

#### **4-. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y NIVELES DE ACTIVIDAD Nas Y NiR ASIMILATIVAS DE *Haloferax mediterranei*: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **4.1-. EFECTO DEL pH SOBRE LOS MEDIOS DE CULTIVO.**

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio del crecimiento de *Haloferax mediterranei* en medios de cultivo mínimos con 100 mM  $\text{NO}_3^-$  como única fuente de nitrógeno. El pH de estos medios se ajustó a 7,3 con tampón 1 M Tris-HCl, pH 8,0 o con 1 M KOH.

Cuando el pH se ajustó con tampón Tris-HCl pH 8,0, las actividades Nas y NiR asimilativas disminuyeron respecto a los valores obtenidos en medios donde el pH se ajustó con KOH. Diversos estudios demuestran que fuentes de nitrógeno como el amonio inhiben las actividades Nas y NiR asimilativa (Flores *et al.*, 1983a; Blanco Mediavilla, 1992). Partiendo de este hecho, resultaba necesario analizar la presencia de nitrógeno (en forma de amonio) "como contaminante", en las sales empleadas para la preparación de los medios de cultivo. Tras verificar la ausencia de dichos "contaminantes" en las sales, se consideró que la inhibición parcial de las actividades Nas y NiR asimilativa podría deberse al efecto del grupo  $\text{NH}_2$  del Tris ( $((\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2)$ ), sobre la reducción asimilativa del nitrógeno. En este sentido, es posible pensar que la molécula del Tris puede alterarse durante el proceso de autoclavado de los medios de cultivo, de manera que el grupo amino presente en su estructura, podría quedar libre en dichos medios, para ser asimilado posteriormente.

Para comprobar esta hipótesis, se prepararon dos medios de cultivo mínimos sin fuente de nitrógeno y tamponados con Tris, de los cuales uno fue autoclavado, y el otro no. Ambos medios (1  $\mu\text{l}$ ) fueron inyectados mediante introducción directa en una fuente de impacto

electrónico, en un espectrómetro de masas de alta resolución (10.000) Finnigan MAT 95S. Los datos obtenidos (estimación de la masa exacta del Tris), muestran que en el proceso de autoclavado, la molécula de Tris pierde un C, tres H y un O (-CH<sub>2</sub>-OH), mientras que el grupo amino aparece inalterado. Tras descartar esta hipótesis, se valoró la posibilidad de que *Haloferax mediterranei* fuese capaz de asimilar el grupo amino de la molécula de Tris.

No obstante, la asimilación del grupo amino del Tris por parte de *Haloferax mediterranei*, no es posible, por tratarse de una amina terciaria y no de una amina secundaria como la presente en los aminoácidos (comunicación personal del Dr. A. Oren). Una vez rechazadas ambas proposiciones, cabría pensar que el Tris actúa negativamente sobre los mecanismos de transporte de nitrato, de ahí la disminución de las actividades Nas y NiR asimilativa. Este comportamiento no ha sido descrito hasta la fecha. Futuros estudios sobre transporte de nitrato y nitrito en *Haloferax mediterranei* permitirán conocer la naturaleza de este fenómeno.

Si el valor del pH del medio con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se ajusta con KOH (sin capacidad tamponadora), el pH puede disminuir a medida que aparecen metabolitos derivados de la degradación de la glucosa (Tomlinson *et al.*, 1974; Tomlinson y Hochstein, 1972; Oren y Gurevich, 1994). Dicha acidificación se ha detectado en cultivos de haloarqueas en medios máximos suplementados con carbohidratos, de manera que se induce la vía no asimilativa del carbono (vía modificada de Entner-Doudoroff) (Tomlinson *et al.*, 1978; Tomlinson *et al.*, 1974). Como resultado de este proceso, se acumulan grandes cantidades de acetato y piruvato en medios con un exceso de fuente de carbono (medio máximo con 1 % de glucosa), descendiendo el pH del medio hasta 5,0 (Hochstein, 1978).

En los medios (mínimos) de cultivo con  $\text{NO}_3^-$  preparados en el presente estudio, se han detectado leves modificaciones en el pH que no han impedido el crecimiento celular (la D.O alcanzada en fase estacionaria fue 2,4-2,5 en todos los casos, densidad máxima obtenida en medios tamponados). El valor de pH más bajo detectado en fase estacionaria fue 6,88 en medios de cultivo con 5 mM  $\text{KNO}_3$  (tabla 4.1, pág. 40). En medios de cultivo en los que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue superior, el pH del medio en fase estacionaria se incrementó (tabla 4.1, pág. 40). La posible acidificación del medio de cultivo provocada por el metabolismo de la glucosa, podría ser en parte compensada por la alcalinización de dicho medio, gracias al proceso de reducción de  $\text{NO}_3^-$  (Aparicio *et al.*, 1995). Puesto que las leves modificaciones de pH de los medios no provocaron fases estacionarias tempranas, decidimos ajustar el pH de todos los medios de cultivo con HCl o KOH, según el requerimiento.

Los medios de cultivo con  $\text{NO}_2^-$  resultaron más problemáticos en cuanto al control del pH. En ellos se detectó una acidificación en fase exponencial más acusada que en los medios con  $\text{NO}_3^-$  (tabla 4.1, pág. 40). Resulta difícil comprender que esta acidificación únicamente sea debida a la degradación de la glucosa, pues dicha fuente de carbono debe ser asimilada. El pH del medio disminuye considerablemente hasta 5,8-6,4 a las 8 horas del inicio del cultivo, induciéndose una fase estacionaria temprana. Además, al igual que se ha citado para medios con  $\text{NO}_3^-$ , cabe esperar que la reducción de  $\text{NO}_2^-$  genere una alcalinización del medio (Aparicio *et al.*, 1995).

Con el objetivo de determinar si la excreción de ácidos orgánicos (procedentes del metabolismo de la glucosa) provoca la disminución del pH de los medios con nitrito, se llevó a cabo la cuantificación de acetato, lactato y piruvato en dichos medios. Sólo se detectó acetato en los medios de cultivo utilizados (en fase estacionaria), y como se aprecia en la tabla 4.1, la concentración de acetato observada en

medios con 2 mM  $\text{NO}_2^-$  y 100 mM  $\text{NO}_3^-$  es prácticamente idéntica, mientras que los valores de pH de ambos cultivos son muy diferentes.

<i>Fuente de nitrógeno</i>	<i>Concentración de acetato (mM)</i>	<i>pH</i>
5 mM $\text{KNO}_3$	0,18	6,88
25 mM $\text{KNO}_3$	1,23	8,00
100 mM $\text{KNO}_3$	1,30	8,20
0,5 mM $\text{KNO}_2$	----	6,00
1 mM $\text{KNO}_2$	----	6,00
2 mM $\text{KNO}_2$	1,28	5,90

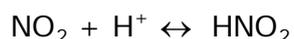
**Tabla 4.1.** Valores de pH y concentración de acetato de los medios de cultivo en fase estacionaria. La concentración de acetato se estimó mediante HPLC (apartado 3.2.6 de materiales y métodos).

Estos resultados ponen de manifiesto que la excreción de acetato no es el único factor que provoca la disminución de pH de los medios de cultivo. La modificación del pH de los medios podría ser debida también a la presencia de bombas de  $\text{H}^+$  asociadas al transporte de  $\text{NO}_3^-$  y/o  $\text{NO}_2^-$ .

En algas verdes se ha observado que los cambios de pH en el medio extracelular se deben a la entrada de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{Cl}^-$  simultáneamente con protones (Fuggi *et al.*, 1981; Fuggi, 1990). La entrada equimolar de estos aniones con protones es necesaria para mantener la electroneutralidad de los medios celulares. La implicación de protones adicionales en estas reacciones quimiosmóticas dependientes de energía se ha descrito para la entrada de  $\text{Cl}^-$  en *Chara* (Beilby y Walker, 1981) y para el  $\text{NO}_3^-$  en *Lemma* (Ullrich y Novacky, 1981). Estos protones adicionales, sin embargo, no contribuyen a la

alcalinización definitiva del medio externo, puesto que son rápidamente devueltos al medio por las bombas de H<sup>+</sup> (Aparicio *et al.*, 1995).

Existen pocas referencias bibliográficas sobre el transporte de nitrógeno, en sus diferentes formas inorgánicas, en bacterias; y son escasas las investigaciones realizadas al respecto en arqueas. Sólo en cianobacterias y algas se ha abordado dicho estudio. No obstante, no es descartable la hipótesis de que en *Haloferax mediterranei* exista un transporte de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> asociado a una bomba de protones que contribuya a la acidificación del medio de cultivo. La excreción de H<sup>+</sup> al medio podría a su vez, favorecer la formación de HNO<sub>2</sub>.



La cuantificación de acetato por HPLC (tabla 4.1, pág. 40) demuestra que la aparición de acetato (por degradación de la glucosa) no explica la brusca acidificación observada en medios de cultivo con nitrito. Para corroborar estos datos se estudió como variaba el pH en medios de cultivo con nitrito y sin fuente de carbono. Para ello, se cultivaron células de *Haloferax mediterranei* en medio mínimo con 2 mM de KNO<sub>2</sub> hasta una D.O de 0,4. Tras cosechar las células, éstas se transfirieron a medios de cultivo con diferentes concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, en ausencia de fuente de carbono, y se analizó la modificación del pH con el tiempo.

Debido a la ausencia de carbono, el crecimiento desarrollado fue escaso. Como se aprecia en los resultados de la tabla 4.2 (pág. 42), existe una acidificación del medio que es independiente de la degradación de la glucosa.

TIEMPO (horas)	pH		
	5 mM KNO <sub>2</sub>	25 mM KNO <sub>2</sub>	75 mM KNO <sub>2</sub>
0,00	7,20	7,20	7,20
0,25	7,09	7,04	7,07
0,80	6,97	6,95	6,98
1,50	6,94	6,85	6,92
4,00	6,80	6,73	6,77
9,00	6,60	6,65	6,70
22,00	6,22	6,30	6,19

**Tabla 4.2.** Evolución del pH del medio con el tiempo. Células de *Haloferax mediterranei* cultivadas en 2 mM de KNO<sub>2</sub> se transfirieron a medios con 5, 25 y 75 mM de KNO<sub>2</sub> carentes de fuente de carbono.

Esta disminución de pH, que alcanza la misma magnitud en las tres concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ensayadas, podría estar asociada al transporte de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y a la formación de HNO<sub>2</sub>. Futuros estudios sobre transportadores permitirán comprender, en mayor medida, estos resultados.

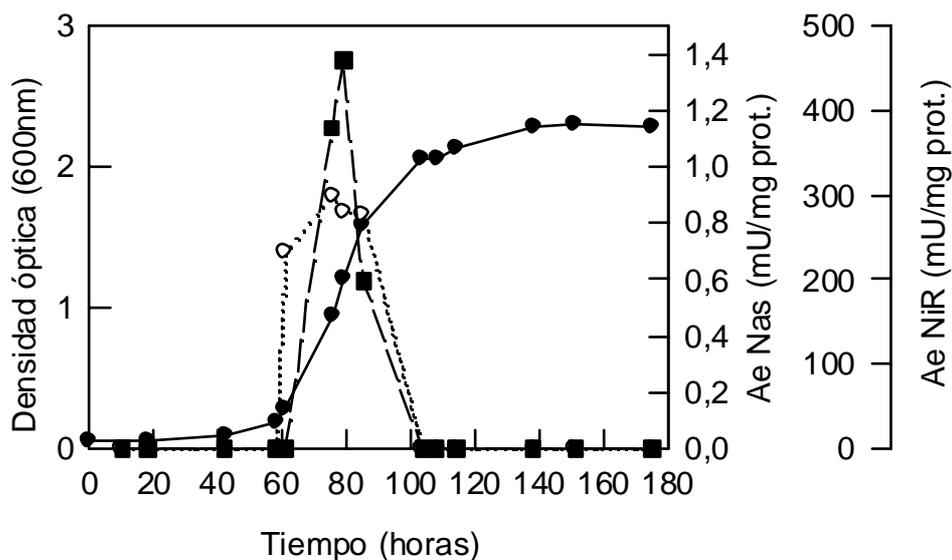
Para evitar los cambios bruscos de pH en los medios con NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, se llevó a cabo un control continuo del pH mediante adición de KOH (apartado 4.3, pág. 48).

## 4.2-. CRECIMIENTO Y NIVELES DE ACTIVIDAD NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS EN MEDIOS DE CULTIVOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO.

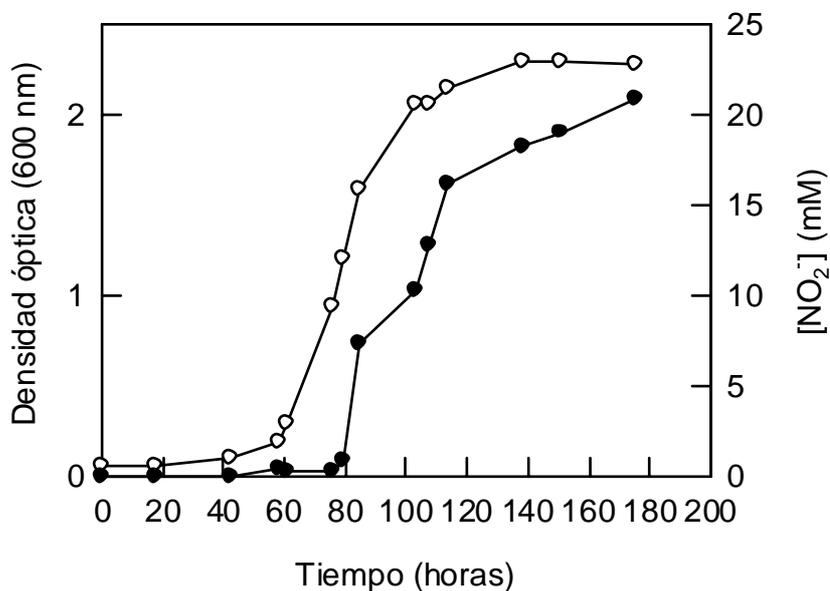
### 4.2.1-. CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES EN MEDIOS CON 100 mM $\text{NO}_3^-$ .

Se cultivó *Haloferax mediterranei* en medio de cultivo mínimo con 100 mM  $\text{NO}_3^-$ . La densidad óptica del cultivo en fase estacionaria alcanzaba valores próximos a 2,5. Al analizar la evolución de la actividad nitrato reductasa durante el crecimiento celular observamos que ésta comenzaba al inicio de la fase exponencial. La máxima actividad nitrato reductasa se detectó en la mitad de la fase exponencial del cultivo (densidad óptica = 1,2).

El crecimiento con  $\text{NO}_3^-$  está acompañado de excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio. Se llevó a cabo un seguimiento de la excreción de  $\text{NO}_2^-$ , encontrando que ésta se inicia cuando el cultivo supera la mitad de la fase exponencial, siendo máxima en la fase estacionaria del crecimiento celular. La excreción coincide con la pérdida de las actividades Nas y NiR asimilativas.

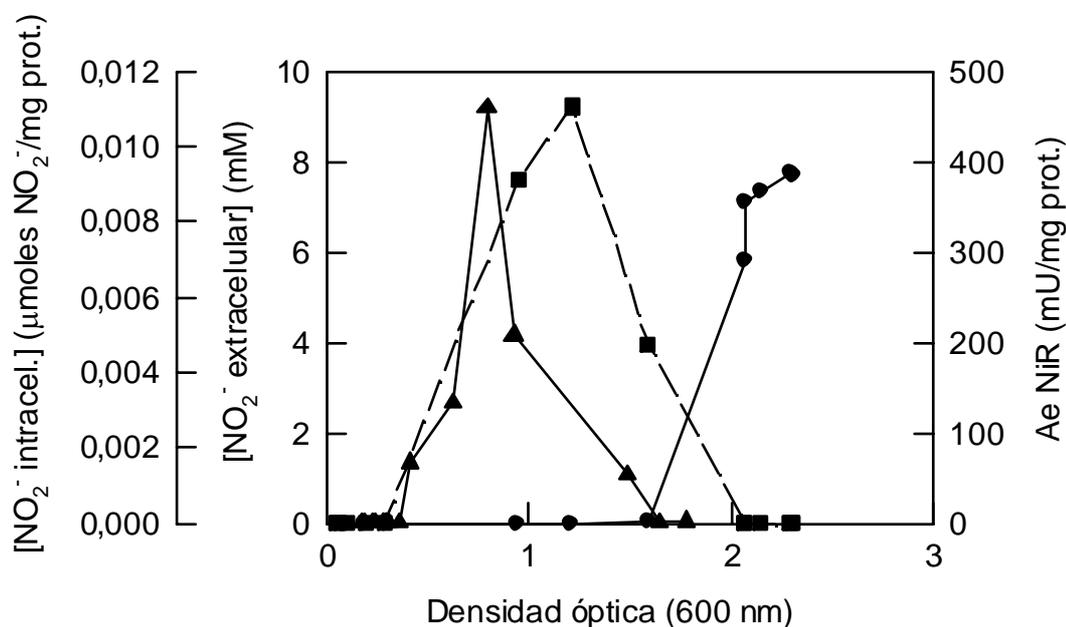


**Figura 4.1.** Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativa durante el desarrollo del cultivo. Densidad óptica (●), actividad Nas (○) y actividad NiR (■).



**Figura 4.2.** Excreción de nitrito al medio de cultivo durante el desarrollo del cultivo. Densidad óptica (○), excreción de nitrito (●).

Cuando se detectó que la excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio se iniciaba al superar la mitad de la fase exponencial y que los niveles de  $\text{NO}_2^-$  extracelulares incrementaban considerablemente en un breve intervalo de tiempo, decidimos realizar el seguimiento de las concentraciones intra y extracelular de  $\text{NO}_2^-$ . Como se aprecia en la figura 4.3, existe una acumulación intracelular de  $\text{NO}_2^-$  que precede al desarrollo de actividad NiR. Los valores más altos de actividad NiR coinciden con la eliminación intracelular de  $\text{NO}_2^-$ . A partir de este momento, se desarrolla la excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio de cultivo, al tiempo que se anulan las actividades Nas y NiR asimilativas.

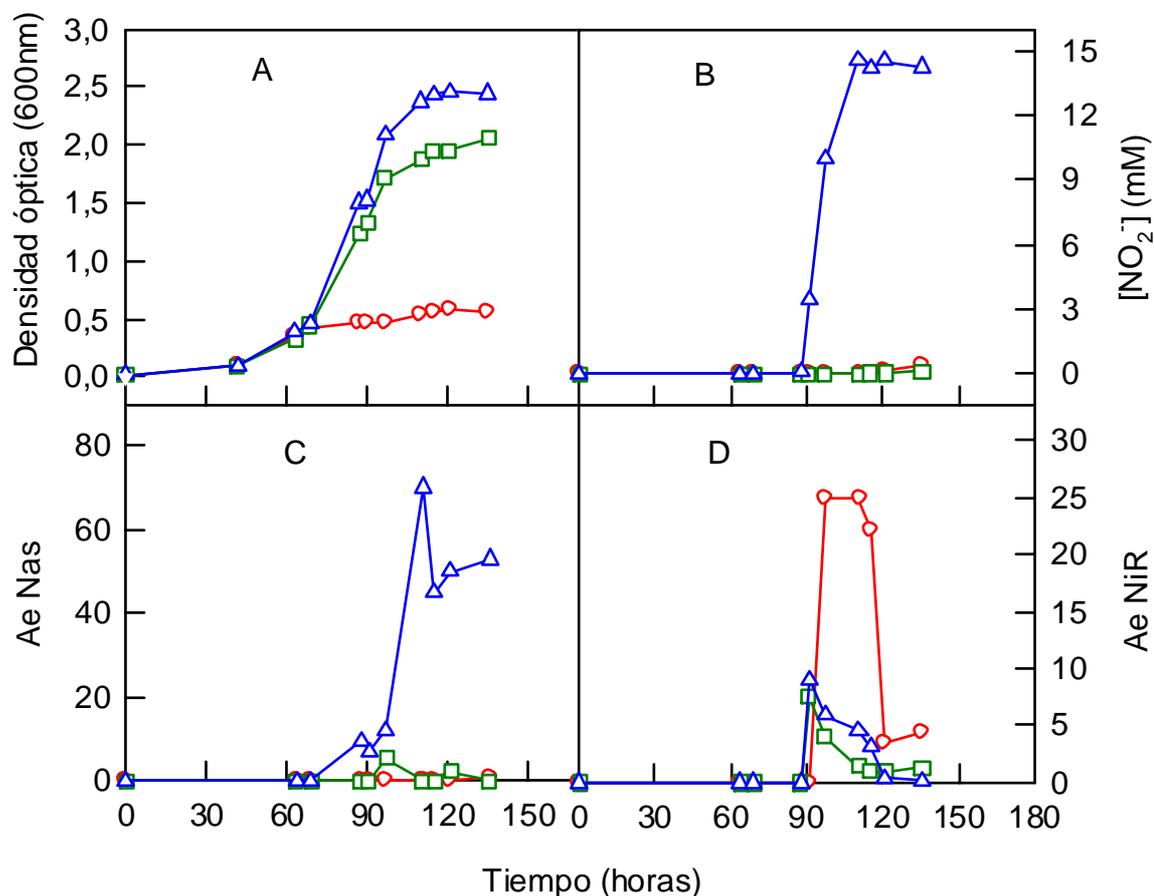


**Figura 4.3.** Posible relación entre la actividad NiR y las  $[\text{NO}_2^-]$  intra y extracelulares. Excreción de nitrito ( $\bullet$ ), nitrito intracelular ( $\blacktriangle$ ) y actividad NiR asimilativa ( $\blacksquare$ ).

Este comportamiento nos sugiere la hipótesis de que la acumulación intracelular de  $\text{NO}_2^-$  podría actuar como una señal de inducción de la actividad NiR.

#### 4.2.2-. CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES EN MEDIOS CON CONCENTRACIONES DE $\text{NO}_3^-$ INFERIORES A 100 mM.

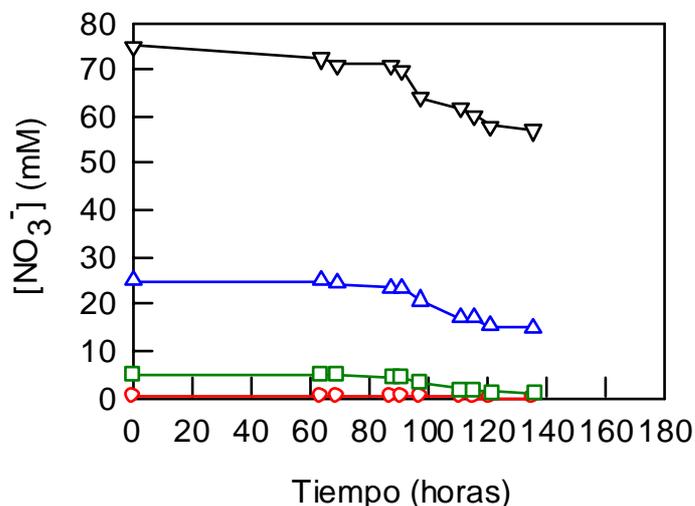
Se prepararon medios de cultivo con concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  que variaban entre 0,5 y 75 mM. En la siguiente gráfica aparecen los resultados obtenidos en medios de cultivo con 0,5, 5 y 25 mM de  $\text{NO}_3^-$ ; los resultados procedentes de medios de cultivos con 75 mM de  $\text{NO}_3^-$  se han obviado por ser prácticamente idénticos a los mostrados para medios con 100 mM (tabla nº 4 del apéndice de tablas).



**Figura 4.4.** Medios de cultivo con concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  inferiores a 100 mM. 0,5 mM (○), 5 mM (□) y 25 mM (△)  $\text{NO}_3^-$ . A: curvas de crecimiento; B: nitrito excretado; C: actividad Nas (mU/mg prot.); D: actividad NiR (mU/mg prot.).

La curva de crecimiento de *Haloferax mediterranei* en medios de cultivo con 25 y 75 mM  $\text{NO}_3^-$  es prácticamente idéntica a la mostrada para cultivos con 100 mM  $\text{NO}_3^-$ . En líneas generales, las actividades Nas y NiR son proporcionales al incremento de  $[\text{NO}_3^-]$  en el medio. Sin embargo en la gráfica D de la figura 4.4 se aprecia que la actividad específica NiR es más alta en el medio con 0,5 mM  $\text{NO}_3^-$  que en el resto de medios. Este elevado valor de actividad específica indica que dicha proteína es mayoritaria en estas condiciones de crecimiento.

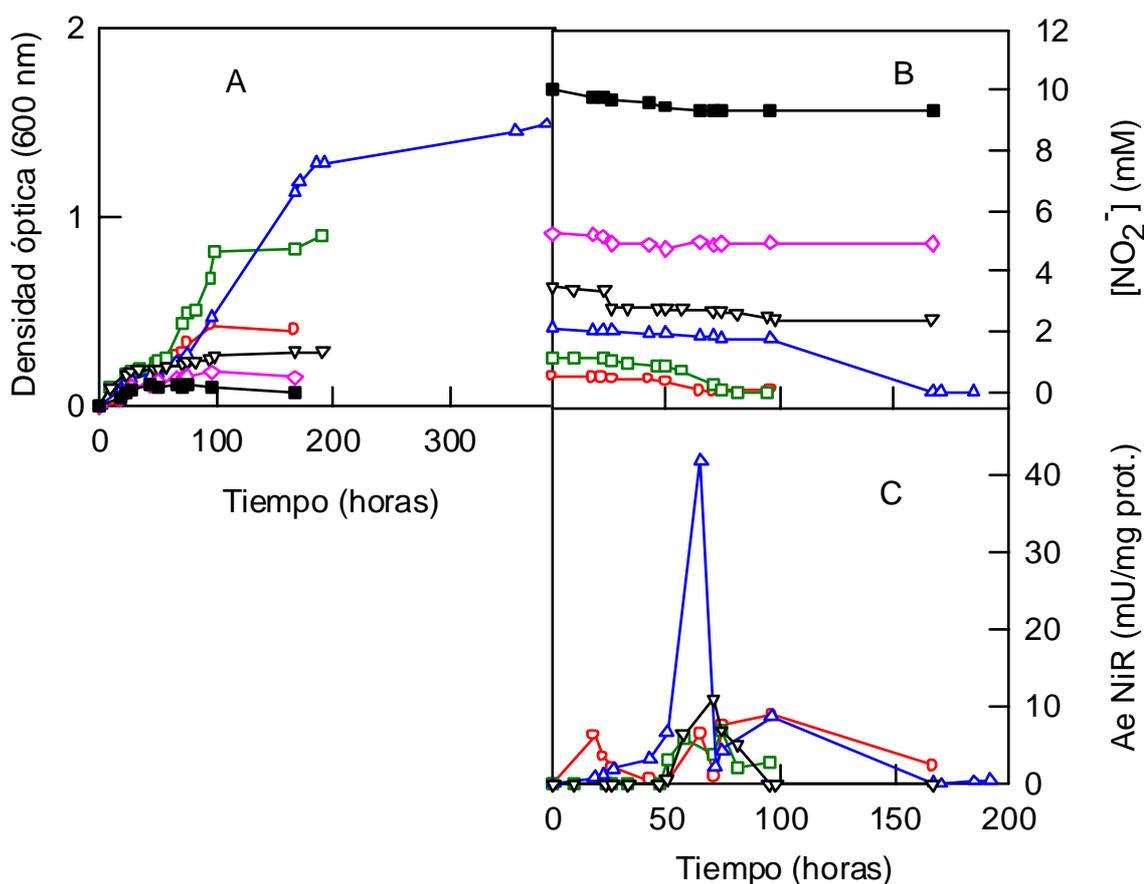
Concentraciones inferiores a 5 mM no permiten el desarrollo de una curva de crecimiento con densidad óptica 2,5 en fase estacionaria, debido al agotamiento de la fuente de nitrógeno (figura 4.5). La excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio tiene lugar si la concentración de  $\text{NO}_3^-$  del medio es superior a 5 mM. En medios con 5 mM de  $\text{NO}_3^-$ , todo el  $\text{NO}_2^-$  se emplea como fuente de nitrógeno para el metabolismo celular, por lo que no hay excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio de cultivo.



**Figura 4.5.** Consumo de  $\text{NO}_3^-$  en medios de cultivo con una concentración inicial inferior a 100 mM. 0,5 mM (○), 5 mM (□), 25 mM (△) y 75 (▽) mM  $\text{NO}_3^-$ .

#### 4.3.- CRECIMIENTO Y NIVELES DE ACTIVIDAD NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS EN MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO.

Se prepararon medios de cultivo con 0,5-10 mM  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno. Los resultados obtenidos a partir de esos ensayos se recogen en la figura 4.6. Aunque en ninguno de los casos se alcanzó una densidad óptica entorno a 2,5 en fase estacionaria (máxima densidad óptica observada en medios de cultivo máximos con 0,5 % de levadura o medios mínimos con 5-100 mM nitrato), *Haloferax mediterranei* sí pudo emplear  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno (figura 4.6.A).



**Figura 4.6.** Medios de cultivo con diferentes concentraciones de  $\text{NO}_2^-$ . 0,5 mM (○), 1 mM (□), 2 mM (△), 3,5 mM (▽), 5 mM (◇) y 10 mM (■)  $\text{NO}_2^-$ . A: curvas de crecimiento; B: nitrito consumido; C: actividad NiR (mU/mg prot.).

En medios con 2 mM  $\text{NO}_2^-$ , el cultivo alcanzó una D.O entorno a 1,5, siendo éste el mayor crecimiento conseguido. Concentraciones inferiores a 2 mM no permiten un desarrollo del crecimiento, debido a un agotamiento de la fuente de nitrógeno. Dicho agotamiento, estimado mediante cuantificación de nitrito (Snell y Snell, 1949) presente en el medio de cultivo, a diferentes intervalos de tiempo, se muestra en la figura 4.6.B. La actividad Nas resultó prácticamente indetectable en todos los medios de cultivo y los valores más elevados de actividad NiR asimilativa aparecieron en medios con 2 mM  $\text{NO}_2^-$ .

En medios de cultivo con concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  superiores a 3 mM apenas se produjo crecimiento. Este resultado parece indicar que dicha concentración resulta tóxica para las células, inhibiéndose por completo el crecimiento. Sin embargo, cuando las células crecen en medios con altas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , se detecta una excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio que alcanza concentraciones cercanas a 15 mM a las 90 h de incubación (figura 4.4, pág. 46), tras las cuales sigue el crecimiento celular. Debido a estos resultados, se estudiaron las variaciones de pH en los medios de cultivo con  $\text{NO}_2^-$ , encontrando que la acidificación de los mismos a lo largo del crecimiento celular es mucho más acusada que en los medios con  $\text{NO}_3^-$  (apartado 4.1, págs 39-42).

Con el fin de estimar la máxima concentración de  $\text{NO}_2^-$  tolerado por *Haloferax mediterranei* se mantuvo constante el pH del cultivo (alrededor de 7,3) mediante la adición de KOH, esterilizado por filtración, cada 12 horas. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4.3. (pág. 50). Como puede observarse, *Haloferax mediterranei* es capaz de crecer en medios con 5 mM  $\text{NO}_2^-$ , pero concentraciones superiores resultaron tóxicas para este organismo.

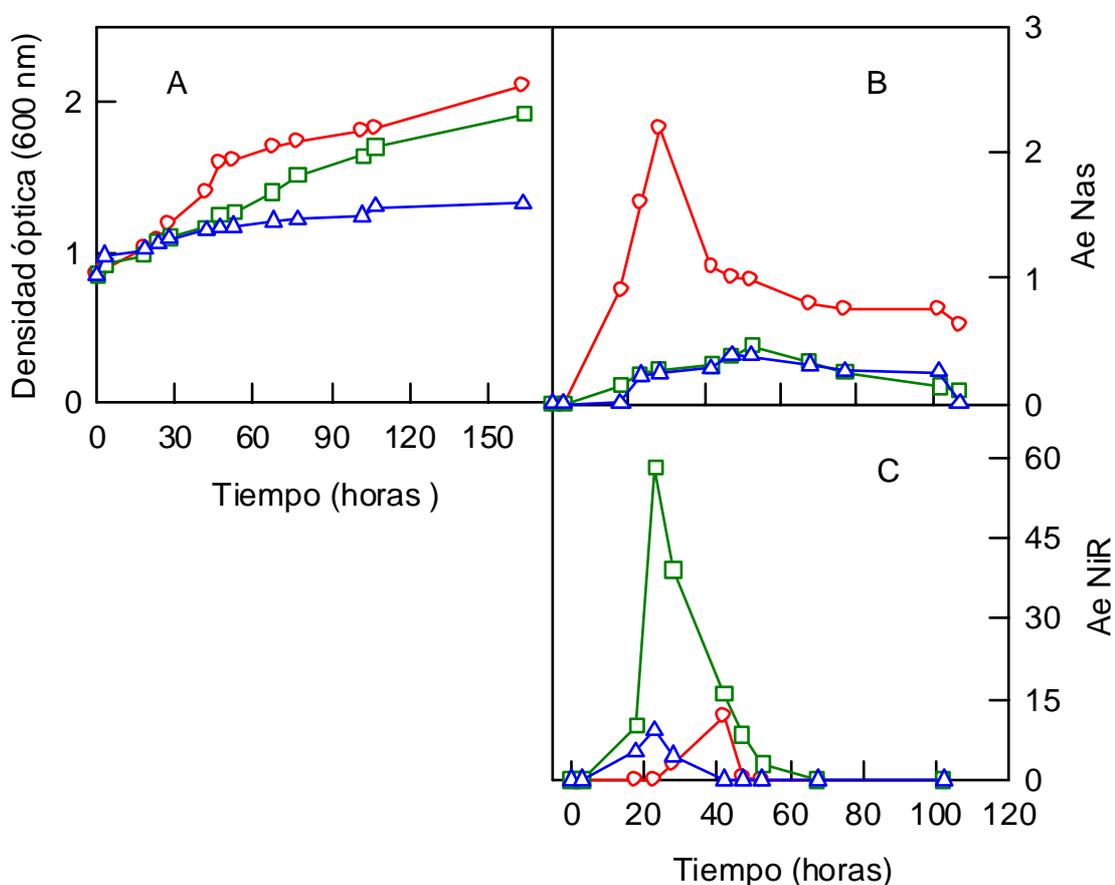
$[\text{NO}_2^-]$ (mM)	D.O (Abs 600 nm)
5 mM	2,1
25 mM	1,3
75 mM	0,5

**Tabla 4.3.** Crecimiento celular de *Haloferox mediterranei* (estimado mediante medidas de D.O a 600 nm) en fase estacionaria en medios de cultivo con  $\text{NO}_2^-$ .

Si concentraciones superiores a 5 mM  $\text{NO}_2^-$  son tóxicas para *Haloferox mediterranei*, resulta difícil explicar el crecimiento celular observado en medios con altas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , en los cuales la excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio alcanza concentraciones cercanas a 15 mM. Este comportamiento se analiza con detalle en el apartado 4.5.2 (pág. 58), que recoge los ensayos realizados con medios de cultivo que contienen dos fuentes de nitrógeno de distinta naturaleza.

#### 4.4.- INDUCCIÓN DE LAS ACTIVIDADES MV-Nas Y MV-NiR EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.

*Haloferax mediterranei* se cultivó en medio mínimo con 20 mM  $\text{NH}_4^+$ , hasta fase estacionaria. En estas condiciones, no se detectó actividad Nas ni NiR asimilativa. Tras cosechar y lavar las células, éstas fueron transferidas a medios de cultivo con 5 mM  $\text{NO}_3^-$ , 2 mM  $\text{NO}_2^-$  o sin fuente de nitrógeno. Los resultados procedentes de este ensayo quedan recogidos en la siguiente figura:



**Figura 4.7.** Inducción de las actividades MV-Nas y MV-NiR. Células de *Haloferax mediterranei* crecidas en medio mínimo con 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  fueron cosechadas y lavadas para ser posteriormente transferidas a medios con 5 mM  $\text{NO}_3^-$  (○), 2 mM  $\text{NO}_2^-$  (□) o sin fuente de nitrógeno (△). A: curvas de crecimiento; B: actividad Nas (mU/mg prot.); C: actividad NiR (mU/mg prot.).

El crecimiento se desarrolló como cabría esperar en condiciones óptimas (medios de cultivo máximos con 0,5 % de levadura o medios de cultivo mínimos con concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  superiores a 5 mM; D.O en fase estacionaria = 2,3), siendo ligeramente inferior en medios con  $\text{NO}_2^-$  o sin fuente de nitrógeno.

Tanto la actividad Nas como la NiR se detectaron en medios con  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y sin fuente de nitrógeno, por lo que la inducción de las mismas no depende de la naturaleza de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. Estos resultados ponen de manifiesto la presencia de unos niveles basales de actividad Nas y NiR asimilativa en ausencia de fuente de nitrógeno. No obstante, existe un claro efecto potenciador de las actividades enzimáticas cuando la fuente de nitrógeno presente, es el sustrato correspondiente. Así, la actividad Nas en medios con  $\text{NO}_3^-$  es un 79 % superior a la detectada en medios con  $\text{NO}_2^-$ , mientras que la actividad NiR asimilativa en medios con  $\text{NO}_2^-$  supera en un 81% a la actividad NiR detectada en medios con  $\text{NO}_3^-$ . Este comportamiento, también ha sido descrito en cianobacterias fijadoras y no fijadoras de  $\text{N}_2$ . En muchos de estos organismos, no es necesaria la presencia de  $\text{NO}_3^-$  para la inducción de la actividad NR (Herrero *et al.*, 1981; Herrero *et al.*, 1985; Blanco Mediavilla, 1992), a pesar de que el  $\text{NO}_3^-$  ejerce un efecto positivo sobre la enzima (Herrero *et al.*, 1984). Así mismo, el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{NO}_2^-$  tienen un efecto positivo sobre la actividad NiR, pero su presencia no es imprescindible para la expresión de la NiR en cianobacterias como *Anacystis nidulans* (Herrero y Guerrero, 1986), *Anabaena* sp. 7119 (Méndez y Vega, 1981) o *Phormidium laminosum* (Arizmendi, 1989).

En *Phormidium laminosum*, por ejemplo, los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa detectados en ausencia de nitrógeno se han explicado en base a un control mediado por el balance C/N celular (Fresnedo, 1991). Durante la deficiencia de nitrógeno, las células almacenan una gran cantidad de carbohidratos, de manera que

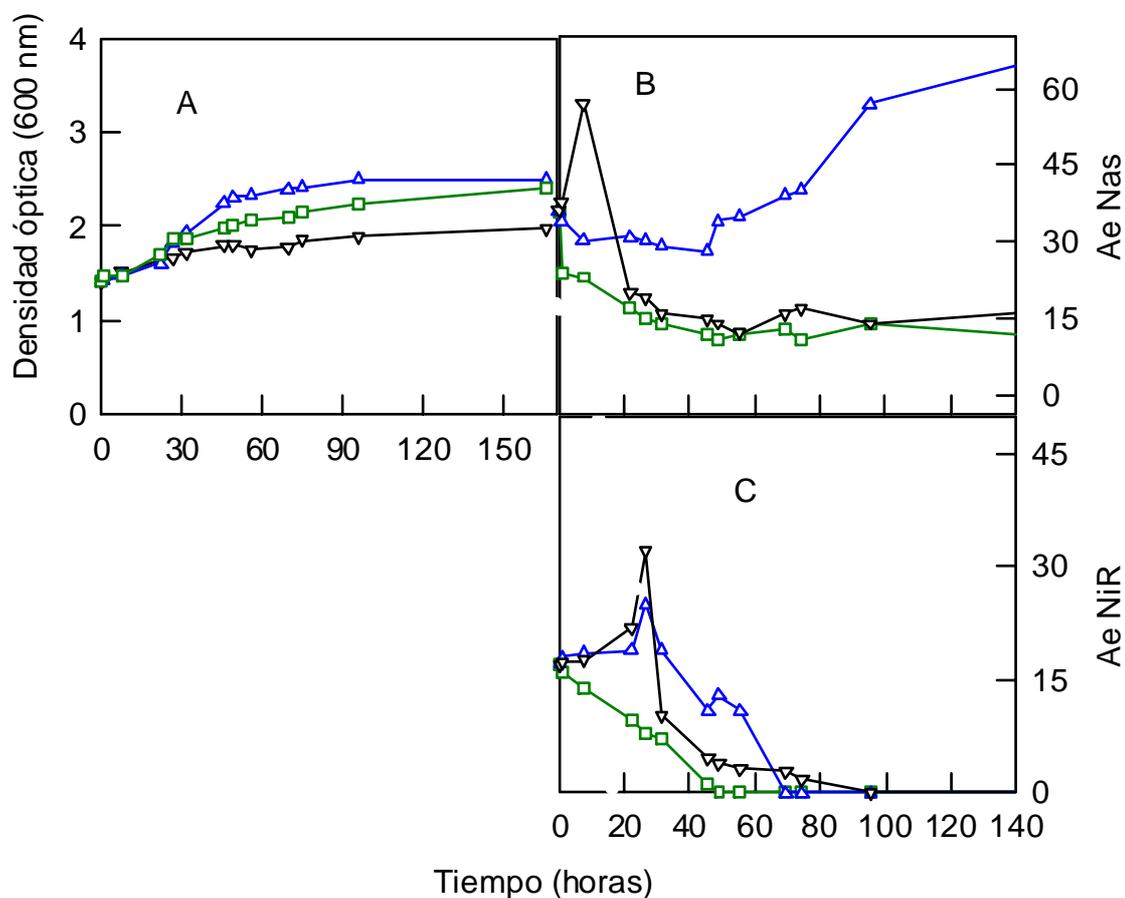
aumenta el cociente C/N. Al mismo tiempo, estas células manifiestan una elevada capacidad para asimilar diferentes formas de nitrógeno orgánico. Así, cuando las células vuelven a disponer de nitrógeno inorgánico, lo asimilan a gran velocidad independientemente de la disponibilidad de carbono en el medio, ya que los carbohidratos acumulados durante el período de deficiencia pueden sustituir a los productos recientes de la fijación del CO<sub>2</sub> en la asimilación del nitrógeno (Fresnedo, 1991; Ochoa de Alda *et al.*, 1995).

#### **4.5-. INFLUENCIA DEL CAMBIO DE FUENTE DE NITRÓGENO. AUSENCIA DE NITRÓGENO.**

##### ***4.5.1-. TRANSFERENCIA DE CÉLULAS A MEDIOS DE CULTIVO CON UNA FUENTE DE NITRÓGENO.***

Células de *Haloferax mediterranei* se cultivaron en medio mínimo con 100 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta la mitad de la fase exponencial, momento en el que se detectan los mayores niveles de las actividades Nas y NiR asimilativas. Tras ser cosechadas y lavadas, las células se transfirieron a medios de cultivo con 2 mM de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 25 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 100 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o bien a medios sin fuente de nitrógeno.

Como se aprecia en la figura 4.8, la D.O de los cultivos con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y con NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en fase estacionaria es idéntica; sin embargo, la D.O alcanzada en el medio de cultivo sin fuente de nitrógeno es prácticamente nula. El crecimiento en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (figura 4.9, pág. 56) es considerablemente inferior (D.O máxima = 1,23).



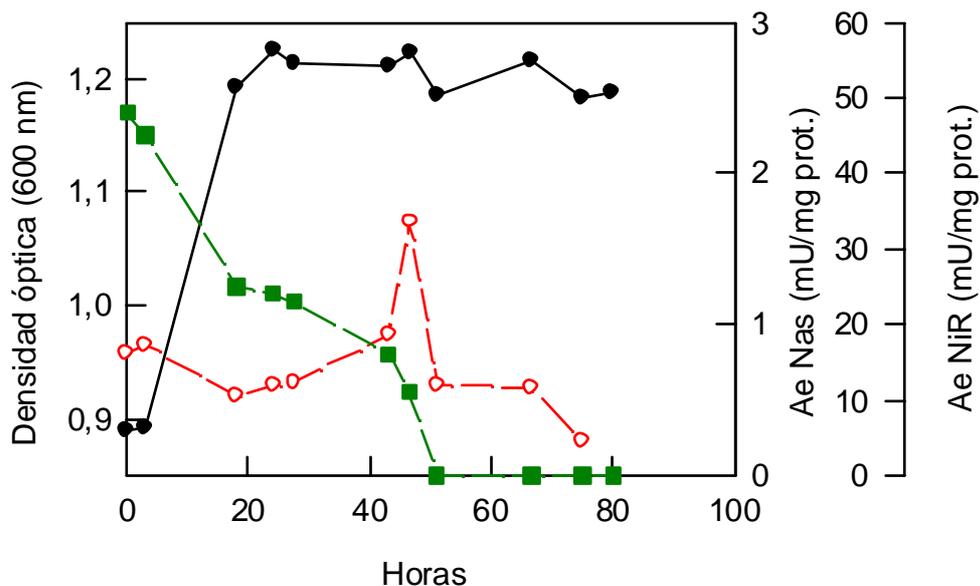
**Figura 4.8.** Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios con 25 mM  $\text{NO}_3^-$  ( $\Delta$ ), 100 mM  $\text{NH}_4^+$  ( $\square$ ) o a medios carentes de nitrógeno ( $\nabla$ ). A: curvas de crecimiento; B: actividad Nas (mU/mg prot.); C: actividad NiR (mU/mg prot.).

En cuanto a las actividades enzimáticas, se experimenta un incremento de las mismas cuando las células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  son transferidas a medios sin fuente de N o con una  $[\text{NO}_3^-]$  inferior a la de partida (figura 4.8.B y 4.8.C). Dicho incremento

también descrito en *Phormidium laminosum* (Ochoa de Alda *et al.*, 1995), puede ser debido a una adaptación de las células al déficit de nitrógeno, en un intento por sobrevivir en medios con escasa o nula presencia de nitrógeno. La actividad NiR es un 22% superior en ausencia de nitrógeno, respecto al medio con  $\text{NO}_3^-$ . La actividad Nas detectada en el medio sin fuente de nitrógeno (a las 7 horas de la transferencia) es un 47 % más elevada que la detectada en medios con 25 mM de  $\text{NO}_3^-$ , en el mismo intervalo de tiempo. Posteriormente, la actividad Nas decae en ausencia de nitrógeno, mientras que en medios con 25 mM de  $\text{NO}_3^-$  dicha actividad aumenta, debido al efecto positivo del  $\text{NO}_3^-$ .

Por contra, los niveles de actividad Nas y NiR asimilativa disminuyen si las células se transfieren a medios con  $\text{NH}_4^+$ . La actividad Nas no es inhibida por completo, pues al cabo de 100 horas de la transferencia se detecta una actividad residual (basal). La actividad NiR se anula por completo tras 50 horas de incubación en presencia de  $\text{NH}_4^+$ . Este comportamiento coincide con el descrito para cianobacterias (Tapia *et al.*, 1996).

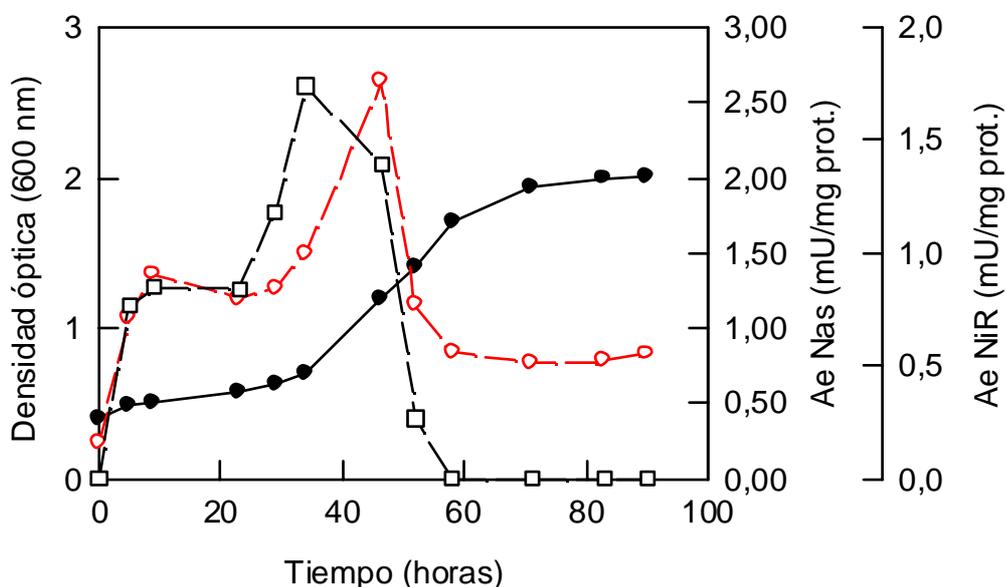
Cuando las células crecidas en  $\text{NO}_3^-$  se transfieren a medios con 2 mM de  $\text{NO}_2^-$  (figura 4.9, pág. 56), se observa un ligero descenso de la actividad Nas, previo a un aumento de dicha actividad a las 46 horas de incubación.



**Figura 4.9.** Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios 2 mM  $\text{NO}_2^-$ . Densidad óptica (●), actividad específica Nas (○) y actividad específica NiR (■).

El  $\text{NO}_2^-$  es un inhibidor competitivo del transporte de  $\text{NO}_3^-$  (Rodríguez *et al.*, 1992); este hecho podría explicar el descenso inicial de actividad Nas. La escasez de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo podría provocar el incremento de actividad Nas que se observa posteriormente. Dicho incremento sería equivalente al mostrado en medios de cultivo sin fuente de nitrógeno.

Por otro lado, en las células crecidas en 100 mM amonio (inhibición de ambas actividades) que se transfieren a medios de cultivo con 5 mM  $\text{NO}_3^-$ , se observa un aumento progresivo de los niveles de actividad Nas y NiR hasta que el cultivo alcanza la mitad de la fase exponencial (figura 4.10). Estos resultados demuestran que la inhibición por amonio es reversible, como ya se demostrara para cianobacterias (Flores *et al.*, 1983a).



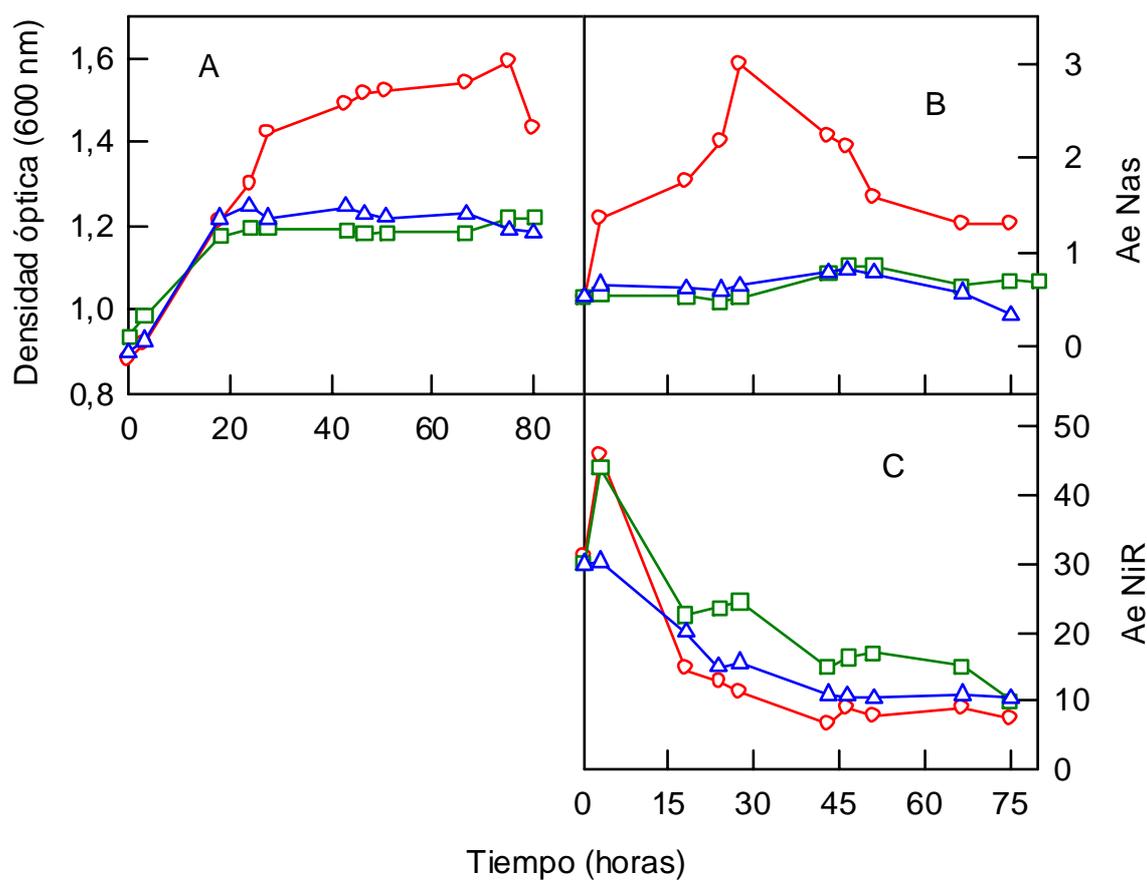
**Figura 4.10.** Recuperación de las actividades Nas y NiR tras la eliminación del amonio. En las células que fueron transferidas a medios con 100 mM  $\text{NH}_4^+$  no se detectó actividad Nas ni NiR en fase estacionaria. Tras cosecharlas y lavarlas, se transfirieron a medios frescos con 5 mM  $\text{NO}_3^-$ . Densidad óptica (●), actividad específica Nas (○) y actividad específica NiR (□).

**4.5.2-. TRANSFERENCIA DE CÉLULAS A MEDIOS DE CULTIVO CON DOS FUENTES DE NITRÓGENO.**

Células de *Haloferax mediterranei* se cultivaron en medio mínimo con 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta la mitad de la fase exponencial. Tras ser cosechadas y lavadas, se transfirieron a medios de cultivo con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  + 2 mM de  $\text{NO}_2^-$ , 2 mM  $\text{NH}_4^+$  + 2 mM de  $\text{NO}_2^-$ , o bien a medios de cultivo con 5 mM de  $\text{NO}_3^-$  + 5 mM de  $\text{NH}_4^+$ .

El amonio es capaz de impedir la entrada de  $\text{NO}_3^-$  al interior celular cuando es adicionado al medio de cultivo, pero en períodos prolongados de incubación, el amonio modifica los niveles celulares de las enzimas que participan en la ruta de asimilación del nitrógeno (Flores *et al.*, 1983a).

Como se muestra en la figura 4.11 hubo más crecimiento celular en medios con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  (0,4 unidades de absorbancia por encima de los máximos alcanzados en los otros dos casos). La actividad Nas mostró un incremento considerable en medios con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , durante las primeras 28 horas de incubación tras las cuales, descendió considerablemente. En medios con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  ó  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , la actividad Nas se mantuvo prácticamente constante.



**Figura 4.11.** Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios con 5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (○), 2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 2 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (□) o a medios con 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + 2 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Δ). A: curvas de crecimiento; B: actividad específica Nas (mU/mg prot.); C: actividad específica NiR (mU/mg prot.).

La actividad NiR asimilativa incrementó en medios con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ó NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en las 3 horas siguientes a la transferencia de las células; seguidamente se observó un descenso de la misma. El perfil de actividad NiR en ambos medios es idéntico, pero los niveles de actividad en presencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> son superiores, debido al efecto positivo que probablemente ejerce éste sobre la NiR. En medios con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, la actividad NiR fue descendiendo progresivamente.

Al final de la fase exponencial se cuantificó la concentración de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  presente en los medios de cultivo con el fin de estimar el consumo y las preferencias por una u otra fuente de nitrógeno.

<i>Composición inicial</i>	<i>[NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mM)</i>	<i>[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] (mM)</i>	<i>[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] (mM)</i>
2 mM $\text{NO}_3^-$ + 2 mM $\text{NO}_2^-$	1,60 ± 0,04	1,80 ± 0,03	---
2 mM $\text{NH}_4^+$ + 2 mM $\text{NO}_2^-$	---	1,70 ± 0,03	1,5 ± 0,1
5 mM $\text{NO}_3^-$ + 5 mM $\text{NH}_4^+$	4,50 ± 0,04	---	3,7 ± 0,1

**Tabla 4.4.** Variaciones en las concentraciones finales de nitrato, nitrito y amonio tras el crecimiento de *Haloferax mediterranei* hasta fase estacionaria. Los valores corresponden a las medias obtenidas tras la realización del experimento por triplicado.

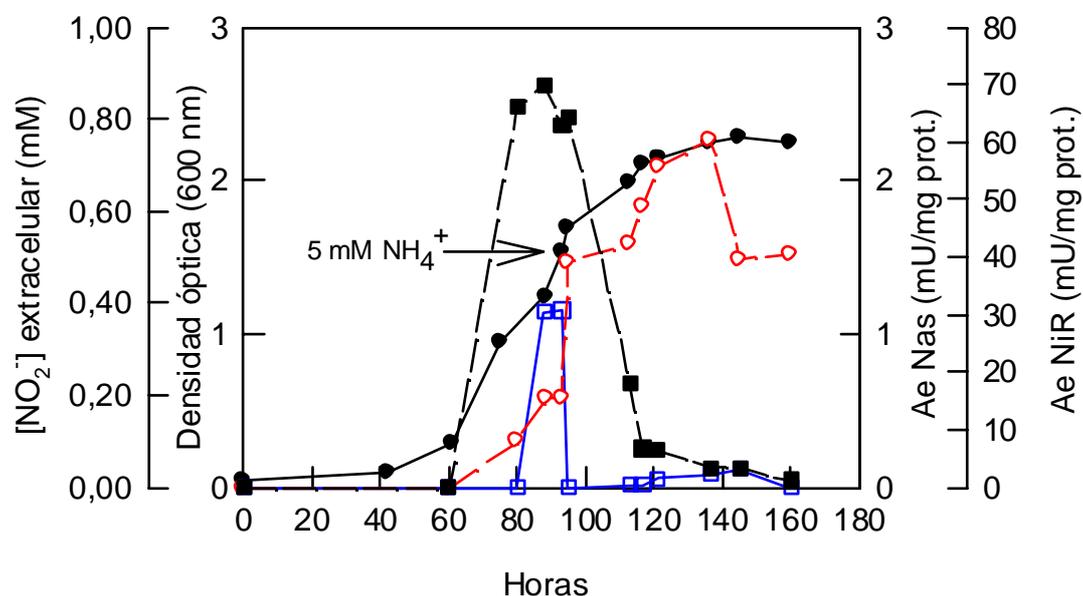
De los resultados recogidos en la tabla anterior podemos deducir que *Haloferax mediterranei* muestra preferencia por el  $\text{NH}_4^+$  cuando éste se encuentra en el medio junto con el  $\text{NO}_3^-$ . Son numerosos los estudios que verifican la preferencia por el  $\text{NH}_4^+$  en organismos de muy diferente naturaleza, ya que como se ha mostrado, la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  inhibe la asimilación del  $\text{NO}_3^-$  (Taguchi y Kinzic, 2001; Tapia *et al.*, 1996; Eppley *et al.*, 1969). En presencia de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$  también existe una preferencia por  $\text{NH}_4^+$ .

Si en el medio de cultivo se encuentran  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  conjuntamente, se consume preferentemente el primero. La destacada asimilación de  $\text{NO}_3^-$  respecto del  $\text{NO}_2^-$ , podría explicar, al menos en parte, porqué no se inhibe el crecimiento celular de *Haloferax mediterranei* en medios con 100 mM  $\text{NO}_3^-$  y 15 mM  $\text{NO}_2^-$  (excretado al medio de cultivo) (apartado 4.3 pág. 48). Además se debe tener en cuenta, que en este caso concreto (100 mM  $\text{NO}_3^-$  y 15 mM  $\text{NO}_2^-$ ), la elevada concentración de nitrato, en comparación con la de nitrito,

podría ejercer un efecto positivo sobre las actividades Nas y NiR como se detalla en el apartado 4.4. (pág. 51).

#### 4.6-. REABSORCIÓN DE NITRITO PROVOCADA POR LA ADICIÓN DE AMONIO A CÉLULAS CRECIDAS EN MEDIOS DE CULTIVO CON NITRATO.

Se incubaron células de *Haloferax mediterranei* en medio mínimo con 100 mM  $\text{NO}_3^-$  hasta la mitad de la fase exponencial (D.O =1,2), momento en que los niveles de actividad Nas y NiR asimilativa son máximos. Seguidamente el medio de cultivo se dividió en dos: medios A (figura 4.12) y medios B (figura 4.14, pág. 64). En el medio A se adicionó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una concentración final de 5 mM y se realizó un seguimiento de las actividades, crecimiento celular y  $\text{NO}_2^-$  excretado (figura 4.12).



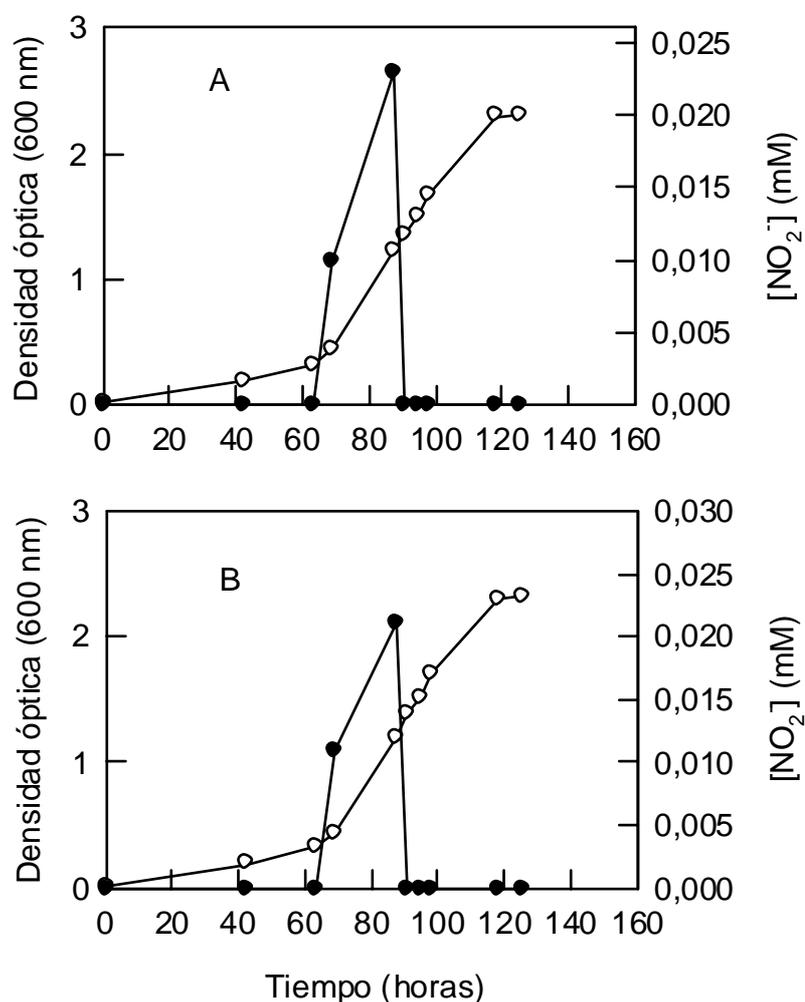
**Figura 4.12.** Efecto de la adición de 5 mM de sulfato amónico en un medio mínimo con 100 mM  $\text{NO}_3^-$ . Densidad óptica (●), actividad Nas (○), actividad NiR (■) y  $\text{NO}_2^-$  excretado al medio (□).

El  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se adicionó (5 mM concentración final) cuando la concentración de  $\text{NO}_2^-$  excretado al medio alcanzó un valor de 0,38 mM. Tras la adición del sulfato amónico, la excreción de  $\text{NO}_2^-$  cesó y el  $\text{NO}_2^-$  excretado fue reabsorbido (figura 4.12).

A pesar de la adición de amonio, se detectó actividad NiR 60 horas después de la adición de éste al medio de cultivo. La reabsorción del  $\text{NO}_2^-$  excretado es, posiblemente, la responsable del desarrollo de dicha actividad NiR durante tanto tiempo, aún en presencia de  $\text{NH}_4^+$ . La actividad Nas incrementó progresivamente, debido a la elevada concentración de  $\text{NO}_3^-$  presente en el medio. El  $\text{NH}_4^+$  tiene un efecto negativo en el transporte de  $\text{NO}_2^-$ , pero el  $\text{NO}_2^-$  puede difundir como ácido nitroso ( $\text{pK}_a = 3,4$ ) hacia el citoplasma en presencia de  $\text{NH}_4^+$  (Tapia *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 1987). Además, el  $\text{NO}_2^-$  inhibe el transporte de  $\text{NO}_3^-$  (Rodríguez *et al.*, 1992). Ambos hechos podrían explicar la reabsorción de  $\text{NO}_2^-$  que tiene lugar en presencia de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

Es posible que el desequilibrio en el balance C/N genere la reabsorción del  $\text{NO}_2^-$ , pues además del amonio adicionado, la concentración de nitrato presente (100 mM) es muy elevada (comunicación personal del Dr. J. L. Serra). Flores *et al.* (1983b) propusieron un modelo que explica cómo el consumo de nitrato está fuertemente controlado por el balance C/N para cianobacterias. Según este modelo, el consumo de nitrato está inhibido por compuestos nitrogenados derivados de la asimilación del amonio. La concentración de dichos compuestos inhibidores viene dada por la velocidad de incorporación del amonio a esqueletos carbonados (esqueletos que son proporcionados por la IDH), por un lado, y del suministro de productos derivados de la fijación de  $\text{CO}_2$  (en cianobacterias), por otro (apartado 4.4., pág. 51-53). Para determinar si la reabsorción de  $\text{NO}_2^-$  está provocada por un desajuste en el balance C/N, se adicionó 5 mM de amonio a medios de cultivo con 5 mM de  $\text{NO}_3^-$  (se disminuye la

concentración total de nitrógeno para igualarla a la de glucosa). Además de cuantificar la cantidad de  $\text{NO}_2^-$  presente en el medio de cultivo en diferentes fases de su crecimiento, se realizaron medidas de actividad IDH. En estos ensayos (en los que se ha disminuido considerablemente la concentración total de nitrógeno), también se desarrolló la reabsorción de  $\text{NO}_2^-$  tanto si se añadía 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como si se adicionaba 5 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (figura 4.13). La actividad IDH fue prácticamente indetectable.

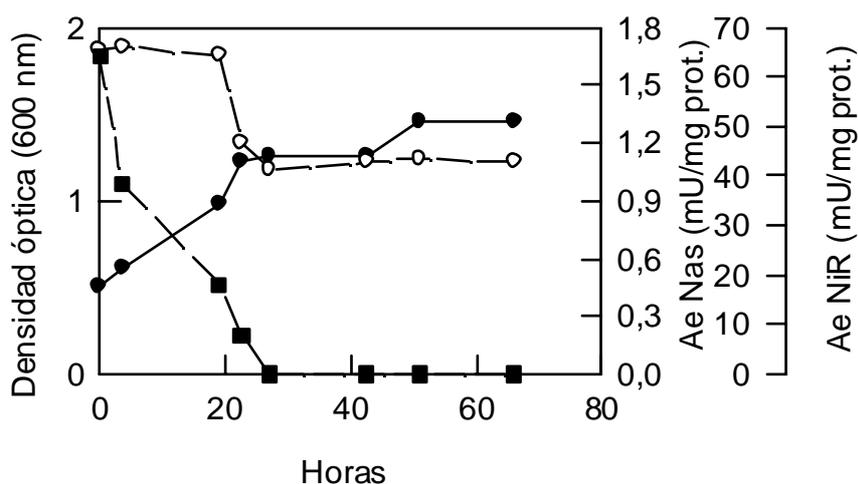


**Figura 4.13.** Efecto de la adición de 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A) o 5 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (B) en medios mínimos con 5 mM  $\text{NO}_3^-$ .  $\text{NO}_2^-$  excretado al medio ( $\bullet$ ) y densidad óptica (O).

Estos resultados, podrían indicar que en presencia de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  se consume preferentemente el primero (tabla 4.4 pág. 60). Si la incorporación de derivados de su asimilación es baja (la escasa actividad IDH hace que el suministro de esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos sea lento), dichos derivados podrían actuar de forma negativa sobre el consumo de nitrato. Esta situación podría ser la causante de la reabsorción del  $\text{NO}_2^-$  excretado.

Las células del medio B fueron cosechadas, lavadas y transferidas a un medio de cultivo que tenía 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como única fuente de nitrógeno. El seguimiento del crecimiento, así como de los niveles de actividad Nas y NiR, mostraron resultados que refuerzan el efecto inhibitor del amonio sobre la vía asimilativa que ya se ha expuesto en el apartado 4.5.

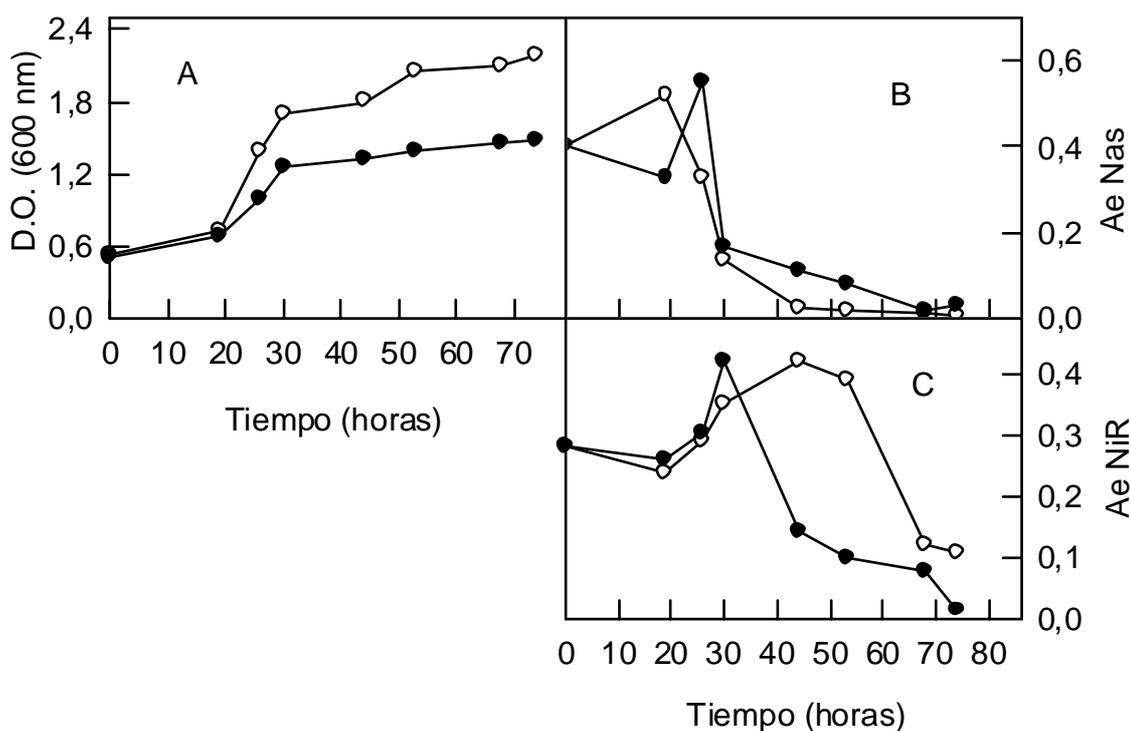
Mientras que la actividad NiR se detectaba tras 60 horas de incubación en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , por la reabsorción de  $\text{NO}_2^-$  (figura 4.12, pág. 61), en presencia de  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de nitrógeno, la actividad NiR se inhibe por completo a las 20 horas de la transferencia de las células al medio fresco con  $\text{NH}_4^+$  (figura 4.14).



**Figura 4.14.** Células crecidas en medio mínimo con 100 mM  $\text{NO}_3^-$  hasta la mitad de la fase exponencial fueron transferidas a un medio mínimo con 5 mM  $\text{NH}_4^+$ . Densidad óptica (●), actividad Nas (O) y actividad NiR (■).

## 4.7.-. EFECTO DEL MSX EN LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

La asimilación del amonio se bloquea con inhibidores de GS y GOGAT tales como el MSX o la azaserina (Shapiro y Stadtman, 1970; Arizmendi, 1989). Hasta el momento no se han purificado ni caracterizado ambas actividades en arqueas halófilas; sin embargo si hay estudios sobre GDH obtenidas a partir de estos organismos (Ferrer, 1995). Con el objetivo de analizar el efecto del MSX sobre las actividades Nas y NiR asimiltiva de *Haloferax mediterranei*, dicho inhibidor se adicionó a cultivos con  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$ . Los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.15.



**Figura 4.15.** Efecto del MSX sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a tiempo 0, a medios con 5 mM  $\text{NH}_4^+$  + MSX (●) o medios con 5 mM  $\text{NO}_3^-$  + MSX (○). A: curvas de crecimiento; B: actividad específica Nas (mU/mg prot.); C: actividad específica NiR (mU/mg prot.).

Como se aprecia en la figura 4.15.A, el crecimiento de *Haloferax mediterranei* en presencia de MSX fue inferior al desarrollado en medio mínimo sin MSX (D.O = 2,3-2,4). En medios con  $\text{NH}_4^+$  ó  $\text{NO}_3^-$  que contienen además MSX, las actividades Nas y NiR aumentaron (figura 4.15.B y 4.15.C). Ambas actividades alcanzaron niveles similares en medios con  $\text{NO}_3^-$  o con  $\text{NH}_4^+$ . Estos datos podrían estar mostrando, de forma indirecta, la existencia de actividad GS en *Haloferax mediterranei*. El aumento de las actividades Nas y NiR asimilativa, en estas condiciones, podría ser una adaptación celular. Así, es posible pensar que la inhibición de la síntesis de glutamina (MSX) provoca un aumento de los niveles de actividad de las primeras enzimas de la reducción asimilativa del nitrógeno (Nas y NiR), en un intento por suplir la falta de glutamina. De hecho, en la cianobacteria *Phormidium laminosum* (Tapia *et al.*, 1995) así como en enterobacterias, se ha descrito un sistema de regulación de la reducción asimilativa del nitrógeno en condiciones de stress, basado en las variaciones del balance  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina intracelular.

El efecto del MSX sobre las actividades que se ha observado es, por tanto, similar al descrito en *Phormidium laminosum* (Tapia *et al.*, 1995; Tapia *et al.*, 1996) y *Plectonema boryanum* (Kikuchi *et al.*, 1996).

La adición de MSX a los cultivos de *Haloferax mediterranei* provocó una reversión del efecto negativo que tiene el amonio sobre la asimilación del  $\text{NO}_3^-$ , por lo que deducimos que la glutamina o un metabolito relacionado con ésta, más que el amonio, actúa como represor de la asimilación del  $\text{NO}_3^-$  (Flores *et al.*, 1983a; Tapia *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1996). En *Phormidium laminosum* se ha propuesto que la inhibición de la asimilación del  $\text{NO}_3^-$  se debe a la presencia de la forma no activa de la GS y no a la glutamina *per se*. Si la glutamina está presente en el medio, pero la GS no es activa, se observa un incremento considerable de las actividades NR y NiR (Tapia *et al.*,

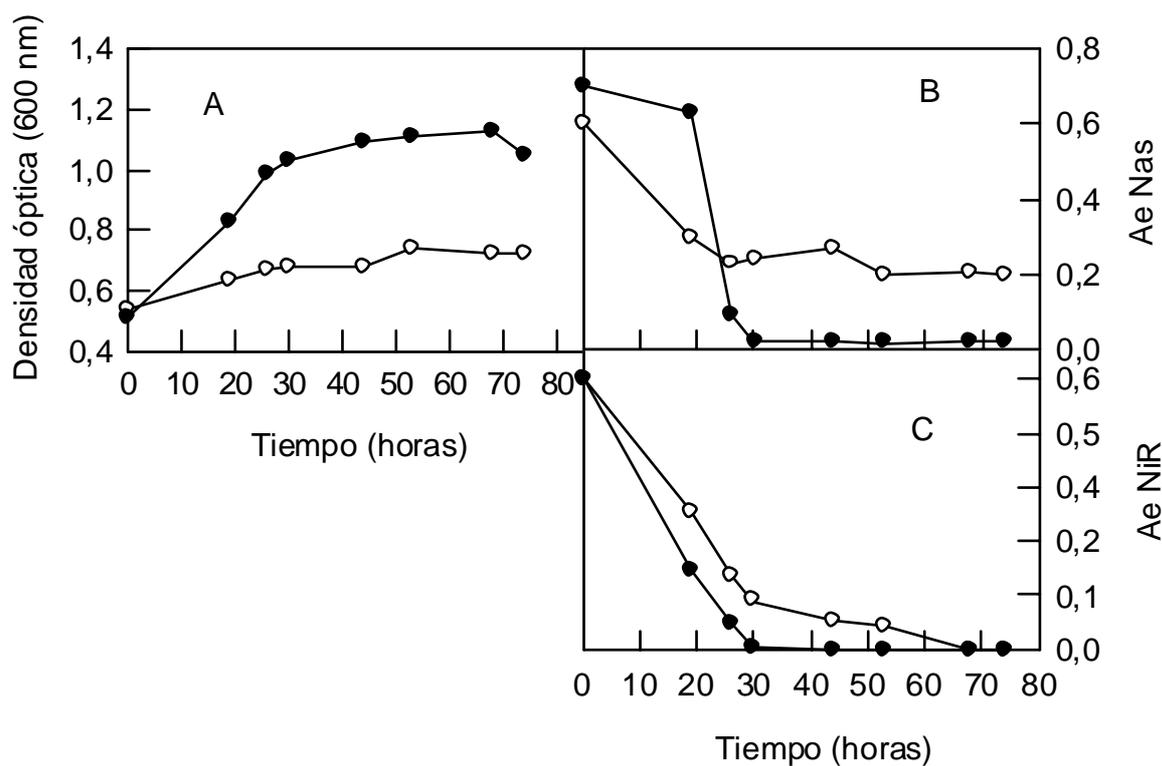
1995). Otros estudios apuntan que el cianato, producto del metabolismo de la glutamina, actúa como un regulador de la asimilación de nitrógeno, mediante la represión del operón nirA (Suzuki *et al.*, 1993).

#### 4.8-. EFECTO DEL CLORANFENICOL.

El cloranfenicol es un inhibidor de la síntesis de proteínas (Tapia *et al.*, 1996) que puede actuar a dos niveles: reprimiendo de forma directa la actividad peptidil transferasa asociada a la subunidad grande del rRNA (Noller, 1993), o bien potenciado la síntesis de péptidos específicos que se unen a la subunidad grande del rRNA, modificando la estructura secundaria de la misma (Harrod y Lovett, 1997).

Ambos niveles de actuación son independientes. Así, en *Saccharomyces cerevisiae* la actividad peptidil transferasa es insensible a cloranfenicol, pero queda inhibida por péptidos específicos cuya síntesis es inducida por el antibiótico. Sin embargo, en *Halobacterium halobium* y *Escherichia coli* la actividad peptidil transferasa es inhibida por el antibiótico y por péptidos específicos (Gu *et al.*, 1994; Harrod y Lovett, 1997).

Se ha descrito que *Haloferax mediterranei* es insensible al cloranfenicol a una concentración de 30 mg/l (Balows *et al.*, 1991). Sin embargo, en presencia de concentraciones más altas (50 mg/l), se ha observado que el crecimiento celular se detiene. Para estudiar el efecto del cloranfenicol sobre las actividades Nas y NiR asimilativas de *Haloferax mediterranei*, dicho antibiótico (50 mg/l) se adicionó a medios de cultivo que contenían 5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El comportamiento de las actividades así como el crecimiento desarrollado en presencia de cloranfenicol se comparó con la inhibición provocada por el amonio (figura 4.16).



**Figura 4.16.** Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a tiempo 0 a medios con 5 mM  $\text{NH}_4^+$  (●) o medios con 5 mM  $\text{NO}_3^-$  + cloranfenicol (50 mg/l) (○). A: curvas de crecimiento; B: actividad Nas (mU/mg prot.); C: actividad NiR (mU/mg prot.).

El crecimiento con  $\text{NO}_3^-$  en presencia de cloranfenicol fue prácticamente nulo. La actividad Nas fue parcialmente reprimida en presencia de cloranfenicol (el descenso de actividad se produjo durante las primeras 20 horas de incubación). En medios de cultivo con  $\text{NH}_4^+$  tampoco se desarrolla una inhibición completa de la actividad Nas (la actividad residual Nas detectada en presencia de amonio ya ha sido comentada en el apartado 4.5.1, figura 4.8, pág. 54). Estos resultados ponen de manifiesto que la regulación de la actividad Nas, no sólo se desarrolla a nivel de la síntesis de proteínas.

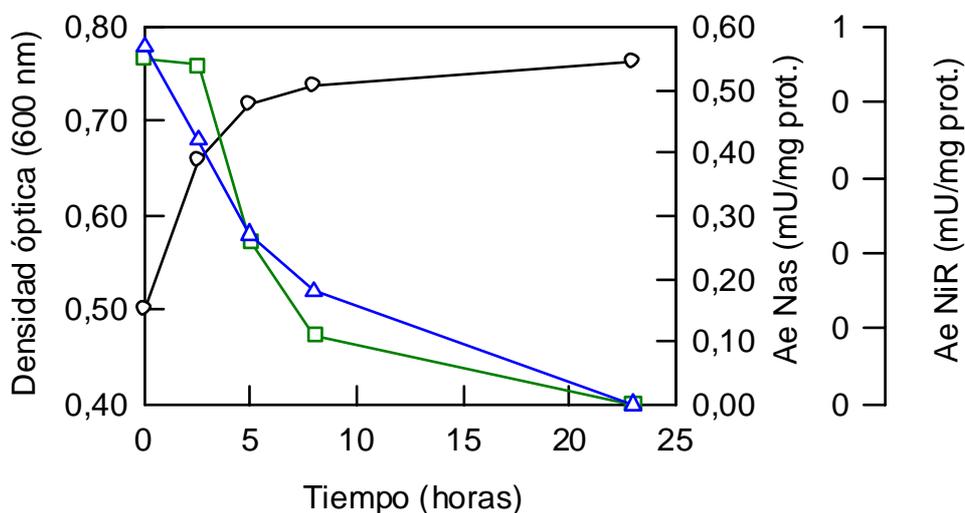
Diversas investigaciones en plantas, han puesto de manifiesto la existencia de regulación de la actividad Nas mediante fosforilación reversible (espinacas) o a través de fosforilación y proteólisis conjuntamente (*Arabidopsis thaliana*) (Mackintosh y Meek, 2001).

La actividad NiR se inhibe totalmente en presencia de cloranfenicol y en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , pero los niveles de actividad en medios con  $\text{NO}_3^-$  y cloranfenicol, fueron ligeramente superiores a los detectados en medios con  $\text{NH}_4^+$ . Por tanto, si el efecto negativo del amonio sobre la actividad NiR es similar al provocado por el cloranfenicol, es posible que el amonio reprima directamente la síntesis de NiR. En *Phormidium laminosum* también se ha descrito que el amonio y el cloranfenicol ejercen efectos similares sobre la actividad NiR (Arizmendi, 1989). No obstante, no se puede desestimar la existencia de regulación de la actividad NiR de *Haloferax mediterranei* mediante proteólisis específica, aunque hasta la fecha no existen estudios al respecto en arqueas halófilas.

#### 4.9-. EFECTO DE LA RIFAMPICINA.

La rifampicina es un antibiótico que impide la transcripción de DNA, cuyo efecto ha sido ampliamente descrito en el dominio *Archaea* (Watrin *et al.*, 1996; Asker y Ohta, 2002). El crecimiento de *Haloferax mediterranei* en presencia de rifampicina a una concentración de 10 mg/l no se ve afectado (Balows *et al.*, 1991), pero si se aumenta la concentración en torno a 30 mg/l, sí se observan efectos adversos (Bawlow *et al.*, 1991). Con el fin de analizar el efecto de la rifampicina sobre los niveles de actividad Nas y NiR de *Haloferax mediterranei*, dicho antibiótico se adicionó (50 mg/l) a medios de cultivo con 5 mM  $\text{NO}_3^-$ . Los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.17.

Como cabía esperar, en presencia de rifampicina apenas se desarrolló crecimiento celular. Ambas actividades descendieron progresivamente hasta anularse por completo.



**Figura 4.17.** Efecto de la rifampicina sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, fueron lavadas y transferidas a medios con 5 mM  $\text{NO}_3^-$  + rifampicina (50 mg/l). Densidad óptica (O), actividad Nas (□) y NiR (Δ).

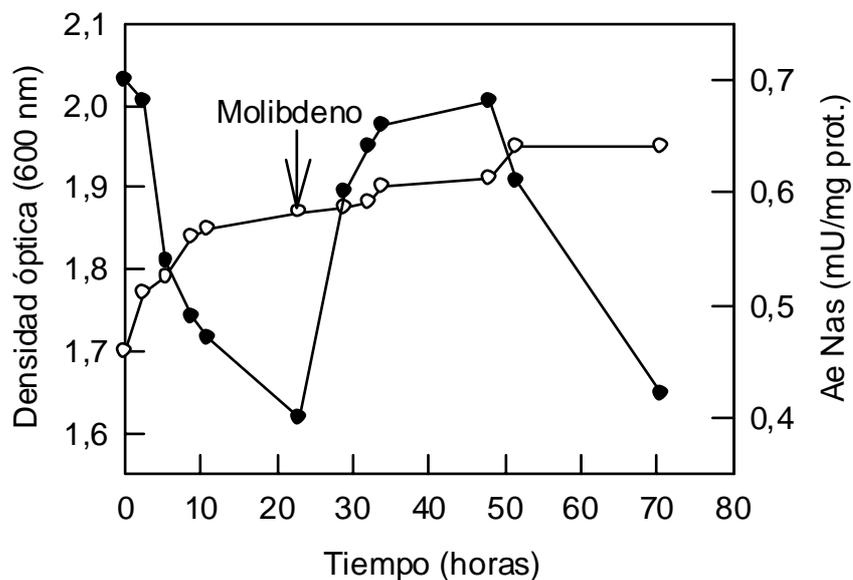
En cianobacterias como *Phormidium laminosum*, se detecta un incremento de actividad NR en presencia de rifampicina en células en las que se provocó previamente la inducción de dicha actividad (Tapia *et al.*, 1995). En esta cianobacteria, dicho comportamiento se interpreta como un incremento de actividad no dependiente de la transcripción de DNA, que puede deberse a la acumulación de mRNA que codifica para la NR durante un período previo de limitación de nitrógeno.

#### 4.10-. EFECTO DEL WOLFRAMIO EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y EN LA ACTIVIDAD Nas.

El wolframio y el molibdeno son metales de transición de gran importancia, ya que forman parte de un gran número de enzimas que catalizan reacciones redox. Ambos metales se encuentran en el centro activo de las enzimas que los contienen y se hallan unidos a una pterina formando un complejo denominado **MoCo** (Mendel, 1997).

De forma general, se distinguen dos grandes familias de enzimas que contienen molibdeno: la familia de las nitrogenasas y la familia que agrupa el resto de molibdoenzimas. El descubrimiento de las arqueas hipertermofílicas puso de manifiesto la existencia de wolframio en los complejos MoCo, en lugar de molibdeno. Aunque la estructura del complejo MoCo es similar en ambos casos (molibdeno o wolframio), la sustitución de un metal por otro da lugar a formas de las enzimas que son inactivas (McMaster y Enemark, 1998).

Con el objetivo de estudiar el efecto del wolframio sobre la actividad Nas, *Haloferax mediterranei* se cultivó en medio mínimo con 100 mM  $\text{NO}_3^-$  hasta mitad de la fase exponencial, momento en que los valores de actividad Nas y NiR son elevados. Posteriormente se adicionó wolframio hasta una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , lo que provocó un descenso considerable de la actividad Nas, además de una disminución de la velocidad de crecimiento. La adición posterior de 200  $\mu\text{M}$  de molibdeno generó un incremento de la actividad Nas hasta alcanzar valores muy próximos a los iniciales (figura 4.18).



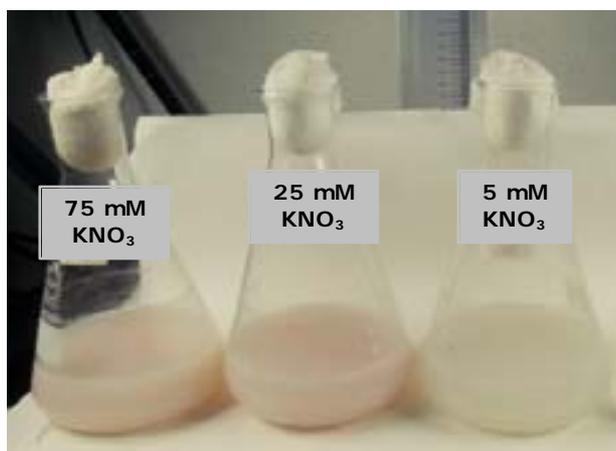
**Figura 4.18.** Efecto del wolframio y el molibdeno en el crecimiento y en la actividad Nas. A tiempo cero se añadió 100  $\mu\text{M}$  de wolframio a células cultivadas en medio mínimo con 100  $\text{mM}$   $\text{NO}_3^-$ . La flecha indica el momento en que se adicionó molibdeno hasta una concentración final de 200  $\mu\text{M}$ . Actividad Nas (●) y curva de crecimiento celular (O).

Estos resultados constituyen una evidencia de que la nitrato reductasa asimilativa de *Haloferax mediterranei* es una enzima que contiene molibdeno, al igual que la mayor parte de nitrato reductasas asimilativas que se han caracterizado (Blanco Mediavilla, 1992; Afshar *et al.*, 2001).

En las nitrato reductasas (que contienen molibdeno), el wolframio provoca un desplazamiento del molibdeno al ligarse a la molibdoterina (Kletzin y Adams, 1996), pero no actúa como catalizador en la reducción de  $\text{NO}_3^-$ . Este desplazamiento podría explicar el descenso de actividad Nas detectado en presencia de wolframio.

#### 4.11-. MODIFICACIÓN EN LA SÍNTESIS DE BACTERIORUBERINAS EN FUNCIÓN DEL pH DEL MEDIO DE CULTIVO. EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO.

Durante el crecimiento de *Haloferax mediterranei*, en medios con diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , se apreciaron considerables cambios en el color de las células. Éstas manifestaban un color rosa más intenso en aquellos medios de cultivo con elevadas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  (figura 4.19). Puesto que en el género *Haloferax* no hay síntesis de bacteriorodopsina (Oren y Gurevich, 1993), el color rosado se debe a la existencia de bacterioruberinas en la membrana. Identificamos estos pigmentos mediante su espectro de absorción característico, con picos de máxima absorción a 530, 495, 470 y 389 nm en acetona (D'Souza *et al.*, 1997).



**Figura 4.19.** Cultivos de *Haloferax mediterranei* en medio mínimo con diferentes concentraciones de nitrato. Todos ellos tienen una densidad óptica en fase estacionaria entorno a 2,4.

Las bacterioruberinas protegen a las células de la radiación UV, participan en la estabilización de las membranas (Kates y Kushwaha, 1978) y reducen los efectos letales de agentes oxidantes sobre el DNA (Shahmohammadi *et al.*, 1998). Así mismo, en *Haloferax mediterranei* se ha descrito un incremento en la síntesis de bacterioruberinas, como respuesta al estrés causado por bajas concentraciones de NaCl (< 20 %) (D'Souza *et al.*, 1997).

Estudios con células de *Halobacterium cutirubrum* (actualmente se ha incluido en la especie *Halobacterium salinarum*; Oren, 2002) muestran que las C<sub>50</sub>- bacterioruberinas se sintetizan mediante la adición de una unidad de isopreno-C<sub>5</sub> a cada uno de los extremos de la cadena C<sub>40</sub>-licopeno, seguida de la introducción de cuatro grupos hidroxilo (Huang y Huang, 1974).

El nitrógeno no está presente en las cadenas isoprenoides de los lípidos de arqueas, luego el incremento en la pigmentación que observamos en las células de *Haloferax mediterranei*, no se debe al nitrógeno "*per se*". Atendiendo al papel desempeñado por las bacterioruberinas en las células, podríamos considerar que el aumento de color se debe a cambios en la temperatura, exposición a la luz o a cambios en el pH. Como *Haloferax mediterranei* se cultivó a temperatura constante (37 °C) y exposición de luz continua, sólo el pH podría ser el responsable del aumento de la síntesis de bacterioruberinas en las membranas, pues la concentración de sal fue prácticamente constante.

Como se discute en el apartado 4.1 (págs. 38-42), existe una modificación del pH de los medios de cultivo, que podría ser debida a dos factores: a) la aparición en el medio de metabolitos procedentes de la degradación de la glucosa, b) bombas de H<sup>+</sup> asociadas al transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y/o NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Aquellos medios de cultivo en los que el pH fue más alcalino, el color de las células era más intenso (tabla 4.5),

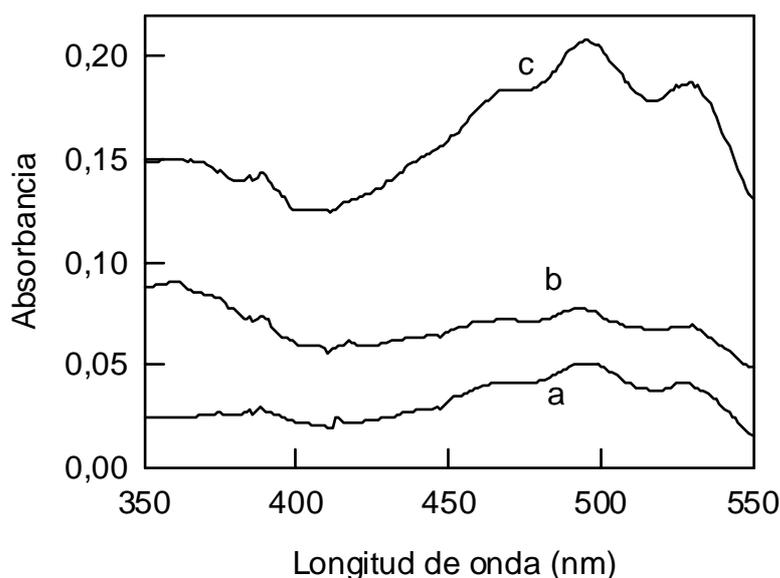
de manera que las variaciones de pH podrían ser responsables del cambio en la coloración de las células. Por tanto, podemos concluir que, la síntesis de bacterioruberinas en *Haloferax mediterranei* se incrementa en respuesta a un estrés provocado por un incremento del pH (> 7,5) del medio. De esta forma, el pigmento participa en la estabilización de membranas celulares a valores de pH alcalinos (Huang y Huang, 1974; Jagannadham *et al.*, 1991).

<b>Fuente de nitrógeno</b>	<b>D.O (600 nm)</b>	<b>pH</b>
5 mM KNO <sub>3</sub>	2,10	6,88
25 mM KNO <sub>3</sub>	2,30	8,00
100 mM KNO <sub>3</sub>	2,45	8,20
0,5 mM KNO <sub>2</sub>	0,70	6,00
1 mM KNO <sub>2</sub>	0,90	6,00
2 mM KNO <sub>2</sub>	1,40	5,90
100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,43	6,56
100 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	2,45	7,70
5 mM KNO <sub>3</sub> + 5 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	2,34	7,70
5 mM KNO <sub>3</sub> + 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,33	6,70

**Tabla 4.5.** Resumen de las densidades ópticas y pH de medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno en fase estacionaria.

Diversos estudios ponen de manifiesto que las cadenas isoprenoides hidrocarbonadas proporcionan estabilidad a las membranas ante degradaciones peroxidativas y disminuyen la permeabilidad (Nakatani *et al.*, 1991). Así mismo, los enlaces éter incrementan la resistencia de los lípidos de membrana a degradaciones químicas que tienen lugar en amplios rangos de pH. Estas propiedades proporcionan ventajas a los organismos halófilos que son capaces de desarrollarse en medios con pHs que oscilan entre 5 y 10 (Kates y Kushwaha, 1978).

Como puede apreciarse en la figura 4.20, los extractos solubles en acetona procedentes de cultivos con mayores concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  (el pH aumentó hasta valores cercanos a 8,20; tabla 4.5), dan lugar a espectros con mayor intensidad de absorción.

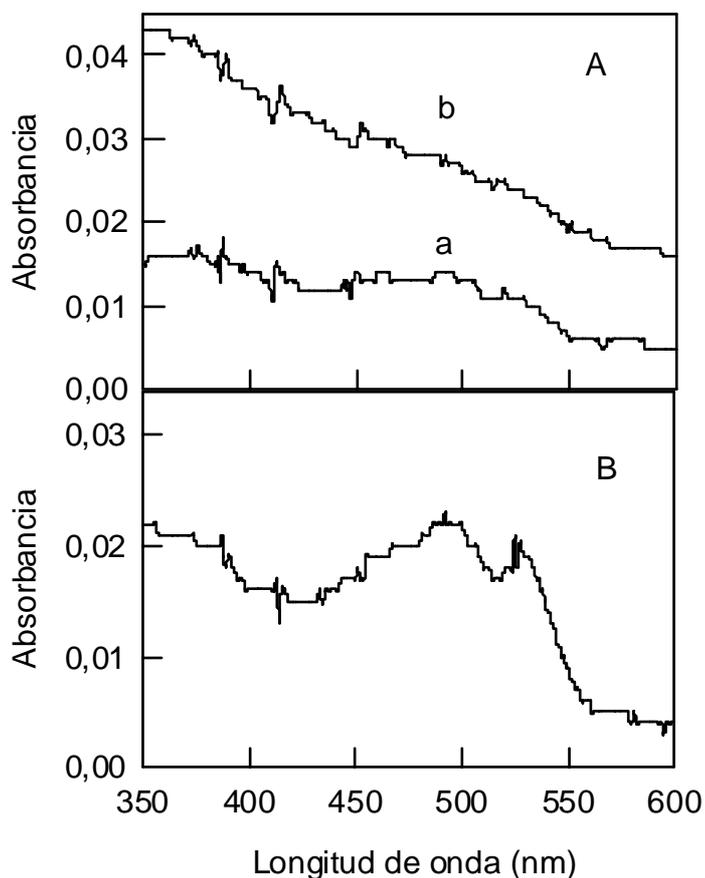


**Figura 4.20.** Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,4, en todos los casos), crecidas en medios con 5 (a), 25 (b) y 100 mM  $\text{NO}_3^-$  (c).

En medios de cultivo con  $\text{NO}_2^-$  sin control continuo de pH, el pH inicial (7,3) descendió bruscamente por el metabolismo de la glucosa y el consumo del  $\text{NO}_2^-$  (apartado 4.1, págs. 38-42; tabla 4.5, pág 75), lo que provocó una fase estacionaria temprana.

En estas condiciones las células exhibían un color blanco y en el espectro del extracto con acetona no se observaron evidencias de la presencia de bacterioruberinas (figura 4.21.A). Cuando el pH se controló de forma continuada, los cultivos de *Haloferax mediterranei* alcanzaron mayores densidades ópticas en fase estacionaria, las células exhibían una ligera coloración rosada y el espectro obtenido,

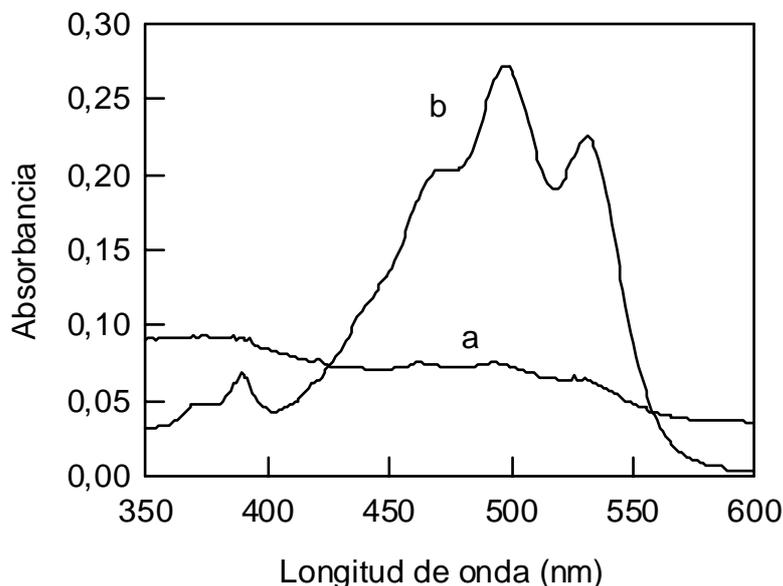
aunque no bien definido, es el espectro característico de la bacterioruberina (figura 4.21.B).



**Figura 4.21.** A: espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 1, en ambos casos), crecidas en medios con 0,5 (a) y 1 mM  $\text{NO}_2^-$  (b). B: espectro obtenido a partir de células crecidas en 5 mM  $\text{NO}_2^-$  con control continuo del pH (D.O = 2,1).

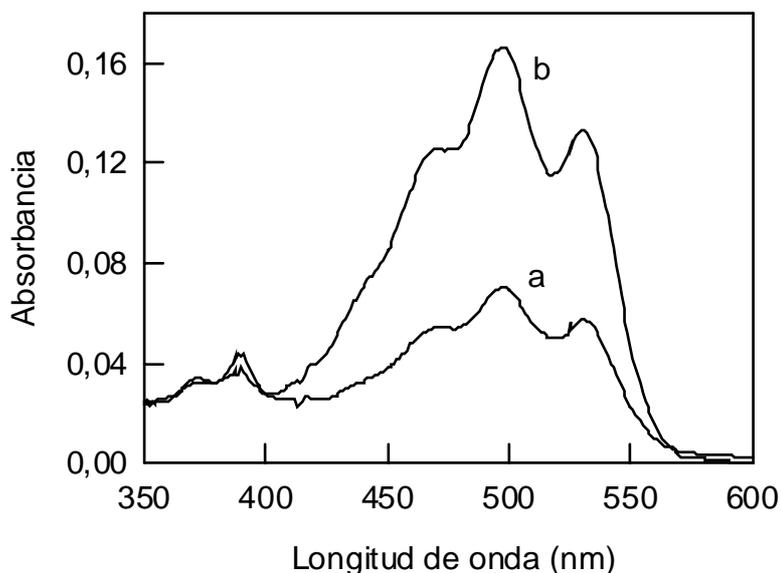
También se apreciaron considerables cambios de color en células de *Haloferax mediterranei* crecidas en medios con acetato amónico o sulfato amónico (100 mM). En acetato amónico se desarrolló la máxima intensidad de color. La síntesis de cadenas isoprenoides en arqueas comienza con el acetato (Kamekura y Kates, 1988), y éste se desvía hacia la síntesis de cadenas isoprenoides. Así, la síntesis de bacterioruberinas podría incrementarse por el consumo de acetato amónico como fuente de nitrógeno y carbono.

*Haloferax mediterranei* fue capaz de crecer con sulfato amónico de la misma forma que lo hace con acetato amónico, pero en el primer caso, la síntesis de bacterioruberinas fue mucho menor que la encontrada en cultivo con acetato. Esta disminución podría estar provocada por el descenso más acusado de pH en fase estacionaria (tabla 4.5, pág 75) y por la ausencia de acetato (figura 4.22).



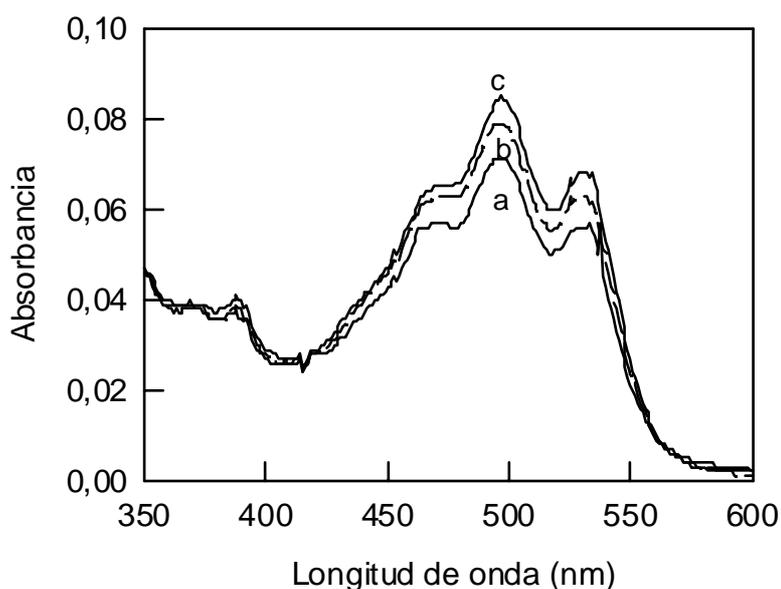
**Figura 4.22.** Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,4, en todos los casos), crecidas en medios con 100 mM sulfato amónico (a) y 100 mM acetato amónico (b).

De la misma forma se realizaron extracciones de bacterioruberina a partir de células crecidas en medios de cultivo con nitrato y acetato amónico (5 mM de cada uno de ellos), o bien nitrato y sulfato amónico (5 mM de cada fuente). Los espectros obtenidos se muestran a continuación (figura 4.23). En ellos también se observa un incremento de la síntesis de bacterioruberinas en el medio que contiene acetato, indicando que parte de los compuestos de carbono que se sintetizan podrían desviarse hacia la ruta de síntesis de cadenas isoprenoides.



**Figura 4.23.** Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloflex mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,3, en todos los casos), crecidas en medios con 5 mM  $\text{NO}_3^-$  + 5 mM sulfato amónico (a) y 5 mM  $\text{NO}_3^-$  + 5 mM acetato amónico (b).

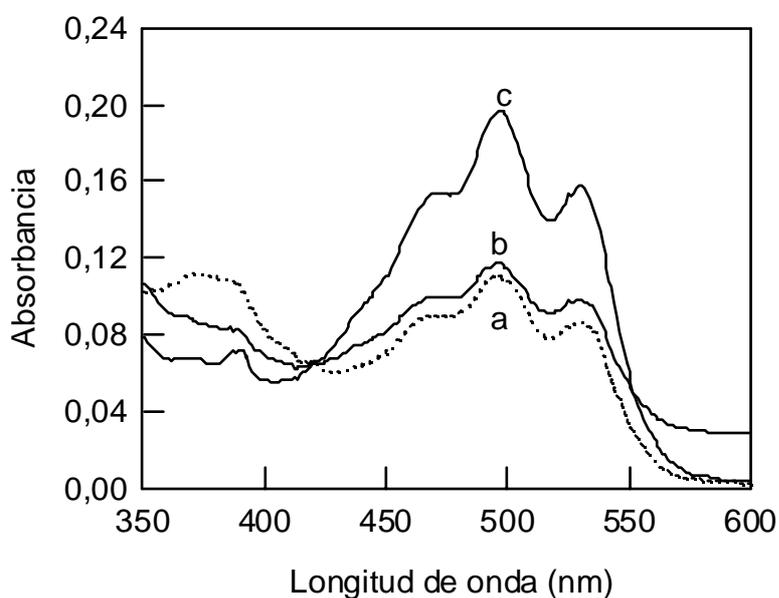
Para corroborar esta hipótesis (desvío de compuestos de carbono hacia la ruta de síntesis de cadenas isoprenoides), se prepararon medios máximos, a pH 7,3, con diferentes concentraciones de acetato (0,5-50 mM) (figura 4.24). Como cabría esperar, la pigmentación de las células fue proporcional a la concentración de acetato presente en el medio.



**Figura 4.24.** Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferox mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,3, en todos los casos), crecidas en medios máximos con 0,5 mM acetato amónico (a); 5 mM acetato amónico (b) y 50 mM acetato amónico (c).

Finalmente, para establecer la relación existente entre la síntesis de bacterioruberinas en *Haloferox mediterranei* y el pH del medio de cultivo, independientemente de la fuente de nitrógeno y carbono, se llevó a cabo el siguiente ensayo: *Haloferox mediterranei* se cultivó en medio máximo, pH 7,3 hasta una densidad óptica 1,8. Estas células fueron lavadas con agua de sales y transferidas a medios máximos

(0,5 % extracto de levadura), a pH 5 (crecimiento más lento), a pH 7 ó a pH 9 y se dejaron crecer hasta fase estacionaria (D.O = 2,4-2,5). Los resultados obtenidos (figura 4.25) sugieren que *Haloferax mediterranei* sobrevive en medios con pH ligeramente alcalino gracias a las bacterioruberinas sintetizadas en estas condiciones.



**Figura 4.25.** Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei*. Las células fueron crecidas a pH 7,3 en medio máximo (0,5 % extracto de levadura). Cuando la D.O era 1,8, parte de las células fueron transferidas a medios máximos pH 5 (a), pH 7,3 (b) y pH 9 (c). Estos medios se dejaron crecer hasta fase estacionaria (D.O = 2,4, en todos los casos).

**CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE REGULACIÓN DEL  
CRECIMIENTO Y NIVELES DE ACTIVIDAD Nas Y NiR  
ASIMILATIVA DE *Haloferax mediterranei*.**

⇒ Al igual que en otros organismos, las Nas y NiR asimilativas de *Haloferax mediterranei* son enzimas adaptativas, cuyos niveles de actividad dependen de la naturaleza de la fuente de nitrógeno presente.

⇒ Ambas actividades se detectaron en medios con  $\text{NO}_3^-$  cuando el cultivo se encontraba en la mitad de la fase exponencial ( $D.O = 1,2$ ). Si la concentración de  $\text{NO}_3^-$  extracelular es superior a 5 mM, tiene lugar una excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio que es proporcional a la concentración inicial de  $\text{NO}_3^-$ . La excreción coincide con la pérdida de las actividades Nas y NiR asimilativas.

⇒ *Haloferax mediterranei* puede utilizar  $\text{NO}_2^-$  como única fuente de nitrógeno. En medios con  $\text{NO}_2^-$  sin tamponar, se genera una brusca acidificación del medio que da lugar a una fase estacionaria temprana (el transporte del  $\text{NO}_2^-$  acoplado a bombas de  $\text{H}^+$  podría ser la causa). La actividad Nas fue prácticamente indetectable. Cuando el pH se mantuvo constante (7,3), *Haloferax mediterranei* creció en medios con 20 mM  $\text{NO}_2^-$ ; concentraciones superiores resultaron tóxicas.

⇒ Los perfiles de inducción de las actividades Nas y NiR asimilativa tras la transferencia de células crecidas con  $\text{NH}_4^+$  a medios de cultivo sin fuente de nitrógeno,  $\text{NO}_3^-$  ó  $\text{NO}_2^-$ , son similares. Dicha inducción no es dependiente de la fuente de nitrógeno presente, pero existe un claro efecto potenciador de las actividades por su sustrato correspondiente.

↗ Se observa un incremento considerable de las actividades Nas y NiR en células de *Haloferax mediterranei* sometidas a déficit de nitrógeno. El incremento de actividad de las enzimas de la vía asimilativa podría facilitar la adaptación fisiológica celular.

↗ En medios con  $\text{NH}_4^+$  como única fuente de nitrógeno no tiene lugar la reducción asimilativa del nitrógeno. La inhibición por  $\text{NH}_4^+$  es reversible. Si la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  se inhibe mediante la adición de MSX a los cultivos, tiene lugar una reversión del efecto negativo del  $\text{NH}_4^+$  (incremento de actividades Nas y NiR asimilativa), por lo que un metabolito de su asimilación, más que el  $\text{NH}_4^+$  *per se*, causa la inhibición de la vía asimilativa. El  $\text{NH}_4^+$  fue preferentemente consumido por *Haloferax mediterranei* en medios en los que además de dicha fuente, están presentes el  $\text{NO}_3^-$  ó  $\text{NO}_2^-$ .

↗ Durante el crecimiento de *Haloferax mediterranei* en medios no tamponados con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, se generan modificaciones del pH del medio que dan lugar a cambios en el color de las células (modificación en la síntesis de bacterioruberinas).

↗ La síntesis de bacterioruberinas es proporcional al incremento de pH y a la concentración de acetato.