La clasificación clásica de los seres vivos consideraba dos grupos: *animales* y *vegetales*. Haeckel en 1866 (Haeckel, 1866), acabó con esta dicotomía al reconocer que los protistas, formas celulares sencillas, no tenían lugar en estas agrupaciones. En 1938, Chatton dividió los seres vivos en dos categorías primarias: *procariotas* (bacterias carentes de núcleo celular) y *eucariotas* (organismos con núcleo celular) (Chatton, 1938). Ese mismo año, Copeland propuso la creación de un nuevo reino para acomodar a las bacterias (Copeland, 1938); y más tarde, Whittaker (Whittaker, 1959) creó un quinto reino para los hongos. De esta manera, hasta principios de 1990, todo ser vivo tenía su lugar dentro del esquema de cinco reinos propuesto por Whittaker, siendo sus nombres: *Monera*, *Protista*, *Animalia*, *Plantae* y *Fungi*.

A mediados del siglo veinte, la clasificación de las bacterias seguía siendo un problema sin solución para los microbiólogos, llegando a considerarse que las bacterias no podían ser filogenéticamente ordenadas (Stanier y van Niel, 1962; Stanier, 1970; Morell, 1997). Esta idea se veía además reforzada por la incapacidad de obtener cultivos puros de muchos microorganismos.

En 1977, Carl R. Woese, puso a punto una nueva técnica para analizar la biodiversidad microbiana (Woese *et al.*, 1978; Travis, 1996). Esta técnica reemplaza los criterios fenotípicos clásicos por los moleculares, basándose en el análisis de las secuencias de RNA ribosómicos (rRNAs) (Pace, 1997). Estas secuencias son elementos conservados en todos los organismos, por lo que suponen excelentes marcadores de la historia evolutiva de la vida. Después de una década comparando secuencias de rRNAs procedentes de diferentes

organismos, Woese propuso una división de los seres vivos en tres táxones superiores, denominados dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya* (Woese *et al.*, 1990). La raíz de este árbol filogenético, origen de los modernos linajes, no puede ser establecida a partir del análisis de secuencias de un sólo tipo de molécula. No obstante, estudios filogenéticos más recientes de familias de genes, sitúan la raíz de dicho árbol en el dominio *Bacteria* (Brown y Doolittle, 1995).

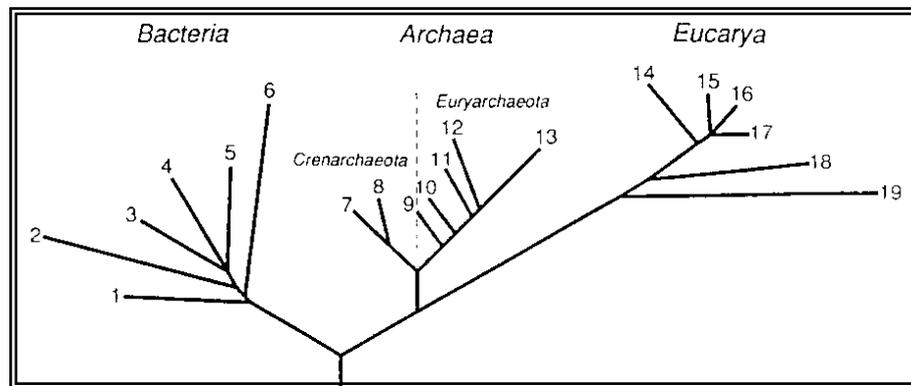


Figura 1.1. Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios encontrados mediante comparación de secuencias de rRNAs. Los números que aparecen en el esquema corresponden a los siguientes grupos de organismos. *Bacteria*: 1, termotogales; 2, flavobacterias y similares; 3, cianobacterias; 4, bacterias púrpuras; 5, bacterias Gram-positivas; 6, bacterias verdes del no azufre. *Archaea*: el reino *Crenarchaeota*: 7, género *Pyrodictium*; 8, género *Thermoproteus*; y el reino *Euryarchaeota*: 9, termococales; 10, metanococales; 11, metanobacteriales; 12, metanomicrobiales; y 13, halófilos extremos. *Eucarya*: 14, animales; 15, ciliados; 16, algas verdes; 17, hongos; 18, flagelados; 19, microsporidios. (Woese *et al.*, 1990).

Aunque la clasificación de Woese ha sido aceptada por la comunidad científica, biólogos moleculares como Mayr (Mayr, 1991) y Margulis (Margulis y Guerrero, 1995) aseguran que esta división no es mejor ni más objetiva que las anteriores. Estos autores argumentan que emplear las secuencias de los genomas en sistemática es, simplemente, hacer uso de otro carácter más de los seres vivos.

En el presente estudio, seguiremos la nomenclatura propuesta por Woese y, puesto que el organismo empleado (*Haloferax mediterranei*) pertenece al dominio *Archaea*, presentamos las principales características de dicho táxon.

1.1.1-. DOMINIO ARCHAEA.

Las arqueas representan un dominio distinto de los dominios *Bacteria* y *Eucarya* (Woese, 1993). Bajo este término se agrupan organismos procariotas con fenotipos bien definidos: halófilos, metanógenos y sulfotermófilos (Forterre, 1997). La primera característica molecular que validó el concepto "arquea" fue la estructura atípica de los glicerolípidos (Zilling, 1991).

Posteriores estudios han mostrado que las arqueas manifiestan caracteres propios de bacterias y eucariotas, a la vez que presentan mecanismos moleculares únicos. Muchas de las propiedades fisiológicas que exhiben aparecen muy pronto en la historia de la evolución, cuando la Tierra era caliente y anaeróbica. Probablemente, el ancestro de las arqueas fue un termófilo que evolucionó dando toda una colección de fenotipos (Barns *et al.*, 1994).

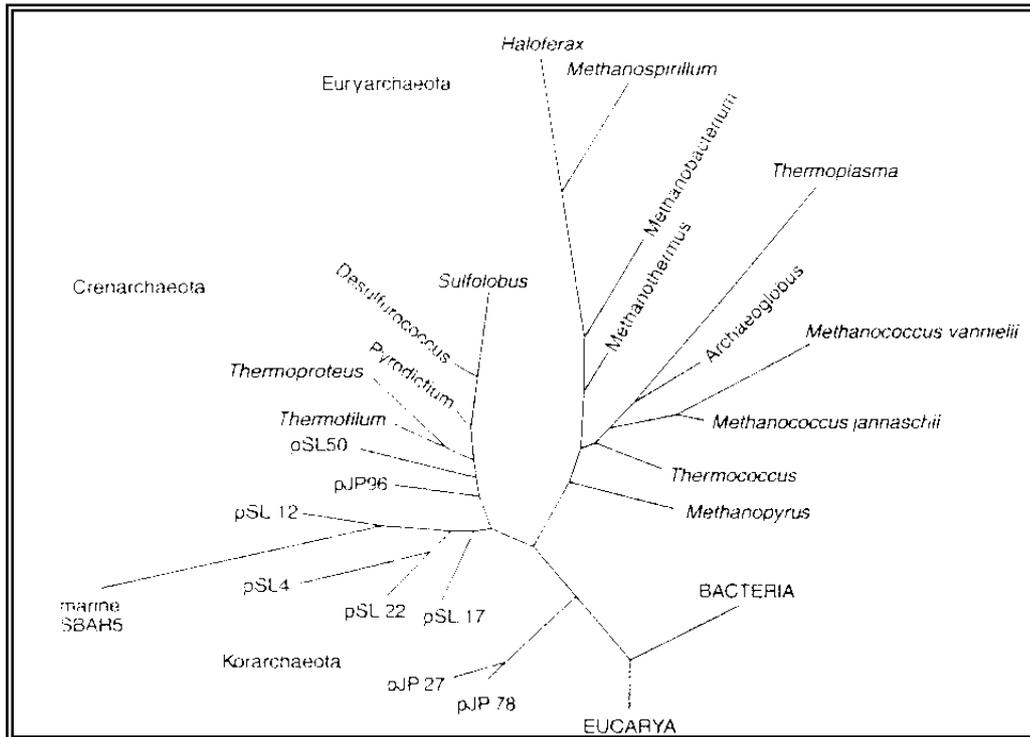


Figura 1.2. Evolución del dominio *Archaea* basada en el análisis de rRNAs (Barns *et al.*, 1996).

El árbol filogenético de *Archaea* tiene dos grandes brazos, designados *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. Un tercer brazo más pequeño representa el reino *Korarchaeota*. Los crenarqueotas son en su mayoría termófilos e hipertermófilos, y entre ellos se supone que está el fenotipo del ancestro de *Archaea*. Son abundantes en las fuentes termales (Barns *et al.*, 1994) y llevan a cabo la oxidación molecular de hidrógeno, con la participación de un compuesto de azufre como aceptor terminal de electrones. El ancestro del brazo *Euryarchaeota* ha dado lugar a los contemporáneos metanógenos, termoacidófilos y halófilos. Finalmente, el descubrimiento de abundantes arqueas en ecosistemas templados (Barns *et al.*, 1996), ha constituido el tercer linaje evolutivo de las arqueas: los korarqueotas.

El análisis de la biología de estos organismos, nos permite concluir que la diversidad ecológica y la abundancia de las arqueas es mayor de lo que originalmente se pensaba (Zimmer, 1995).

1.1.2-. HALÓFILOS.

Los halófilos (Familia *Halobacteriaceae*), son arqueas que requieren altas concentraciones salinas para crecer (1,5-4 M NaCl; 0,5-2 M Mg^{+2}) (Mullakhanbhai y Larsen, 1975). El habitat natural de estos organismos está constituido por salinas marinas y lagos hipersalinos de todo el mundo (la salinidad es 10 veces superior a la del agua de mar). A finales del siglo XIX, los halófilos fueron cultivados por primera vez en el laboratorio a partir de sales empleadas para la conservación de alimentos (Larsen, 1962).



Figura 1.3. Salinas de Santa Pola, Alicante. Hábitat natural de halófilos como *Haloferax mediterranei*. Cedida por el Dr. Rodríguez-Valera.

Todos los halófilos caracterizados son aerobios obligados o anaerobios facultativos. Se agrupan en dieciocho géneros: *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Halomicrobium*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halosimplex* y *Haloterrigena*, con especies que crecen a pH neutro; *Natrialba*, *Natronomonas*, *Natronorubrum*, *Natronobacterium* y *Natronococcus* que requieren condiciones alcalinas (Williams y Wilkins, 1994). Recientemente, el grupo de McGenity (McGenity *et al.*, 1998) ha propuesto un nuevo género, *Natrinema*, para incluir las especies anteriormente clasificadas como *Halobacterium trapanicum* NCIMB 78, *Halobacterium halobium* NCIMB 777 y *Halobacterium salinarum* NCIMB 786.

Desde un punto de vista morfológico, los halófilos son cocos (0,2-2,0 μm) que aparecen individualmente, en parejas, tétradas o racimos, en los que es difícil distinguir cada uno de los cocos; o bacilos (0,3 x 1,0-15,0 μm) que adoptan multitud de formas: rectángulos, triángulos irregulares, discos... Algunos géneros son móviles, mientras que otros carecen de movimiento. Las colonias presentan coloración rojiza por la producción de carotenoides y llegan a ser rosas o blancas, si tienen vacuolas de gas. Los carotenoides están incorporados en la membrana y protegen a las células de la acción fotooxidadora de la luz solar (Kates, 1992).

La temperatura óptima de crecimiento para muchas especies se encuentra entre 40-50 °C, aunque temperaturas inferiores (37-42 °C) son empleadas para el cultivo de estos microorganismos en el laboratorio, con el fin de incrementar la solubilidad del oxígeno en medios de cultivo líquidos. Los halófilos descritos crecen bien como quimiorganotrófos; muchos de ellos tienen requerimientos nutricionales sencillos y pueden crecer con una fuente de carbono y energía (con glucosa se obtienen los mejores resultados), amonio como fuente de nitrógeno y fosfato como fuente de fósforo (Rodríguez-

Valera *et al.*, 1980a). Aminoácidos como el glutamato o ácidos orgánicos como el succinato son fuentes de energía para estos microorganismos. También se ha comprobado que el glicerol producido por algas verdes como *Dunaliella* es una importante fuente de carbono y energía para los halófilos quedando así conectados los metabolismos autotróficos y heterotróficos en los medios hipersalinos (Oren, 1995). Sólo en algunas especies se ha descrito crecimiento fototrófico cuando la cantidad de oxígeno disponible en el medio es pequeña. Normalmente, las halobacterias se cultivan en condiciones de iluminación continua, aunque la exposición a la luz no genera ventajas en el crecimiento cuando los halófilos crecen como quimiorganotrófos (Rodríguez-Valera, 1995).

Diversos estudios sobre la composición del citoplasma de halófilos obligados, muestran elevadas cantidades de sales intracelulares (4 M K⁺ y 1 M Na⁺), esenciales para ser iso-osmóticos con su hábitat. Algunas arqueas halófilas no sólo han desarrollado mecanismos de transporte activo de sales (bomba electrogénica de Cl⁻ conducida por la luz: halorrodopsina), sino que además exhiben un metabolismo y una maquinaria biosintética fuertemente dependiente de la sal. Con esta adaptación, los halófilos consiguen evitar la desnaturalización o precipitación de proteínas producidas por la elevada concentración de sal (Dym *et al.*, 1995).

El análisis de la biología molecular de halófilos comenzó en los años 60 (Moore *et al.*, 1969), poniendo de manifiesto su elevada inestabilidad genética. Desde entonces y hasta ahora, se han clonado y secuenciado un gran número de genes, gracias a diversos métodos de transformación desarrollados por Cline y Doolittle para los géneros *Haloarcula*, *Haloferax* y *Halobacterium* (Cline y Doolittle, 1987). Los avances en métodos bioquímicos, tales como la cromatografía hidrofóbica y la de afinidad, han hecho posible la purificación de numerosas enzimas halofílicas. Éstas requieren la presencia de

grandes concentraciones de sal, para mantener su conformación nativa y su actividad biológica.

Actualmente, ha crecido el interés por estos organismos, debido a sus características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y evolutivas únicas. Además, son fáciles de cultivar y dan lugar a sistemas ideales para la investigación, en términos de Biología Molecular, por lo que resultan especialmente atractivos en Biotecnología (Ventosa y Nieto, 1995). Como aplicaciones importantes en este campo, podemos destacar: síntesis de polihidroalcanoatos (PHB) por determinadas especies (*Haloferax mediterranei*) para fabricar envases de plástico biodegradables, obtención de enzimas estables en condiciones extremas de interés industrial, biodegradación de residuos... (Nieto, 1991; Rodríguez-Valera, 1992; Marhuenda-Egea *et al.*, 2000).



Figura 1.4. Fotografía obtenida a partir de microscopía electrónica de *Haloferax mediterranei* cultivado bajo condiciones óptimas para la producción de PHB. Tomada de Rodríguez-Valera *et al.*, 1991.

1.1.3-. *Haloferax mediterranei*.

Es una arquea Gram (-), aerobia, halófila moderada (si se le compara con especies del género *Halobacterium* y *Halococcus*), que habita en medios neutros. Las células son bacilos (0,5 x 2 μm) móviles que producen vacuolas de gas. Son quimioheterótrofos, utilizando carbohidratos (en este caso se produce acidificación del medio (Tomlinson y Hochstein, 1972; Tomlinson y Hochstein, 1976; Oren y Gurevich, 1994), ácidos carboxílicos, alcoholes y aminoácidos como fuente de carbono y energía. Aunque existen especies del género *Haloferax* capaces de crecer empleando compuestos aromáticos, *Haloferax mediterranei* es incapaz de hacerlo (Emerson *et al.*, 1994). En anaerobiosis, puede usar nitrato como aceptor de electrones alternativo al oxígeno (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). Aunque las células de halófilos lisan cuando la concentración de sal en el medio es inferior al 10 % (p/v), se ha descrito que *Haloferax mediterranei* sobrevive en medios con 5 % (p/v) de sal; en este caso, la síntesis de bacterioruberinas se incrementa como respuesta a la disminución de la concentración de sal (D'Souza *et al.*, 1997).

Los lípidos polares presentes en *Haloferax mediterranei* son C₂₀,C₂₀ (difitanil), derivados del fosfatidilglicerol (Kates, 1992). A diferencia de sus congéneres, presenta un mayor espesor en la pared celular, 25-35 nm, en oposición a los 13 nm que poseen otras haloarqueas. Dicho espesor podría ser el responsable de la resistencia que muestra la cepa R-4, a la ruptura con medios mecánicos (ultrasonicación). En lugar de la bicapa típica de haloarqueas, *Haloferax mediterranei* presenta una monocapa que aparece menos densa en la parte externa y carece de espacio periplásmico (Torreblanca *et al.*, 1986). En cuanto a la genética se refiere, se ha determinado que *Haloferax mediterranei* posee un cromosoma circular de 2,9 Mb y al menos tres elementos extracromosómicos de 490, 320 y 130 Kb respectivamente (López-García *et al.*, 1992).

1.2-. CICLO DEL NITRÓGENO. REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO.

El nitrógeno es un elemento básico para la vida ya que forma parte de dos tipos de macromoléculas de gran importancia: proteínas y ácidos nucleicos. Dicho elemento está presente en la biosfera en diferentes estados de oxidación, desde nitrógeno (V) a nitrógeno (-III). Las interconversiones de las distintas especies de nitrógeno conforman el ciclo biogeoquímico de dicho elemento, en el que participan organismos procariotas y eucariotas, destacando entre ellos las bacterias (Richardson *et al.*, 1999).

La reducción del NO_3^- juega un papel importante en el ciclo del nitrógeno y tiene serias implicaciones en la agricultura, medio ambiente y en salud pública, ya que el uso excesivo de fertilizantes en la agricultura da lugar a la acumulación de NO_3^- en aguas subterráneas. El consumo de estas aguas contaminadas está asociada a la metahemoglobinemia y al cáncer gástrico debido a la formación endógena de compuestos nitrosos por parte de bacterias gastrointestinales (Van Maanen *et al.*, 1996).

La reducción del NO_3^- puede desarrollarse con tres propósitos diferentes:

- ✓ **Asimilación del nitrato:** el NO_3^- actúa como una fuente de nitrógeno para el crecimiento celular. Es llevada a cabo por bacterias, hongos, algas y plantas superiores (Guerrero *et al.*, 1981).
- ✓ **Respiración del nitrato:** el NO_3^- es el aceptor terminal de electrones en condiciones de anaerobiosis. Enterobacterias y bacterias reductoras de sulfato desarrollan este proceso (Moura *et al.*, 1997).

- ✓ **Disimilación del nitrato:** disipación de poder reductor (Moreno-Vivián, *et al.*, 1999).

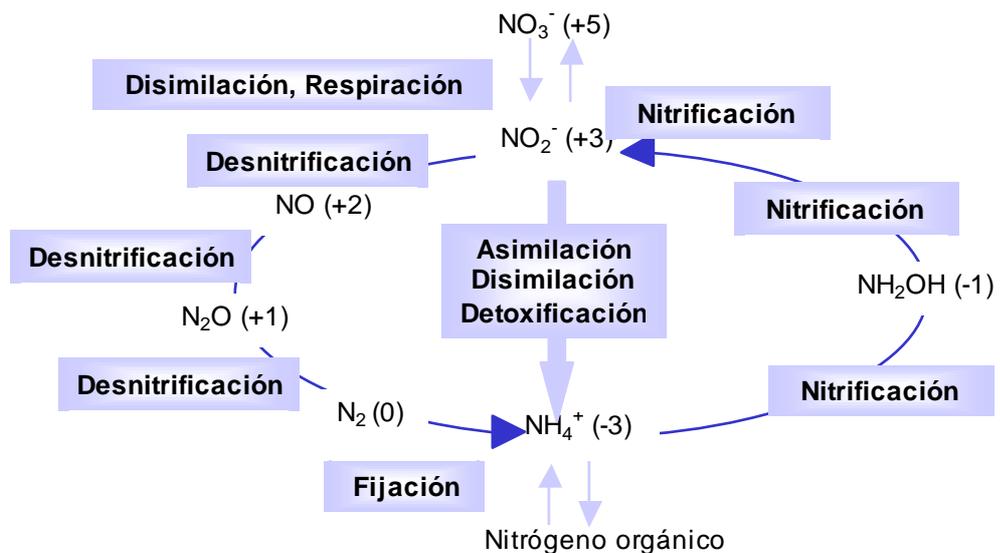


Figura 1.5. Ciclo biológico del nitrógeno. La *Nitrificación* es una conversión oxidativa del amonio a nitrato y la *Desnitrificación* es un proceso respiratorio en el que el nitrato es sucesivamente reducido a nitrito, óxidos de nitrógeno (NO y N_2O), y dinitrógeno (N_2). (Richardson, 2001). Los gases que se generan en la desnitrificación están asociados, probablemente, al efecto invernadero y al deterioro de la capa de ozono (Zumft, 1997).

1.2.1-. ENTRADA DE NITRATO, NITRITO Y AMONIO EXTRACELULARES EN LA CÉLULA.

En la reducción asimilativa del nitrógeno, la primera etapa consiste en la entrada del compuesto nitrogenado al interior de la célula.

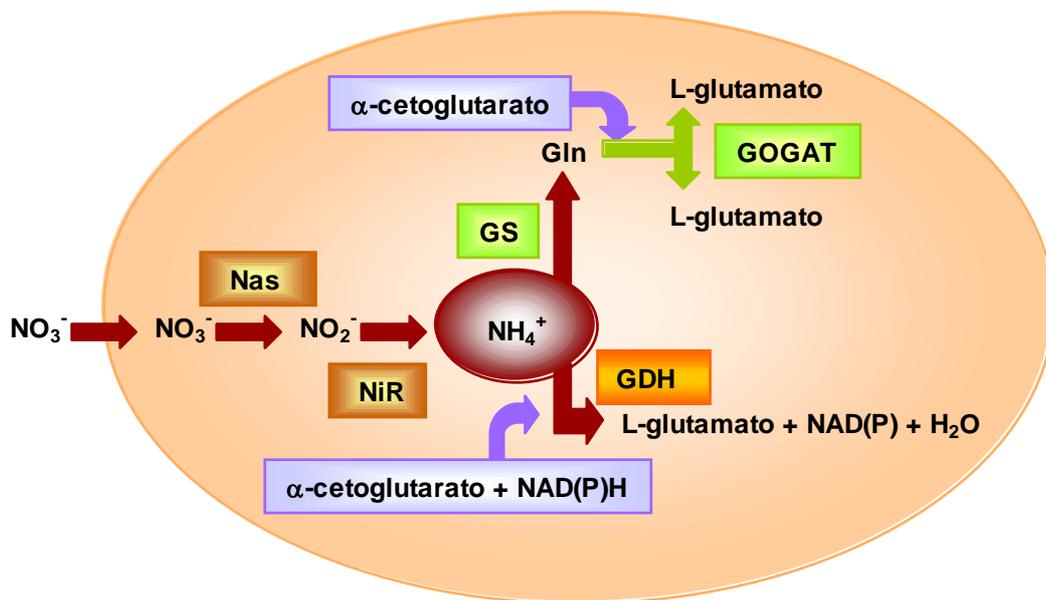


Figura 1.6. Esquema resumen de la Reducción asimilativa del nitrógeno. Se han recogido las dos posibles vías de asimilación del amonio: la vía GS-GOGAT (Vega *et al.*, 1990) y la vía GDH (Ferrer, 1995). Tras la entrada del nitrato en la célula, éste es reducido a nitrito por la nitrato reductasa asimilativa (**Nas**). El nitrito que resulta como producto de dicha actividad enzimática es reducido más tarde a amonio por la nitrito reductasa (**NiR**). Si el amonio está disponible para la célula en grandes cantidades, es asimilado vía glutamato deshidrogenasa (**GDH**), mientras que la vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa (**GS-GOGAT**) es operativa cuando la concentración intracelular de amonio es pequeña (Hochman *et al.*, 1988), aunque esta vía no se ha descrito en *Archaea*.

En principio se pensaba que el NO_3^- entraba en las células por difusión simple, pero no hace muchos años se demostró que, ciertas cianobacterias son relativamente impermeables al NO_3^- , cuando éste está presente en el medio a concentraciones inferiores a 1 mM (Serrano *et al.*, 1981). Además, el uso de NO_3^- por distintas cianobacterias requiere el consumo de energía en forma de ATP (Flores *et al.*, 1983a). Estos descubrimientos sugerían la existencia de un transporte activo de NO_3^- . En 1989 el equipo de Ward (Kleinhofs y Warner, 1990) propuso un modelo en el que una enzima con actividad nitrato reductasa servía como transportador de NO_3^- . Este modelo fue apoyado por Tischner (Kleinhofs y Warner, 1990), al encontrar en *Chlorella sorokiniana* una nitrato reductasa asociada a membrana inhibida por un fragmento de Inmunoglobulina G de *Chlorella* anti-nitrato reductasa, impidiendo la entrada de NO_3^- . Posteriores estudios en *Synechococcus*, pusieron de manifiesto la existencia de una proteína de membrana, de 45 kDa, implicada en la entrada de NO_3^- (Rodríguez *et al.*, 1992). Estas proteínas transportadoras, llamadas **transportadores cassette (ABC) dependientes de ATP**, permiten el transporte de nutrientes y otros solutos (Higgins, 1992). El modelo estructural de estos cassettes propuesto en cianobacterias, sugiere que están constituidos por una proteína periplasmática de unión a solutos (NrtA), una proteína integral de membrana (NrtB) y una ATPasa asociada a la membrana citoplasmática, gracias a la cual se regula la entrada de NO_3^- y NO_2^- (Wu *et al.*, 1998). Para que se desarrolle la máxima entrada de NO_3^- en las células, se requieren concentraciones milimolares de iones sodio (Jacobs *et al.*, 1996).

Existe, así mismo, un conjunto de proteínas denominadas **NarK** que son transportadores $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$; permitiendo la entrada de NO_3^- al interior celular y la salida de NO_2^- del citoplasma (DeMoss *et al.*, 1991). Las proteínas NarK están formadas por 12 hélices transmembrana aunque hasta el momento no se han detectado en el dominio *Archaea* (Moir *et al.*, 2001).

En muchos organismos, los sistemas de transporte $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ parecen ser redundantes, y a nivel molecular se ha identificado un elevado número de transportadores (Fernández *et al.*, 1998; Crawford *et al.*, 1998). En organismos eucariotas, estos genes se han clasificado en dos familias: **Nrt1** y **Nrt2** (Forde, 2000).

- ✓ Los transportadores **NRT1**, sistemas de baja afinidad LANT, (cLANT e iLANT: constitutivos e inducibles, respectivamente) son operativos cuando la concentración de NO_3^- en el medio es superior a 1 mM (Galván *et al.*, 2001). Diversos estudios termodinámicos y electrofísicos muestran que este transporte activo es dependiente de H^+ (Tsay *et al.*, 1993).
- ✓ Los transportadores **NRT2**, también llamados NNP (transportadores $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) son sistemas de alta afinidad (cHANT e iHANT: constitutivos e inducibles, respectivamente) (Galván *et al.*, 1996). Son operativos cuando la concentración extracelular de NO_3^- es inferior a 200 μM (Zhag *et al.*, 2000).

La entrada de NO_2^- al interior celular tiene dos componentes. Una de entrada activa, citada anteriormente, y otra de transporte pasivo, que es insensible a la acción de desacoplantes e inhibidores de ATPasas. En este último caso, el NO_2^- entra en forma de óxido nitroso ($\text{pKa} = 3,4$) a la célula. Este transporte no se desarrolla a pH alcalino (Flores *et al.*, 1987).

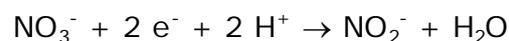
En cuanto a la entrada de NH_4^+ en la célula, hemos de considerar que el amoníaco puede difundir a través de las membranas biológicas, pero este mecanismo no es suficientemente efectivo como para asegurar un buen suministro de nitrógeno a la célula cuando el NH_4^+ ($\text{pKa} = 9,26$) se encuentra en el medio a concentraciones del orden de 1 μM o menores (Flores *et al.*, 1998). El análisis de la toma de NH_4^+ se lleva a cabo utilizando metilamonio (análogo estructural no

asimilable del amonio que compite con él), sometiendo las células a una limitación de nitrógeno. Estos y otros estudios de biología molecular han servido para describir genes de levaduras y de *Arabidopsis thaliana* que determinan permeasas de amonio/metilamonio (Marini *et al.*, 1994).

1.2.2-. REDUCCIÓN DEL NITRATO A AMONIO.

La reducción asimilativa de nitrato a amonio en *Haloferax mediterranei*, como en otros organismos que utilizan nitrato para crecer, se desarrolla en dos etapas:

I-. Reducción de nitrato a nitrito: reacción catalizada por la nitrato reductasa (Nas), que supone la movilización de dos electrones:



Existen cuatro tipos diferentes de nitrato reductasas capaces de catalizar esta reacción: nitrato reductasas asimilativas eucarióticas (Solomonson y Barber, 1990; Moreno-Vivián *et al.*, 1999) y tres enzimas bacterianas diferentes:

- ✓ **Nas:** son enzimas localizadas en el citoplasma que participan en la asimilación de nitrógeno. Manifiestan inhibición por NH_4^+ (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).
- ✓ **Nar:** nitrato reductasas respiratorias unidas a membrana. Son complejos de tres subunidades, que tienen el centro activo localizado en el citoplasma (Zumft, 1997; Blasco *et al.*, 2001).
- ✓ **Nap:** enzimas no asimilativas localizadas en el periplasma. Son complejos de dos subunidades acopladas a la oxidación

del quinol mediante un citocromo tetrahemo que se encuentra anclado en la membrana citoplasmática (Berks *et al.*, 1995).

Tanto las nitrato reductasas eucarióticas como las bacterianas tienen un cofactor de molibdeno (MoCo) en su centro activo, por ello reciben el nombre de **molibdoenzimas**. Dependiendo de la apoenzima, el molibdeno cataliza reacciones de reducción del C, N ó S (Mendel, 1997).

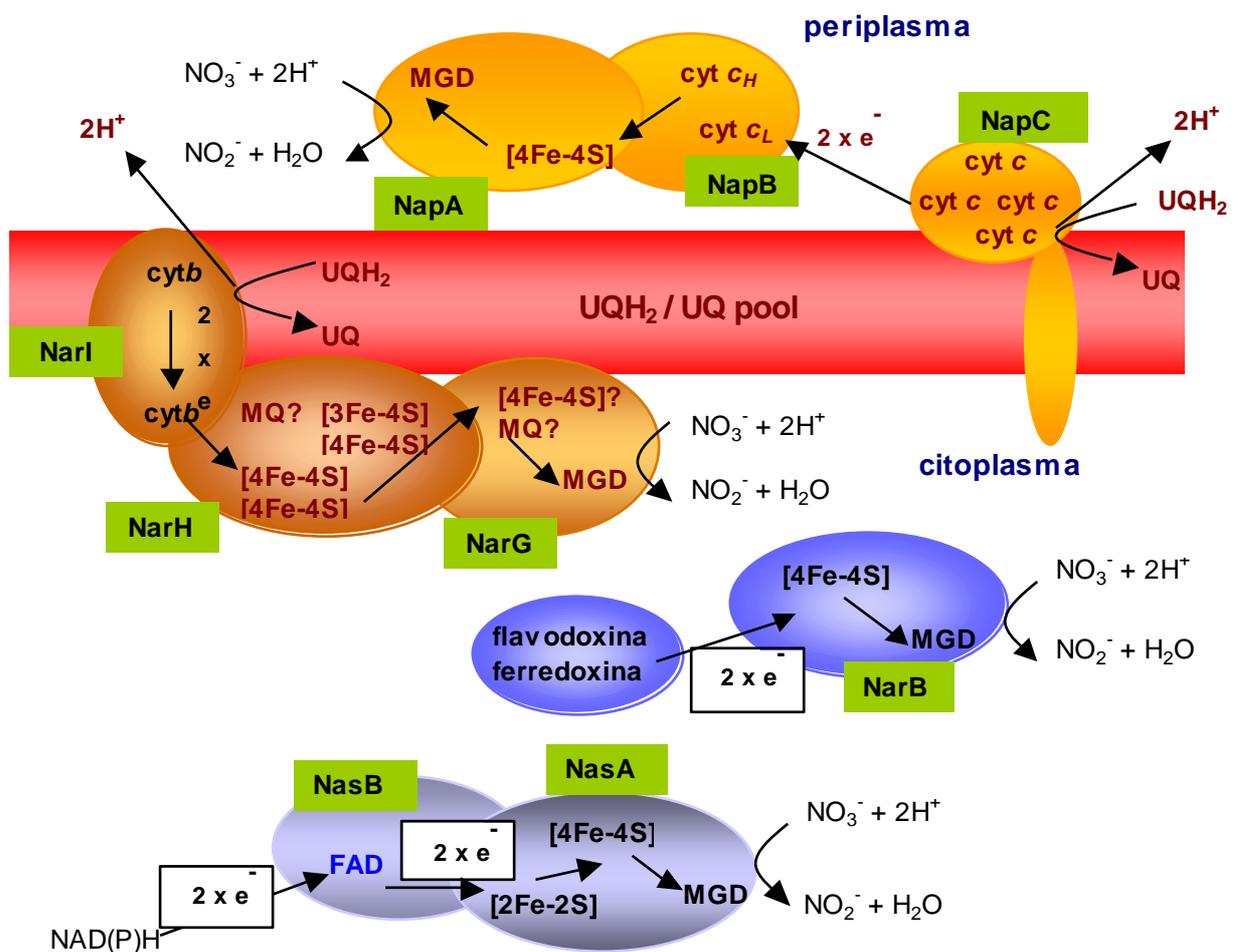


Figura 1.7. Esquema resumen de la estructura de las diferentes nitrato reductasas. Adaptado de Richardson *et al.*, 2001. En la parte superior de la figura (periplasma) aparece el complejo Nap, en marrón se representa la Nar asociada a membrana, y en azul, el esquema de la Nas dependiente de flavodoxina o ferredoxina, y el esquema de la Nas dependiente de NAD(P)H.

Las Nas eucarióticas son homodímeros que emplean nucleótidos de piridina como donadores de electrones. Cada monómero es un polipéptido de 100-200 kDa con tres grupos prostéticos: dinucleótido de flavina-adenina (FAD), citocromo b_{557} y cofactor de molibdeno. Dichos grupos se localizan en tres dominios funcionales muy conservados en especies eucariotas (Campbell *et al.*, 1990).

Estas enzimas tienen dos centros activos, físicamente separados, implicados en la transferencia de electrones. En el primer centro activo, el NADH o NADPH donan electrones al grupo FAD de la enzima. En el segundo centro activo, el Mo^{IV} reducido transfiere dos electrones al NO_3^- , reduciéndolo a NO_2^- (Campbell, 2001).

Las Nas bacterianas (ver figura 1.8, pág. 18) pueden ser de dos tipos: ferredoxina (Fd) o flavodoxina dependientes y enzimas dependientes de NAD(P)H. Las Fd-Nas de cianobacterias son monómeros de 75-85 kDa (Mikami *et al.*, 1984; Rubio *et al.*, 1996), mientras que la Nas que emplea flavodoxina de *Azotobacter vinelandii* es un polipéptido de 105 kDa (Gangeswaran *et al.*, 1996). Por otro lado, las NADH-Nas de *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994) y *Rhodobacter capsulatus* (Blasco *et al.*, 1997) son heterodímeros que constan de una subunidad de 45 kDa con actividad diaforasa y una subunidad catalítica de 95 kDa que contiene un centro 4Fe-4S y un complejo MoCo.

En arqueas, salvo la Nas purificada y caracterizada en el presente estudio, no se ha descrito ninguna nitrato reductasa asimilativa. Tan solo existen datos sobre nitrato reductasas no asimilativas de *Haloferax volcanii* (Bickel-Sandkötter *et al.*, 1995), *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992), *Haloferax denitrificans* (Hochstein *et al.*, 1991), *Halobacterium* sp. (Werber *et al.*, 1978a), *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu *et al.*, 2000),

Pyrobaculum aerophilum (Volkl *et al.*, 1993) y *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997).

La enzima purificada de *Haloferax denitrificans* es un dímero con subunidades de 116 y 60 kDa (Hochstein *et al.*, 1991), mientras que la nitrato reductasa de *Haloferax volcanii* está constituida por 3 subunidades de 100, 61 y 31 kDa (Bickel-Sandkötter *et al.*, 1995). La enzima de *Haloarcula* es un homotetrámero con un tamaño de 63 kDa para la cadena polipeptídica. La nitrato reductasa no asimilativa purificada a partir de *Haloferax mediterranei* tiene un peso de 170 kDa, pero los autores no especifican el número de subunidades (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992).

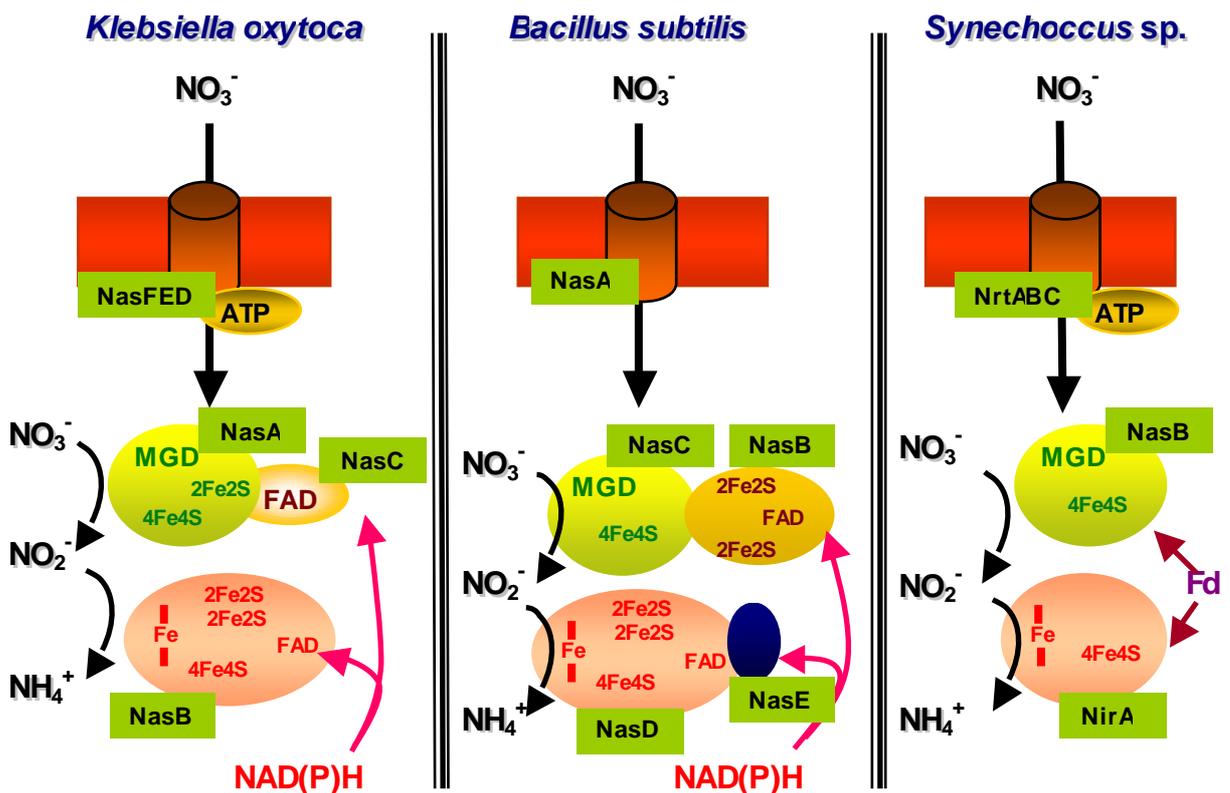
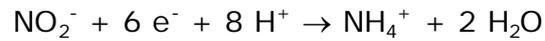


Figura 1.8. Esquema resumen de los elementos implicados en la Reducción asimilativa del nitrógeno en los géneros *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis* y *Synechococcus* sp. (Richardson *et al.*, 2001).

II-. Reducción de nitrito a amonio: reacción catalizada por la nitrito reductasa (NiR) que supone la movilización de seis electrones:



El NH_4^+ se genera en el citoplasma gracias a la actividad de una nitrito reductasa asimilativa dependiente de NADH en *Klebsiella oxytoca* (Lin *et al.*, 1994), o bien gracias a una nitrito reductasa asimilativa que emplea ferredoxina como donador de electrones en cianobacterias (Luque *et al.*, 1993) y en plantas (Campbell *et al.*, 1990). En organismos desnitrificantes que crecen en anaerobiosis, tiene lugar la producción de NH_4^+ como medida de detoxificación (Harborne *et al.*, 1992). Aunque este NH_4^+ puede ser asimilado, el proceso se denomina reducción no asimilativa de NO_2^- (Stewart, 1994).

En la mayoría de los casos descritos, la nitrito reductasa es un único polipéptido, aunque también se han caracterizado nitrito reductasas asimilativas heterodiméricas (*Candida utilis*) con una subunidad de 61-64 kDa y otra de 24-35 kDa (Sengupta *et al.*, 1996). Todas las nitrito reductasas citoplasmáticas analizadas tienen una molécula sirohemo y un centro 4Fe-4S. Las enzimas que dependen de NADH contienen además FAD (Guerrero, 1981). La estructura de las nitrito reductasas que emplean ferredoxina como donador de electrones está muy conservada en cianobacterias, algas eucarióticas y plantas. En todos los casos se han detectado residuos de Cys encargados de la unión de los grupos Fe-S y sirohemo (Fernández *et al.*, 1998).

1.2.3-. ASIMILACIÓN DEL AMONIO.

El NH_4^+ generado internamente como resultado de la reducción del NO_3^- , es asimilado por la vía GS-GOGAT, siglas que hacen referencia a las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) (Flores *et al.*, 1983a) o bien vía glutamato deshidrogenasa (GDH) (Ferrer *et al.*, 1996). Mediante la vía GS-GOGAT se produce una molécula neta de glutamato por cada molécula de NH_4^+ asimilada, con gasto de energía en forma de ATP y poder reductor. El grupo amino del glutamato puede ser donado después a otros compuestos en reacciones catalizadas por transaminasas. Los compuestos de carbono que se combinan con el NH_4^+ para formar glutamato son suministrados por la isocitrato deshidrogenasa (IDH), enzima directamente relacionada con la asimilación del nitrógeno (Ochoa de Alda *et al.*, 1995; Camacho *et al.*, 1995).

En *Haloferax mediterranei*, así como en algunas cianobacterias, existe una GDH capaz de catalizar la formación de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato (Florencio *et al.*, 1987; Ferrer *et al.*, 1996), y se ha propuesto que ésta es la ruta principal de asimilación de NH_4^+ en estos organismos (Trehan, 1986). Diversos estudios en bacterias han demostrado que el sistema GS-GOGAT presenta mayor actividad en células crecidas en NO_3^- que en células crecidas en NH_4^+ , mientras que la GDH exhibe un comportamiento opuesto. Este hecho demuestra que la vía GDH es operativa cuando la concentración intracelular de NH_4^+ es elevada, mientras que la ruta GS-GOGAT se desarrolla si la concentración intracelular de NH_4^+ es baja (Hochman *et al.*, 1987).

1.3-. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD NITRATO Y NITRITO REDUCTASA.

La asimilación del NO_3^- está regulada por las diferentes fuentes de nitrógeno (Tapia *et al.*, 1995), por los niveles de fijación de CO_2 , en el caso de cianobacterias (Guerrero *et al.*, 1987) y por las dosis de radiación UV, en microalgas marinas (Viñegla *et al.*, 2000). Dicha regulación se centra en el sistema de transporte de NO_3^- (Raju *et al.*, 1996) y en el control transcripcional de los niveles celulares de nitrato y nitrito reductasas, principalmente (Franco *et al.*, 1984).

En todos los organismos capaces de asimilar NO_3^- se ha observado que la asimilación del mismo está inhibida por NH_4^+ (Guerrero *et al.*, 1981). Este hecho explica que en presencia de NO_3^- y NH_4^+ , el primero no sea utilizado hasta la desaparición completa del segundo. El NH_4^+ no sólo inhibe la toma del NO_3^- , sino que además reprime la síntesis de la nitrato y la nitrito reductasas (Guerrero *et al.*, 1987). Por ejemplo, en la cianobacteria no fijadora de N *Synechococcus sp. PCC 7942*, los genes que codifican para el transportador de NO_3^- (nrtABCD), para la NR (narB) y la NiR (nirA) constituyen el operón nirA-nrtABCD-narB, cuya transcripción está inhibida por NH_4^+ (Flores *et al.*, 1999; Frías *et al.*, 1997; Rubio *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1993). Tanto el NO_3^- como el NO_2^- regulan positivamente este operón, mientras que el NH_4^+ , convertido en glutamina, inhibe su transcripción. Sin embargo, la glutamina no es el regulador propiamente dicho de la transcripción, pues existen evidencias de que el cianato, un metabolito de la glutamina (vía carbamilo fosfato) actúa como señal de la represión de dicho operón (Suzuki *et al.*, 1996).

En las cianobacterias estudiadas hasta el momento, el gen ntcA codifica para un regulador (NtcA) transcripcional positivo de aquellos genes que están sujetos a represión por amonio (Frías *et al.*, 1993). La

proteína NtcA pertenece a la familia CAP, guarda gran homología con las proteínas CAP de *Escherichia coli* y presenta un motivo hélice-giro-hélice de interacción con DNA en el extremo C-terminal (Bushy y Kolb, 1996). En *Anabaena* sp. la proteína NtcA es esencial para el crecimiento en presencia de nitrato y dinitrógeno (Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994), y participa en la regulación de la expresión del operón nir entre otros (Frías *et al.*, 1994; Valladares *et al.*, 1999; Muro-Pastor *et al.*, 1999).

Otros estudios de biología molecular en la especie *Synechococcus* sp. PCC 7942, demuestran que existen dos genes corriente arriba del operón nirA (nirB y ntcB) que codifican para proteínas de 349 y 309 residuos de aminoácidos, respectivamente. La secuencia de la proteína NirB no tiene similitud con otras proteínas conocidas, mientras que la proteína NtcB es homóloga a activadores transcripcionales de bacterias que pertenecen a la familia LysR. Por tanto NtcB controla la expresión de determinados genes que participan en el metabolismo del nitrógeno en *Synechococcus* (Suzuki *et al.*, 1995). La proteína NtcB está implicada en el efecto positivo que tiene el nitrito en la expresión del operón nir (Suzuki *et al.*, 1995; Aichi y Omata, 1997; Maeda *et al.*, 1998). En un intento por elucidar los mecanismos de regulación transcripcional de la reducción asimilativa del nitrógeno, también se han realizado estudios de biología molecular en *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 (Reyes *et al.*, 1998), *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Goldman *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1996), *Azotobacter vinelandii* (Gutierrez *et al.*, 1995) y *Anabaena* sp. PCC7120 (Frías *et al.*, 1997; Frías *et al.*, 2000).

De forma general, el NO_3^- es necesario para la inducción de la nitrato reductasa, por tanto, el efecto negativo del NH_4^+ puede deberse a una represión mediada por su presencia, o también a la inhibición que éste ejerce sobre la entrada de NO_3^- . Dicha represión requiere la asimilación previa del NH_4^+ , ya que en presencia de MSX (inhibidor de

la GS que reprime la asimilación del NH_4^+) la inhibición no sólo no tiene lugar, sino que además los niveles de actividad nitrato reductasa son iguales o incluso superiores a los detectados en cultivos con NO_3^- (Fresnedo, 1991; Kikuchi *et al.*, 1996).

Los resultados concernientes a la nitrito reductasa asimilativa son más escasos. Estudios con cianobacterias revelan que la expresión de la nitrito reductasa no requiere la presencia de NO_3^- ó NO_2^- , aunque ambos iones ejercen un efecto positivo en su expresión. Sin embargo, en *Anabaena cylindrica*, la NiR sólo se induce si el NO_2^- está presente en el medio (Otimori y Hattori, 1970). En líneas generales, la represión por NH_4^+ de la nitrito reductasa también se revierte con MSX excepto en *Phormidium uncinatum*, habiéndose propuesto que, además de algún producto de su asimilación, el NH_4^+ por sí mismo, tiene efecto represor (Palod *et al.*, 1990). En *Anacystis nidulans* la luz tiene efecto activador de la nitrito reductasa vía tiorredoxina (Tischner *et al.*, 1984) y en *Synechococcus sp.* PCC 6301, la deficiencia de azufre provoca una disminución de la nitrito reductasa (Kramer *et al.*, 1989).

Cianobacterias (Herrero *et al.*, 1986), algas (Hipkin *et al.*, 1980) y plantas superiores (Redinbaugh *et al.*, 1991) sometidas a deficiencia de nitrógeno manifiestan un incremento en la actividad de las enzimas implicadas en la vía asimilativa. El incremento selectivo de dichas actividades podría ser una adaptación fisiológica, que permite que la asimilación de nitrógeno se desarrolle más rápida y efectivamente que en una situación normal. En enterobacterias, se ha propuesto que el déficit de glutamina intracelular actúa como señal desencadenante de estas respuestas fisiológicas, ante una situación de stress continuada (Ikeda *et al.*, 1996).