

### **3-. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1-. MICROORGANISMO.**

El microorganismo empleado en el presente estudio es *Haloferax mediterranei* (ATCC 33500<sup>T</sup>), cepa denominada R4 (Tindall, 1992). Esta arquea halófila moderada fue aislada por el grupo de Rodríguez-Valera, a principios de los años 80, a partir de muestras de agua procedentes de las salinas de Santa Pola, en la provincia de Alicante.

Desde su descubrimiento, *Haloferax mediterranei* ha supuesto un modelo para los estudios de biología molecular (López-García *et al.*, 1992) y ha despertado gran interés debido a su potencial biotecnológico (Rodríguez-Valera *et al.*, 1991).

#### **3.2-. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD NaS Y NiR ASIMILATIVAS.**

##### **3.2.1-. CONDICIONES DE CULTIVO.**

*Haloferax mediterranei* se cultivó, hasta fase estacionaria, en medio mínimo con agua de sales al 25 % (p/v) según la composición descrita por Rodríguez-Valera (Rodríguez-Valera *et al.*, 1980b) (Tabla 3.1, pág. 26). Además el medio contenía: 0,005 g l<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 0,5 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g l<sup>-1</sup> glucosa y diferentes concentraciones de KNO<sub>3</sub> (0-100 mM) ó KNO<sub>2</sub> (0-10 mM).

<b>SAL</b>	<b>CONCENTRACIÓN (g/l)</b>
NaCl	234,0
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	59,3
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	41,5
KCl	6,0
NaHCO <sub>3</sub>	0,2
NaBr	0,7
CaCl <sub>2</sub>	2,9

**Tabla 3.1.** Composición del agua de sales al 30 % (p/v), descrita por Rodríguez-Valera (Rodríguez-Valera *et al.*, 1980b) para el cultivo de arqueas halófilas.

También se crecieron células en 100 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta la mitad de la fase exponencial, para ser posteriormente lavadas (tampón 50 mM fosfato pH 7,3, 2,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tampón A)), resuspendidas en agua de sales y transferidas a medios con concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> inferiores a 100mM o medios en los que además de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estaban presentes el cloranfenicol, la rifampicina ó MSX. Así mismo, se transfirieron células a medios con NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sin fuente de nitrógeno, o bien a medios con dos fuentes de nitrógeno.

Para la extracción de bacterioruberinas además de los medios citados, se preparó medio máximo que contenía 0,5 % (p/v) de extracto de levadura, además del agua de sales al 25 % (p/v).

En todos los casos, el pH del medio se ajustó a 7,3 empleando KOH ó HCl. El uso de tampón 1 M Tris-HCl pH 8,0 para ajustar el pH, inhibía parcialmente las actividades nitrato y nitrito reductasas asimilativas como se muestra más adelante (pág. 37). Los medios (0,5 l) fueron inoculados con 2,5 ml del precultivo o bien con las células crecidas en 100 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta mitad de la fase exponencial. *Haloferax mediterranei* creció aeróbicamente en Erlenmeyers de 1 litro

dispuestos en un incubador Infors AG CH-4103 Bottmingen a 37°C y 200 rpm.

El precultivo, preparado días antes, consistió en 25 ml de medio mínimo con 100 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, inoculados con 100 µl de la cepa mencionada de *Haloferax mediterranei*. El matraz del precultivo se mantuvo en el incubador hasta alcanzar la fase estacionaria.

El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/Visible.

### **3.2.2-. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.**

A lo largo del crecimiento de los cultivos se extrajeron alícuotas de 10 ml. Las células se cosecharon por centrifugación (10 min. a 15.000 rpm y 4°C) en una centrífuga SIGMA 2K15. Tras ser lavadas con tampón A, las células se resuspendieron de nuevo en dicho tampón (40 % peso húmedo/v).

A continuación se rompieron las paredes celulares con un desintegrador ultrasónico Branson Sonifier B-12 de 150 W de potencia, con una sonda de titanio de 12,7 mm de diámetro. Se aplicaron ultrasonidos, en 4 períodos de 3 min. a 4 °C. La suspensión se centrifugó (15 min. a 15.000 rpm) en la centrífuga citada anteriormente. El sobrenadante de esta centrifugación fue empleado como fuente de las enzimas.

### **3.2.3-. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.**

#### **3.2.3.a. Ensayo de la actividad nitrato reductasa (MV-Nas).**

La actividad nitrato reductasa se midió mediante la determinación colorimétrica del  $\text{NO}_2^-$  producido. La composición de la mezcla en la que se desarrollaba la reacción, en un volumen final de 250  $\mu\text{l}$ , era la siguiente: 120 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 9, 3,2 M NaCl, 4 mM MV, 35 mM  $\text{KNO}_3$ , 50  $\mu\text{l}$  extracto y 17 mM de DT (disuelto en 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ ). Las mezclas de reacción se incubaron a 60 °C durante 2 min., tras los cuales comenzaba la reacción al adicionar la solución de DT. La reacción se desarrolló durante 20 min. y se paró mediante la oxidación de DT con agitación vigorosa. El  $\text{NO}_2^-$  formado por la actividad nitrato reductasa se determinó empleando el método de Snell y Snell (Snell y Snell, 1949). La actividad específica nitrato reductasa se expresa en U/mg proteína (ó mU/mg proteína). Una unidad de enzima (U) queda definida como la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$ /min. en las condiciones descritas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo dos controles sin extracto enzimático, uno a tiempo 0 y otro tras 20 min. de incubación, para detectar la posible formación espontánea de  $\text{NO}_2^-$ . En ningún caso se observó dicha formación espontánea.

En los ensayos de determinación de pH óptimo para la actividad nitrato reductasa, además del tampón  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se empleó tampón Tris, cuya composición fue: 50 mM Tris-HCl, 3,2 M NaCl, 35 mM  $\text{NO}_3^-$  y 4 mM MV, en un rango de valores de pH entre 8 y 9.

#### **3.2.3.b. Ensayo de la actividad nitrito reductasa (MV-NR).**

La actividad nitrito reductasa se estimó mediante la determinación colorimétrica del  $\text{NO}_2^-$  consumido. La composición de la

mezcla en la que se desarrollaba la reacción, en un volumen final de 250  $\mu$ l, fue la siguiente: 50 mM tampón fosfato pH 7,5, 3,2 M NaCl, 3 mM MV, 5 mM  $\text{KNO}_2$ , 50  $\mu$ l extracto y 17 mM de DT (disuelto en 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ ). Las mezclas de reacción se incubaron a 60  $^\circ\text{C}$  durante 2 min., tras los cuales comenzaba la reacción al adicionar la solución de DT. La reacción se desarrolló durante 10 min. y se paró mediante la oxidación de DT con agitación vigorosa. El  $\text{NO}_2^-$  descompuesto por la actividad nitrito reductasa se determinó empleando el método de Snell y Snell (Snell y Snell, 1949). La actividad específica nitrito reductasa se expresa en U/mg proteína (ó mU/mg proteína). Una unidad de enzima (U) queda definida como la descomposición de 1  $\mu$ mol de  $\text{NO}_2^-$  /min. en las condiciones descritas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo un control sin enzima a tiempo 0 y control sin extracto enzimático tras los 10 min., para determinar la posible descomposición espontánea de  $\text{NO}_2^-$ .

**3.2.4-. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EXTRACTOS Y DE LAS CONCENTRACIONES DE  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  Y  $\text{NH}_4^+$  PRESENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO.**

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1975) empleando como patrón albúmina de suero bovino. El amonio producido por la actividad nitrito reductasa, así como el consumido del medio se cuantificó mediante la reacción fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967). La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  del medio consumido se ha estimado mediante el método de cuantificación de  $\text{NO}_3^-$  por UV (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1986). El  $\text{NO}_2^-$  consumido o excretado al medio de cultivo se ha cuantificado mediante el protocolo propuesto por Snell y Snell (Snell y Snell, 1949).

**3.2.5-. EXTRACCIÓN DE BACTERIORUBERINAS.**

Se extrajeron alícuotas de 20 ml de los diferentes medios de cultivo preparados (diferentes concentraciones de nitrato, nitrito, sulfato amónico, acetato amónico; medios con dos fuentes de nitrógeno o medio máximo). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 40 min. a 4 °C en una centrifuga Beckman J2-21. Tras ser lavadas con agua de sales, las células se incubaron en 4 ml de acetona durante toda la noche a 4 °C. El extracto se obtuvo mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 10 min. a 4 °C, en una centrifuga Sigma 2K15.

**3.2.6-. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS EXCRETADOS AL MEDIO DE CULTIVO.**

Para cuantificar los ácidos orgánicos excretados al medio de cultivo (en fase estacionaria), se tomaron alícuotas (3 ml) de los cultivos y se eliminaron las células por centrifugación durante 10 min. a 13.000 rpm. Los ácidos orgánicos (lactato, acetato y piruvato) presentes en el medio se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando un sistema de HPLC Shimadzu con dos bombas de titanio modelo LC-7A; dos columnas Lichrospher 100 RP-8, 5 µm (250 x 4 mm, de Merck), conectadas en serie; y un espectrofotómetro UV-VIS modelo SPDM-6A (longitud de onda = 210 nm).

Las muestras (50 µl de medio) se eluyeron con tampón 0,52 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 2,1 (ajustado con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). La velocidad de flujo establecida fue de 0,75 ml/min.

### 3.3.-. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS Y FERREDOXINA.

#### 3.3.1.-. CONDICIONES DE CULTIVO.

*Haloferax mediterranei* se cultivó, hasta la mitad de la fase exponencial, en medio mínimo con agua de sales al 25 % (p/v) según la composición descrita por Rodríguez-Valera (Rodríguez-Valera *et al.*, 1980b). Además el medio contenía: 0,005 g l<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>, 0,5 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g l<sup>-1</sup> glucosa y 100 mM KNO<sub>3</sub>. Los medios (1 l cada uno; un total de 4 l) fueron inoculados con 5 ml del precultivo. *Haloferax mediterranei* creció aeróbicamente en Erlenmeyers de 2 l dispuestos en un incubador Infors AG CH-4103 Bottmingen a 37 °C y 200 rpm.

#### 3.3.2.-. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.

Las células se cosecharon por centrifugación (30 min. a 30.000 x g y 4°C) en una centrifuga BECKMAN J2-21 con rotor angular tipo JA-14. Tras ser lavadas con tampón 50 mM fosfato pH 7,3, 2,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tampón A), se resuspendieron de nuevo en dicho tampón (40 % peso húmedo/v).

A continuación, se rompieron las paredes celulares con un desintegrador ultrasónico Branson Sonifier B-12 de 150 W de potencia, con una sonda de titanio de 12,7 mm de diámetro. Se aplicaron ultrasonidos, en 8 períodos de 3 min. a 4 °C. La suspensión se centrifugó (60 min. a 106.000 g) en una ultracentrífuga BECKMAN L5-65B con un rotor angular tipo 35. El sobrenadante de esta centrifugación fue empleado como fuente de las enzimas.

### **3.3.3-. PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS Y OBTENCIÓN DE FERREDOXINA.**

Tras cosechar y lavar las células según se describe en el apartado 3.2.2 (pág. 27), se obtuvo el extracto crudo, punto de partida del proceso de purificación, el cual se llevó a cabo a 25 °C.

#### **3.3.3.a. Purificación de la nitrato reductasa.**

*Paso 1: Cromatografía en Sepharosa-4B.* El extracto crudo se cromatografió en una columna (de la casa Pharmacia de 2,6 x 30 cm) con 150 ml de Sepharosa-4B, previamente lavada con agua desionizada y estabilizada con tampón A. Para eluir la muestra se empleó un gradiente de sulfato amónico (1,5 l) de concentración lineal decreciente (de 2,5 a 0,5 M de tampón A). La velocidad de flujo establecida fue de 48 ml/hora mediante una bomba peristáltica (LKB Microperpex), recogándose 12 ml/tubo (colector de fracciones LKB Redirac). Las fracciones que tenían actividad nitrato reductasa se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa.

*Paso 2: Cromatografía en DEAE-celulosa.* La columna (1 x 6 cm) fue equilibrada y lavada con tampón A con una velocidad de flujo de 48 ml/h. La enzima se eluyó con 50 mM fosfato pH 7,3, 4,26 M NaCl (tampón B) a una velocidad de 30 ml/h recogándose fracciones de 2 ml/tubo.

*Paso 3: Cromatografía en Sephacryl S-300.* Las fracciones con actividad nitrato reductasa se cromatografiaron en una columna de Sephacryl S-300 (Pharmacia HiPrep 16/60) mediante un sistema Gradifrac (Pharmacia). Dicha columna fue previamente equilibrada con tampón 50 mM fosfato pH 7,5, 2 M NaCl. La columna se lavó con el mismo tampón a una velocidad de 30 ml/h (fracciones de 1,5 ml). Tras la elución, las fracciones con actividad nitrato reductasa se dializaron

frente 200 volúmenes de tampón 50 mM fosfato pH 7,3, conteniendo 4,3 M NaCl para estabilizar la proteína.

### **3.3.3.b. Purificación de la nitrito reductasa.**

*Paso 1: Cromatografía en Sepharosa-4B.* En las mismas condiciones que para la nitrato reductasa.

*Paso 2: Cromatografía en DEAE-celulosa.* En las mismas condiciones que para la nitrato reductasa.

*Paso 3: Cromatografía en Q-Sepharosa.* Las fracciones con actividad nitrito reductasa procedentes del paso 2 se dializaron durante 24 h a 4 °C frente a tampón 50 mM fosfato pH 7,0, 20 % (p/v) glicerol (tampón C). Tras la diálisis, la muestra se pasó por una columna de Q-Sepharosa (4 x 10 cm) previamente equilibrada con tampón C. La columna se lavó con el mismo tampón seguido de 250 ml de un gradiente lineal de NaCl (0-1 M NaCl en 50 mM fosfato pH 7,0 con 20 % (p/v) glicerol). La velocidad de flujo fue 20 ml/hora, recogándose 2 ml/tubo.

### **3.3.3.c. Obtención de la ferredoxina.**

La ferredoxina de *Haloferax mediterranei* se aisló siguiendo el protocolo propuesto por Kerscher para ferredoxinas de halobacterias (Kerscher *et al.*, 1976).

### **3.3.4-. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.**

**3.3.4.a. Ensayo de la actividad nitrato reductasa (MV-Nas):** según se describe en el apartado 3.2.3.a (pág. 28).

**3.3.4.b. Ensayo de la actividad nitrito reductasa (MV-NR):** según se describe en el apartado 3.2.3.b (pág 28).

**3.3.4.c. Ensayo de la actividad nitrato reductasa (Fd-Nas):** según se describe en el apartado 3.2.3.a sustituyendo el MV por 200 nM de ferredoxina aislada de *Haloferax mediterranei* (pág 28).

**3.3.4.d. Ensayo de la actividad nitrito reductasa (Fd-NiR):** según se describe en el apartado 3.2.3.b sustituyendo el MV por 200 nM de ferredoxina aislada de *Haloferax mediterranei* (pág 28).

Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante estudio de velocidades iniciales, realizando los ensayos por triplicado, en los tampones indicados para nitrato o nitrito reductasa. La concentración de los sustratos fue entre 5 y 35 mM  $\text{NO}_3^-$  y entre 0,5 y 4 mM MV para la nitrato reductasa. En los estudios con nitrito reductasa, la concentración de los sustratos varió entre 0,5 y 30 mM  $\text{NO}_2^-$  y 0,2 y 3 mM MV. Se obtuvieron las regresiones lineales de las representaciones de Lineweaver-Burk (1/velocidad vs. 1/[sustrato]). Los parámetros se analizaron mediante el programa descrito por Cleland (Cleland, 1979).

### **3.3.5-. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA.**

La masa molecular relativa de la nitrato y nitrito reductasas nativas se determinó empleando la columna calibrada de tamizado molecular Sephacryl S-300, equilibrada con tampón 50 mM fosfato pH 7,5, 2 M NaCl.

La masa molecular de la ferredoxina, previamente dializada en agua, se estimó mediante HPLC-masas (Fisons Instrument VG Platform), acoplado a una sonda de electrospray. El Programa de Asignación de masas empleado fue Masslynx 2.2.

### 3.3.6 -. ELECTROFORESIS.

El peso molecular de las subunidades de la nitrato y nitrito reductasas se estimó mediante SDS-PAGE siguiendo la técnica propuesta por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, se prepararon geles concentradores al 12 % (p/v) de poliacrilamida y geles espaciadores al 4 % (p/v) de poliacrilamida. Los complejos proteína-SDS se tiñeron con azul de Coomassie según el método propuesto por De Moreno (De Moreno *et al.*, 1985).

La electroforesis en condiciones no desnaturizantes se realizó mediante un sistema de geles en discontinuo introducido por Davis y Ornstein (1964) (referenciado en Goldenberg, 1990), adecuado para proteínas cargadas negativamente como es el caso de las proteínas halófilicas. La concentración de los geles para electroforesis nativa fue la misma que la descrita en SDS-PAGE. Las actividades nitrato y nitrito reductasas en gel se detectaron según describen Vega y Kamin (Vega y Kamin, 1977).

### 3.4-. PRODUCTOS Y REACTIVOS.

- ✓ Todos las **sales** que constituyen el medio de cultivo, de grado analítico, fueron suministradas por la casa Panreac.
- ✓ En los estudios de **regulación de los niveles de actividad**: MSX y rifampicina de Sigma; cloranfenicol de Fluka; sodio wolframato sódico 2-hidrato de Panreac, molibdato sódico 2-hidrato de Merck.
- ✓ En la **cuantificación de proteínas**: el Azul de Coomassie G250 de Sigma; el ácido ortofosfórico 85% (p/v) de Probus; etanol de

Panreac y la proteína patrón (seroalbúmina bovina, fracción V) de Boehringer Mannheim.

- ✓ Para la determinación de la **actividad enzimática**: el MV fue de la casa Sigma. El  $\text{KNO}_3$  y el  $\text{KNO}_2$  fueron de la casa Merck. El DT de la casa Panreac. La sulfanilamida y el NEDA fueron de la casa Merck.
- ✓ **Purificación de proteínas**: persulfato amonico y SDS de Merck; azul bromofenol de Sigma; los geles fueron suministrados por Pharmacia Biotech, excepto la DEAE-celulosa que fue suministrada por Sigma.
- ✓ Patrones para la **electroforesis**: fueron de la casa Promega. La concentración de proteína es de 0,5 mg/ml. El tetrazolium red de Sigma; acrilamida de Bio-Rad.
- ✓ **Inhibidores y donadores de electrones**: EDTA y NADH de Boehringer Mannheim; azida de Merck; PMS, DPIP, FAD, p-hidroximercuribenzoato, DTT y cianuro de Sigma; NADPH de Roche.