BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Universidad de Alicante

Fisiología de la asimilación de nitrógeno en "Haloferax mediterranei". Purificación y caracterización de Nitrato y Nitrito reductasas asimilativas

Rosa María Martínez Espinosa

Tesis de Doctorado

Facultad de Ciencias

Directores: Dra. Dª. Mª José Bonete Pérez
Dr. D. Frutos Carlos Marhuenda Egea

2003

TESIS DOCTORAL

Fisiología de la asimilación de nitrógeno en *Haloferax mediterranei*. Purificación y caracterización de Nitrato y Nitrito reductasas asimilativas.

UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Facultad de Ciencias

Departamento de Agroquímica y Bioquímica.

División Bioquímica y Biología Molecular.

Rosa María Martínez Espinosa

2003

ÍNDICE GENERAL

1-. INTRODUCCIÓN 1
1.1-. Clasificación de los seres vivos 1
1.1.1-. Dominio *Archaea* 3
1.1.2-. Halófilos 5
1.1.3-. *Haloferax mediterranei* 9
1.2-.Ciclo del nitrógeno. Reducción asimilativa del nitrógeno 10
1.2.1-. Entrada de nitrato, nitrito y amonio extracelulares 12
1.2.2-. Reducción del nitrato a amonio 15
1.2.3-. Asimilación de amonio 20
1.3-. Regulación de los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasas (Nas y NiR) 21

2-. OBJETIVOS 24

3-. MATERIALES Y MÉTODOS 25
3.1-. Microorganismo 25
3.2-. Regulación de los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasas asimilativas (Nas y NiR)..... 25
3.2.1-. Condiciones de cultivo 25
3.2.2-. Obtención de extractos enzimáticos..... 27
3.2.3-. Ensayos enzimáticos..... 28
3.2.3.a. Ensayo de la actividad Nas (MV-Nas) 28
3.2.3.b. Ensayo de la actividad NiR (MV-NiR) 28
3.2.4-. Cuantificación de la concentración de proteína de los extractos enzimáticos y de las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio presentes en el medio de cultivo 29
3.2.5-. Extracción de bacterioruberinas 30
3.2.6-. Cuantificación de ácidos orgánicos excretados al medio de cultivo 30
3.3-. Purificación y caracterización de nitrato y nitrito reductasas asimilativas y ferredoxina..... 31
3.3.1-. Condiciones de cultivo 31
3.3.2-. Obtención de extractos enzimáticos..... 31
3.3.3-. Purificación de las enzimas y de ferredoxina. 32
3.3.3.a. Purificación de Nitrato Reductasa asimilativa ... 32

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

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

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

5-. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Nas y NiR ASIMILATIVAS: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 84
5.1-. Purificación de Nas y NiR asimilativas..... 84
5.1.1-. Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativas durante el desarrollo del cultivo (medio mínimo 100 mM KNO_3)..... 84
5.1.2-. Purificación de nitrato reductasa asimilativa (Nas) 86
5.1.3-. Purificación de nitrito reductasa asimilativa (NiR) 91
5.2-. Caracterización de las enzimas..... 95
5.2.1-. Efecto del ditionito sódico (DT) en la determinación colorimétrica del nitrito 95
5.2.2-. Caracterización de Nas..... 96
5.2.2.a. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas 97
5.2.2.b. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas 98
5.2.2.c. Efecto del pH sobre la actividad Nas 99
5.2.2.d. Efecto de la temperatura y la concentración de sal sobre la actividad Nas..... 101
5.2.2.e. Energías de activación para la actividad Nas.... 103
5.2.2.f. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl..... 104
5.2.2.g. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad Nas..... 105
5.2.2.h. Valores de K_m *para el MV, nitrato y ferredoxina* 107
5.2.2.i. Espectro de absorción UV-visible de la Nas de Haloferax mediterranei..... 109
5.2.2.j. Cuantificación del molibdeno presente en la Nas de Haloferax mediterranei..... 111

5.2.3-. Caracterización de NiR asimilativa 114
5.2.3.a. Determinación del producto de reacción de la NiR asimilativa 114
5.2.3.b. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa 115
5.2.3.c. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR asimilativa..... 115
5.2.3.d. Efecto del pH sobre la actividad NiR asimilativa 116
5.2.3.e. Efecto de la temperatura y la concentración de sal sobre la actividad NiR asimilativa 119
5.2.3.f. Energías de activación para la actividad NiR asimilativa..... 120
5.2.3.g. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl..... 121
5.2.3.h. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad NiR asimilativa 122
5.2.3.i. Valores de K_m *para el MV, nitrito y ferredoxina* 124
5.2.3.j. Espectro de absorción de la NiR asimilativa de Haloferax mediterranei..... 127
Conclusiones de los estudios de purificación y caracterización de Nas y NiR asimilativas 129

6-. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FERREDOXINA EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 130
6.1-. Obtención de ferredoxina (Fd) 130
6.2-. Espectro de absorción de la ferredoxina de *Haloferax mediterranei* 132
6.3-. Espectro de RMN de la ferredoxina de *Haloferax mediterranei* 133
6.4-. Ensayos de actividad MV-DT-Fd-Nas yMV-DT-Fd-NiR 136
6.5-. Función de la ferredoxina de *Haloferax mediterranei* en la reducción asimilativa del nitrógeno 137
Conclusiones de los estudios de purificación y caracterización de la ferredoxina 138

7-. CONCLUSIONES GENERALES 139

8-. BIBLIOGRAFÍA 140

9-. APÉNDICE DE TABLAS 158

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Árbol filogenético universal 2
Figura 1.2. Evolución del dominio *Archaea* 4
Figura 1.3. Fotografía de las Salinas de Santa Pola, Alicante. 5
Figura 1.4. Fotografía de *Haloferax mediterranei*..... 8
Figura 1.5. Ciclo biológico del nitrógeno 11
Figura 1.6. Reducción asimilativa del nitrógeno 12
Figura 1.7. Estructura de las nitrato reductasas 16
Figura 1.8. Elementos implicados en la reducción asimilativa del nitrógeno 18
Figura 4.1. Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativas durante el desarrollo del cultivo 44
Figura 4.2. Excreción de nitrito al medio de cultivo 44
Figura 4.3. Posible relación entre la actividad NiR y las [NO_2^-] intra y extracelulares 45
Figura 4.4. Medios de cultivo con concentraciones de NO_3^- inferiores a 100 mM..... 46
Figura 4.5. Consumo de NO_3^- en medios de cultivo con una concentración inicial inferior a 100 mM 47
Figura 4.6. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de NO_2^- 48
Figura 4.7. Inducción de las actividades MV-Nas y MV-NiR asimilativas 51
Figura 4.8. Influencia del cambio de la fuente de nitrógeno (NO_3^-, NH_4^+o ausencia de nitrógeno) 54
Figura 4.9. Influencia del cambio de la fuente de nitrógeno (NO_2^-) 56
Figura 4.10. Recuperación de las actividades Nas y NiR asimilativas57
Figura 4.11. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno (2 fuentes de nitrógeno) 59
Figura 4.12. Efecto de la adición de 5 mM de sulfato amónico en un medio mínimo con 100 mM NO_3^-..... 61
Figura 4.13. Efecto de la adición de 5 mM sulfato amónico o 5 mM acetato amónico en medios mínimos con 5 mM NO_3^- 63
Figura 4.14. Transferencia de células crecidas en 100 mM NO_3^- a medio mínimo con 5 mM NH_4^+ 64
Figura 4.15. Efecto del MSX sobre el crecimiento y las

actividades enzimáticas..... 65
Figura 4.16. Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas..... 68
Figura 4.17. Efecto de la rifampicina sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas..... 70
Figura 4.18. Efecto del wolframio y el molibdeno sobre el crecimiento y la actividad Nas..... 72
Figura 4.19. Fotografía de los medios de cultivo de *Haloferax mediterranei*..... 73
Figura 4.20. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (NO_3^-, medio mínimo)..... 76
Figura 4.21. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (NO_2^-, medio mínimo)..... 77
Figura 4.22. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (acetato amónico y sulfato amónico, medio mínimo)..... 78
Figura 4.23. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (medios mínimos con dos fuentes de nitrógeno)..... 79
Figura 4.24. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (medios máximos con acetato amónico)80
Figura 4.25. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (medios máximos a diferente pH) 81
Figura 5.1. Cromatograma de Sepharosa-4B..... 86
Figura 5.2. Cromatograma de DEAE-celulosa (Nas)..... 87
Figura 5.3. Cromatograma de Sephacryl S-300 (Nas)..... 88
Figura 5.4. SDS-PAGE (Nas)..... 90
Figura 5.5. Cromatograma de DEAE-celulosa (NiR)..... 91
Figura 5.6. Cromatograma de Q-Sepharosa (NiR)..... 92
Figura 5.7. Cromatograma de Sephacryl S-300 (NiR)..... 93
Figura 5.8. SDS-PAGE (NiR)..... 94

Figura 5.9. Efecto del DT en la determinación colorimétrica del NO_2^- 96
Figura 5.10. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas 97
Figura 5.11. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas 98
Figura 5.12. Dependencia de la actividad Nas respecto del valor de pH a 60 y 40 ºC 100
Figura 5.13. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad Nas 102
Figura 5.14. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad Nas..... 104
Figura 5.15. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el MV (MV-Nas) 108
Figura 5.16. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para la Fd (Fd-DT-Nas) 108
Figura 5.17. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el NO_3^- (MV-Nas) 109
Figura 5.18. Espectro de absorción de la Nas purificada..... 110
Figura 5.19. Representación esquemática de la estructura característica de los grupos Fe-S..... 111
Figura 5.20. Representación esquemática de la estructura característica del cofactor de molibdeno..... 112
Figura 5.21. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa..... 115
Figura 5.22. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR 116
Figura 5.23. Dependencia de la actividad NiR respecto del valor de pH a 60 y 40 ºC 117
Figura 5.24. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad NiR asimilativa..... 119
Figura 5.25. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad NiR asimilativa 121
Figura 5.26. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR para el MV (MV-NiR) 125
Figura 5.27. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR para la Fd (Fd-DT-NiR) 126
Figura 5.28. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR para el NO_2^- (MV-NiR) 126

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

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

ÍNDICE DE TABLAS

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

Abs.	Absorbancia
Ae.	Actividad específica
Aenz.	Actividad enzimática
D.O	Densidad óptica
DPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DT	Ditionito sódico
DTT	Ditiotreitol
Ea	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido oxidado
Fd	Ferredoxina
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MV	Metilviológeno
NAD (P)$^+$	Nicotinamín adenín dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H	Nicotinamín adenín dinucleótido (fosfato) reducido
Nas	Nitrato reductasa asimilativa
NEDA	N-1-naftiletilendiamindihidrocloro
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
PMS	Fenacina metosulfato
***p*OH-HgBzOH**	*p*-hidroximercuribenzoato
RMN	Resonancia magnética nuclear
S.A.	Sulfato amónico
SDS	Dodecilsulfato sal sódica
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

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).

BIBLIOTECA VIRTUAL

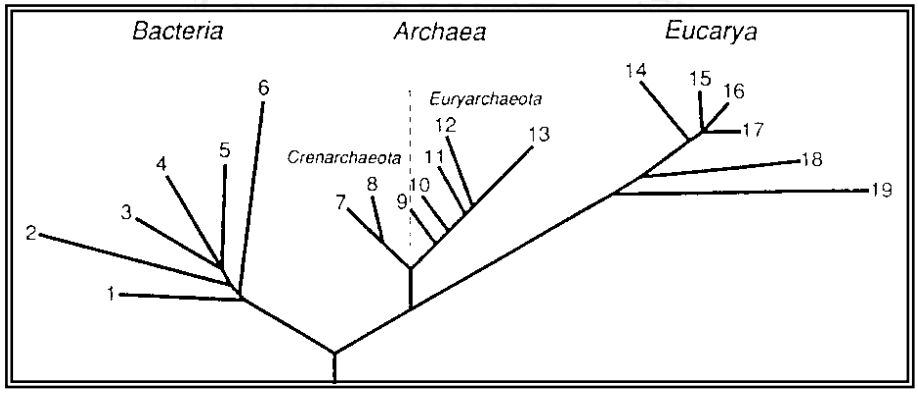

Figura 1.1. Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios encontrados mediante comparación de secuencias de rRNAs. Los números que aparecen en el esquema corresponden a los siguientes grupos de organismos. *Bacteria*: 1, termotogales; 2, flavobacterias y similares; 3, cianobacterias; 4, 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 aqueas fue un termófilo que evolucionó dando toda una colección de fenotipos (Barns *et al*., 1994).

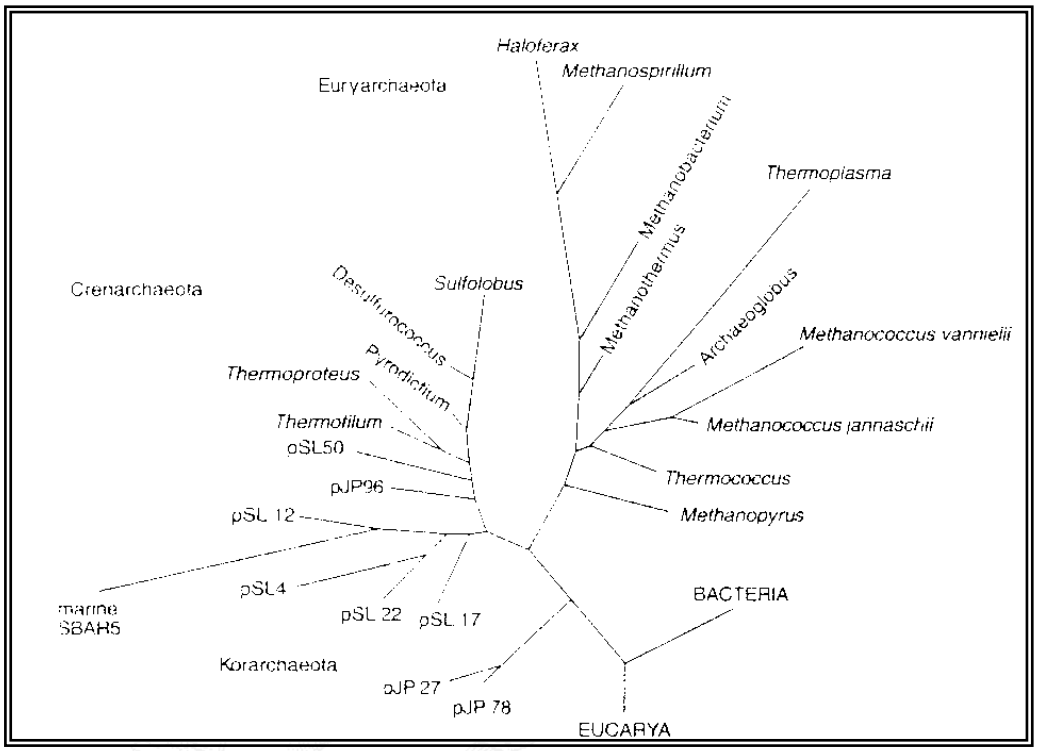

Figura 1.2. Evolución del dominio *Archaea* basada en el análisis de rRNAs (Barns *et al*., 1996).

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* NCMIB 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 ºC, aunque temperaturas inferiores (37-42 ºC) 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 (-), aeróbia, 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 C_{20},C_{20} (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: proteínasy 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).

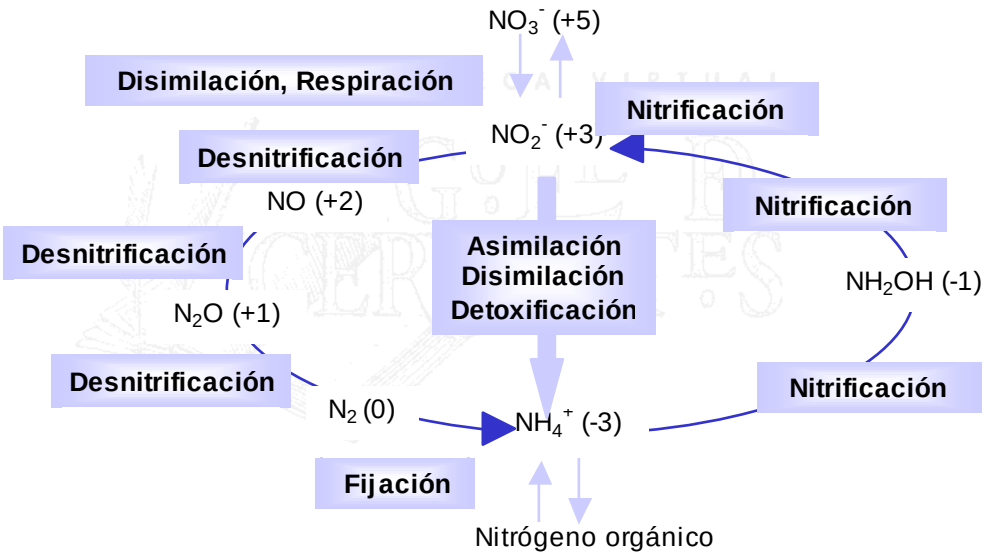

Figura 1.5. Ciclo biológico del nitrógeno. La *Nitrificación* es una conversión oxidativa del amonio a nitrato y la *Desnitrificación* es un proceso respiratorio en el que el nitrato es sucesivamente reducido a nitrito, óxidos de nitrógeno (NO y N_2O), y dinitrógeno (N_2). (Richardson, 2001). Los gases 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.

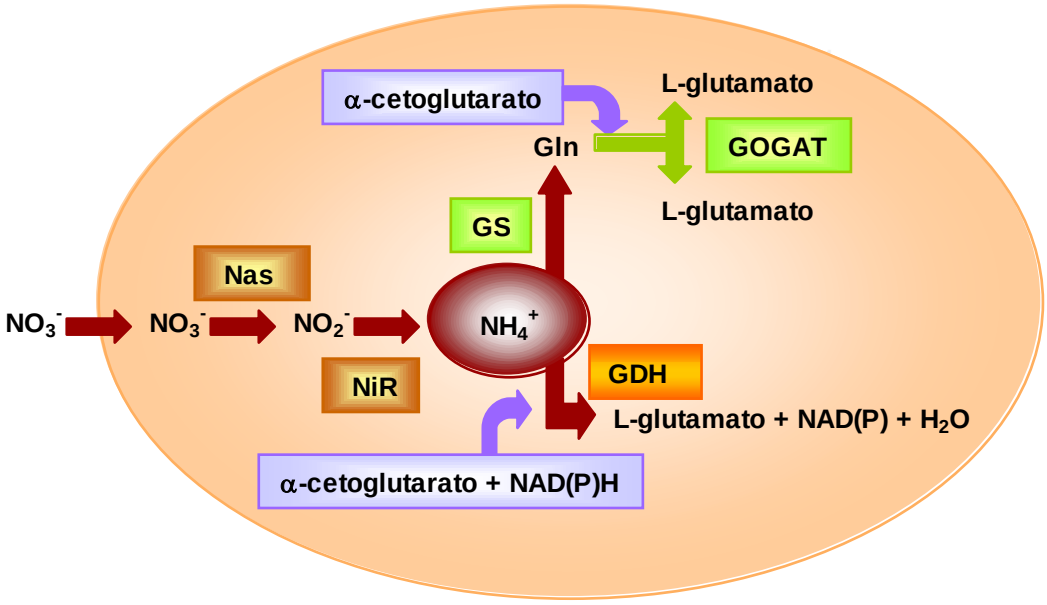

Figura 1.6. Esquema resumen de la Reducción asimilativa del nitrógeno. Se han recogido las dos posibles vías de asimilación del amonio: la vía GS-GOGAT (Vega *et al.*, 1990) y la vía GDH (Ferrer, 1995). Tras la entrada del nitrato en la célula, éste es reducido a nitrito por la nitrato reductasa asimilativa **(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 NO_3^-/ 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 NO_3^-/ 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 NO_3^-/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 (p*Ka* = 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^+ (p*Ka* = 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:

$$NO_3^- + 2\ e^- + 2\ H^+ \rightarrow NO_2^- + H_2O$$

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).

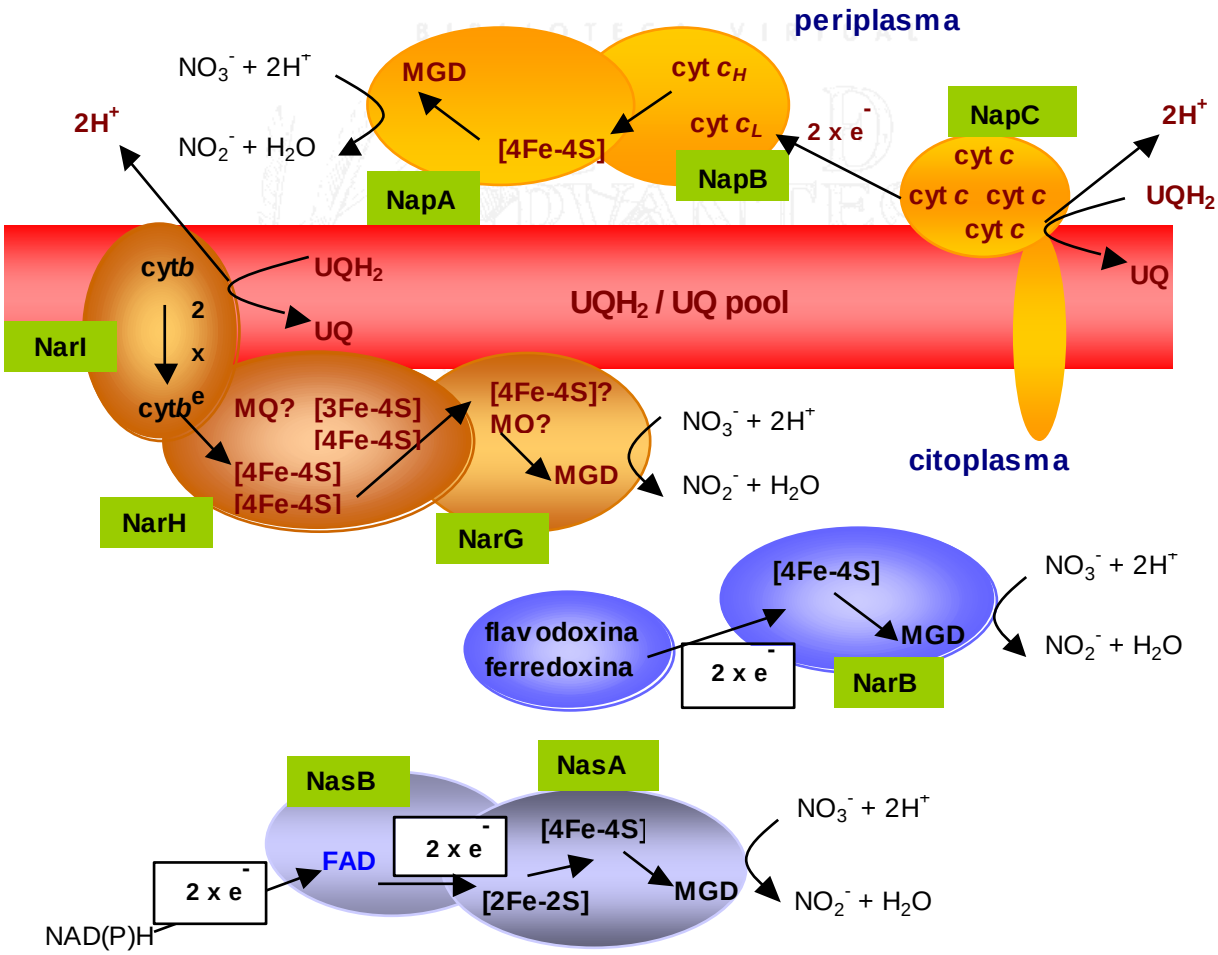

Figura 1.7. Esquema resumen de la estructura de las diferentes nitrato reductasas. Adaptado de Richardson *et al.*, 2001. En la parte superior de la figura (periplasma) aparece el complejo Nap, en marrón se representa la Nar asociada a membrana, y en azul, el esquema de la Nas dependiente de flavodoxina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

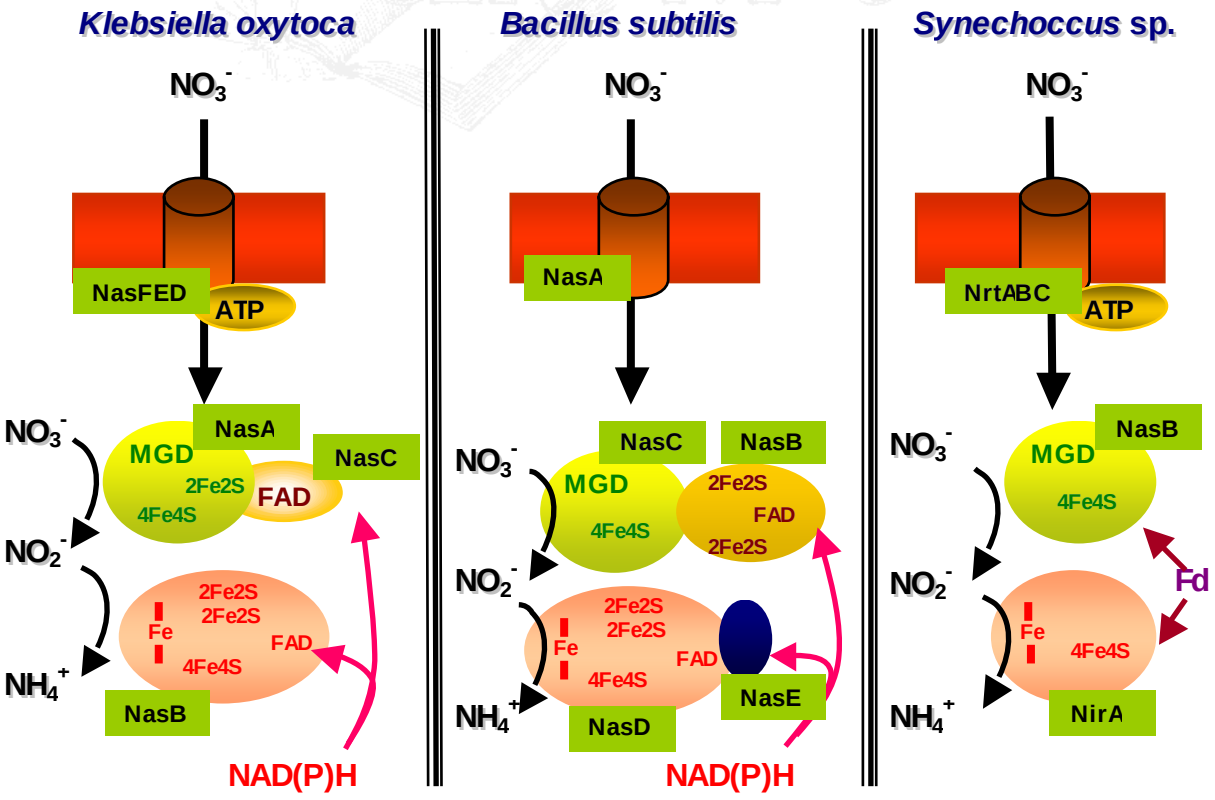

Figura 1.8. Esquema resumen de los elementos implicados en la Reducción asimilativa del nitrógeno en los géneros *Klebsiella oxytoca, Bacillus subtilis* y *Synechococcus* sp. (Richardson *et al.*, 2001).

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

$$NO_2^- + 6\ e^- + 8\ H^+ \rightarrow NH_4^+ + 2\ H_2O$$

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 carbamilfosfato) 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 M5al* (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).

Ciertas arqueas halófilas son capaces de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno. A pesar de la evidencia de este hecho, hasta ahora no se había estudiado la **reducción asimilativa del nitrógeno** en dichos organismos. Dada la importancia del ciclo del nitrógeno en la biosfera (Moreno-Vivián *et al*., 1999), abordamos el estudio de esta vía metabólica. El objetivo principal de este trabajo es estudiar cómo asimilan las arqueas (concretamente *Haloferax mediterranei*) las distintas formas de nitrógeno inorgánico. En primer lugar, buscamos y hallamos las actividades nitrato y nitrito reductasas, primeras enzimas de la vía asimilativa del nitrógeno.

Una vez detectadas ambas actividades, se plantearon los siguientes objetivos:

- ✓ Analizar el crecimiento de *Haloferax mediterranei* y la expresión de las actividades nitrato y nitrito reductasas asimilativas en función de la naturaleza y concentración de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo.

- ✓ Purificar hasta homogeneidad electroforética y caracterizar las enzimas citadas haciendo uso de la arquea halófila *Haloferax mediterranei* como fuente de las mismas.

El presente trabajo, supone el primer análisis de un estudio más amplio, planteado en el Departamento de Agroquímica y Bioquímica, sobre el metabolismo del nitrógeno en halófilos, y por extensión en los organismos del Dominio *Archaea.* Esperamos contribuir también, con nuestra labor, al desarrollo de aplicaciones futuras de las arqueas, en procesos potencialmente importantes para la actividad humana como son la recuperación de suelos salinos, aprovechamiento de residuos agrícolas, desnitrificación de aguas subterráneas... (Ventosa y Nieto, 1995; Rodríguez-Valera, 1992; Ramos-Cormenzana, 1991).

3-. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1-. MICROORGANISMO.

El microorganismo empleado en el presente estudio es *Haloferax mediterranei (ATCC 33500^T)*, 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^{-1} $FeCl_3$, 0,5 g l^{-1} KH_2PO_4, 5 g l^{-1} glucosa y diferentes concentraciones de KNO_3 (0-100 mM) ó KNO_2 (0-10 mM).

SAL	CONCENTRACIÓN (g / l)
NaCl	234,0
$MgSO_4$ x 7 H_2O	59,3
$MgCl_2$ x 6 H_2O	41,5
KCl	6,0
$NaHCO_3$	0,2
NaBr	0,7
$CaCl_2$	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.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

También se crecieron células en 100 mM de NO_3^- hasta la mitad de la fase exponencial, para ser posteriormente lavadas (tampón 50 mM fosfato pH 7,3, 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$ (tampón A)), resuspendidas en agua de sales y transferidas a medios con concentraciones de NO_3^- inferiores a 100mM o medios en los que además de NO_3^- estaban presentes el cloranfenicol, la rifampicina ó MSX. Así mismo, se transfirieron células a medios con NO_2^-, NH_4^+, 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_3^- 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 37ºC y 200 rpm.

El precultivo, preparado días antes, consistió en 25 ml de medio mínimo con 100 mM NO_3^-, 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 4ºC) 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 ºC. 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 NO_2^- producido. La composición de la mezcla en la que se desarrollaba la reacción, en un volumen final de 250 µl, era la siguiente: 120 mM Na_2CO_3 pH 9, 3,2 M NaCl, 4 mM MV, 35 mM KNO_3, 50 µl extracto y 17 mM de DT (disuelto en 0,1 M $NaHCO_3$). Las mezclas de reacción se incubaron a 60 ºC 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 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 µmol de 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 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 Na_2CO_3, se empleó tampón Tris, cuya composición fue: 50 mM Tris-HCl, 3,2 M NaCl, 35 mM 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-NiR).

La actividad nitrito reductasa se estimó mediante la determinación colorimétrica del NO_2^- consumido. La composición de la

mezcla en la que se desarrollaba la reacción, en un volumen final de 250 μl, fue la siguiente: 50 mM tampón fosfato pH 7,5, 3,2 M NaCl, 3 mM MV, 5 mM KNO_2, 50 μl extracto y 17 mM de DT (disuelto en 0,1 M $NaHCO_3$). Las mezclas de reacción se incubaron a 60 ºC 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 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 μmol de 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 NO_2^-.

3.2.4-. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DE LOS EXTRACTOS Y DE LAS CONCENTRACIONES DE NO_3^-, NO_2^- Y 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 NO_3^- del medio consumido se ha estimado mediante el método de cuantificación de NO_3^- por UV (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1986). El 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 ºC en una centrífuga 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 ºC. El extracto se obtuvo mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 10 min. a 4 ºC, 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 KH_2PO_4, 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$ pH 2,1 (ajustado con H_3PO_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^{-1} $FeCl_3$, 0,5 g l^{-1} KH_2PO_4, 5 g l^{-1} glucosa y 100 mM KNO_3. 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 ºC y 200 rpm.

3.3.2-. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.

Las células se cosecharon por centrifugación (30 min. a 30.000 x g y 4ºC) en una centrífuga BECKMAN J2-21 con rotor angular tipo JA-14. Tras ser lavadas con tampón 50 mM fosfato pH 7,3, 2,5 M $(NH_4)_2SO_4$ (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 ºC. 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 ºC.

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), recogiéndose 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 recogiéndose 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 ºC 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, recogiéndose 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-NiR): 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 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 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 desnaturalizantes 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 halofílicas. 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 KNO_3 y el 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.

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 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.

BIBLIOTECA VIRTUAL

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 NH_2 del Tris ($(CH_2OH)_3CNH_2$), 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 μl) 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 ($-CH_2-OH$), 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 proprosiciones, 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_3^- 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 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 KNO_3 (tabla 4.1, pág. 40). En medios de cultivo en los que la concentración de 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 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 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 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 NO_3^-, cabe esperar que la reducción de 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 NO_2^- y 100 mM NO_3^- es prácticamente idéntica, mientras que los valores de pH de ambos cultivos son muy diferentes.

Fuente de nitrógeno	***Concentración de acetato (mM)***	***pH***
5 mM KNO_3	0,18	6,88
25 mM KNO_3	1,23	8,00
100 mM KNO_3	1,30	8,20
0,5 mM KNO_2	----	6,00
1 mM KNO_2	----	6,00
2 mM 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 H^+ asociadas al transporte de NO_3^- y/o NO_2^-.

En algas verdes se ha observado que los cambios de pH en el medio extracelular se deben a la entrada de NO_3^-, NO_2^- o 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 Cl^- en *Chara* (Beilby y Walker, 1981) y para el 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^+ (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_2^- asociado a una bomba de protones que contribuya a la acidificación del medio de cultivo. La excreción de H^+ al medio podría a su vez, favorecer la formación de HNO_2.

$$NO_2 + H^+ \leftrightarrow HNO_2$$

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_2 hasta una D.O de 0,4. Tras cosechar las células, éstas se transfirieron a medios de cultivo con diferentes concentraciones de NO_2^-, 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_2	25 mM KNO_2	75 mM KNO_2
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_2 se transfirieron a medios con 5, 25 y 75 mM de KNO_2 carentes de fuente de carbono.

Esta disminución de pH, que alcanza la misma magnitud en las tres concentraciones de NO_2^- ensayadas, podría estar asociada al transporte de NO_2^- y a la formación de HNO_2. Futuros estudios sobre transportadores permitirán comprender, en mayor medida, estos resultados.

Para evitar los cambios bruscos de pH en los medios con NO_2^-, 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 NO_3^-.

Se cultivó *Haloferax mediterranei* en medio de cultivo mínimo con 100 mM 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 nitrito reductasa se detectó en la mitad de la fase exponencial del cultivo (densidad óptica = 1,2).

El crecimiento con NO_3^- está acompañado de excreción de NO_2^- al medio. Se llevó a cabo un seguimiento de la excreción de 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.

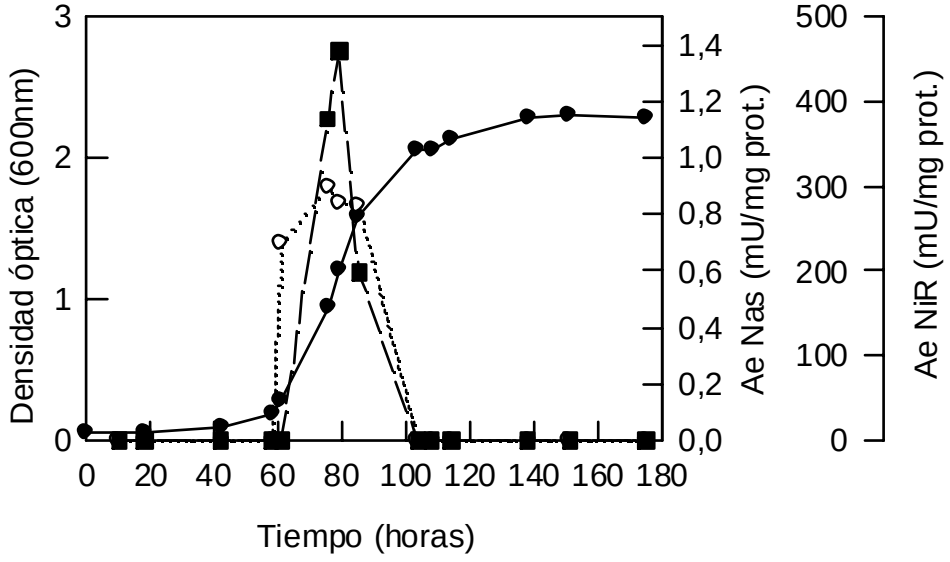

Figura 4.1. Evolución de las actividades Nas y NiR asimilativa durante el desarrollo del cultivo. Densidad óptica (●), actividad Nas (○) y actividad NiR (■).

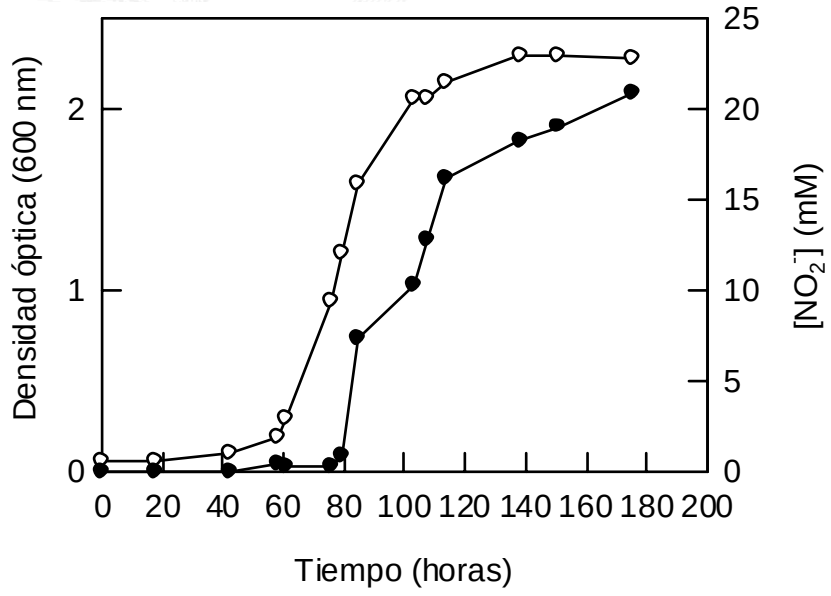

Figura 4.2. Excreción de nitrito al medio de cultivo durante el desarrollo del cultivo. Densidad óptica (○), excreción de nitrito (●).

Cuando se detectó que la excreción de NO_2^- al medio se iniciaba al superar la mitad de la fase exponencial y que los niveles de NO_2^- extracelulares incrementaban considerablemente en un breve intervalo de tiempo, decidimos realizar el seguimiento de las concentraciones intra y extracelular de NO_2^-. Como se aprecia en la figura 4.3, existe una acumulación intracelular de NO_2^- que precede al desarrollo de actividad NiR. Los valores más altos de actividad NiR coinciden con la eliminación intracelular de NO_2^-. A partir de este momento, se desarrolla la excreción de NO_2^- al medio de cultivo, al tiempo que se anulan las actividades Nas y NiR asimilativas.

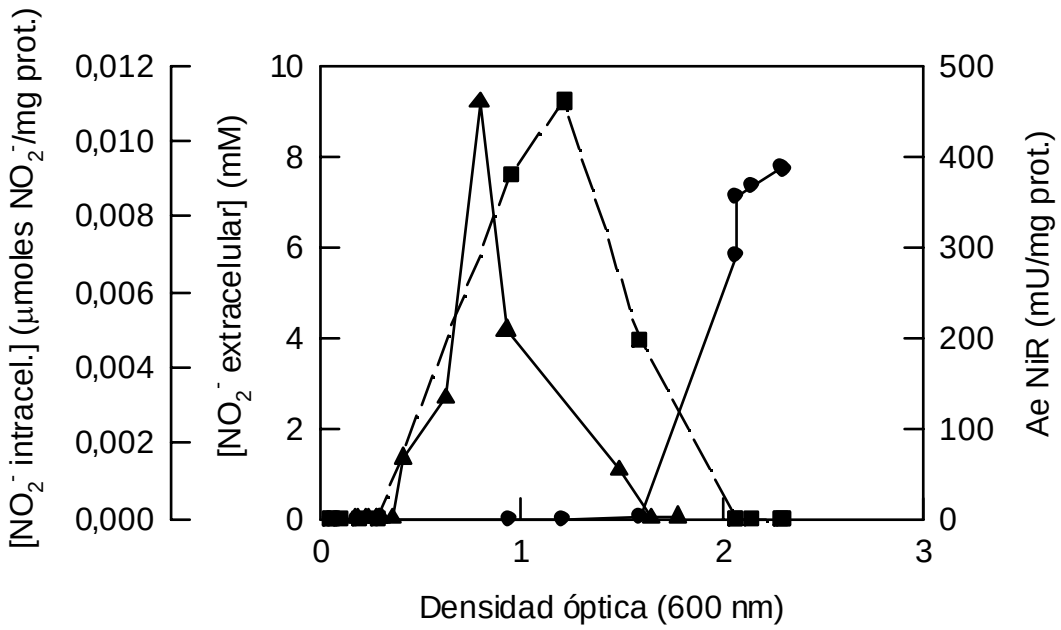

Figura 4.3. Posible relación entre la actividad NiR y las [NO_2^-] intra y extracelulares. Excreción de nitrito (●), nitrito intracelular (▲) y actividad NiR asimilativa (■).

Este comportamiento nos sugiere la hipótesis de que la acumulación intracelular de NO_2^- podría actuar como una señal de inducción de la actividad NiR.

4.2.2-. CRECIMIENTO Y ACTIVIDADES EN MEDIOS CON CONCENTRACIONES DE NO_3^- INFERIORES A 100 mM.

Se prepararon medios de cultivo con concentraciones de 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 NO_3^-; los resultados procedentes de medios de cultivos con 75 mM de NO_3^- se han obviado por ser prácticamente idénticos a los mostrados para medios con 100 mM (tabla nº 4 del apéndice de tablas).

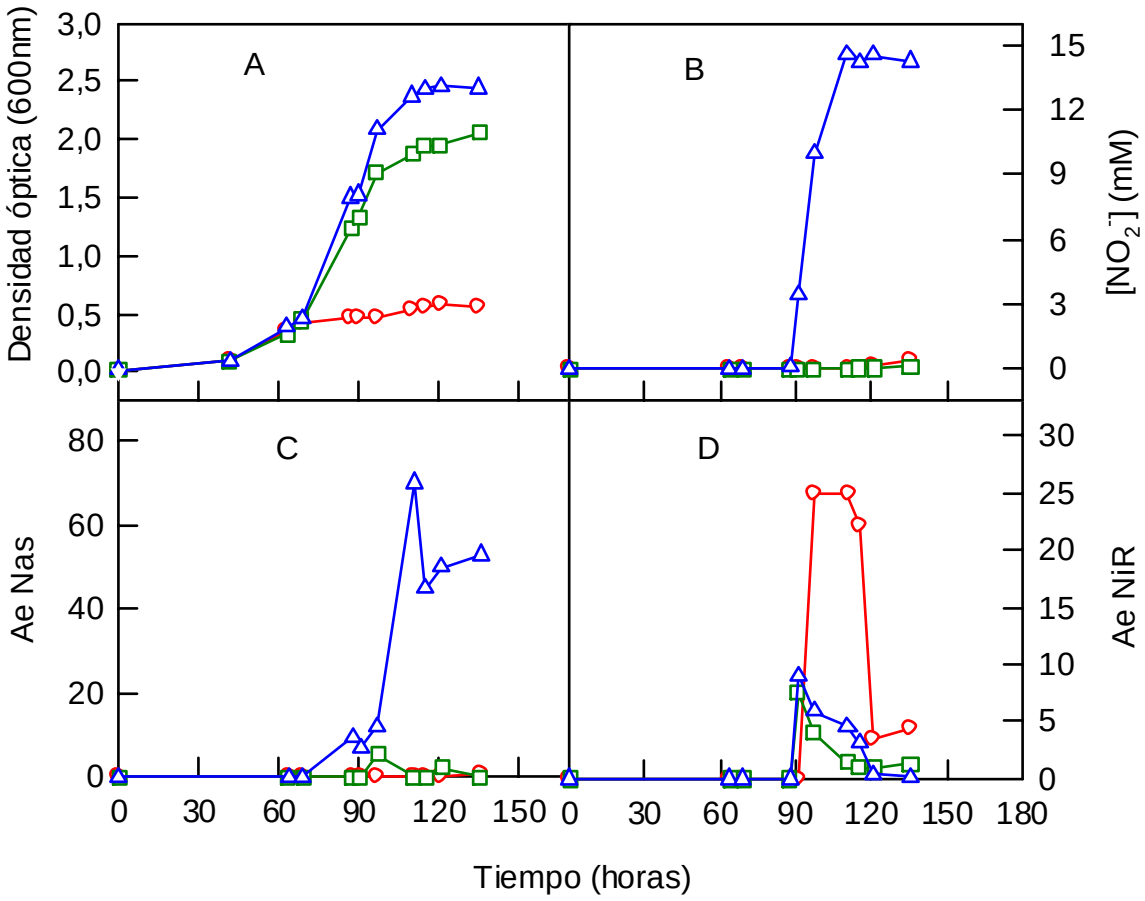

Figura 4.4. Medios de cultivo con concentraciones de NO_3^- inferiores a 100 mM. 0,5 mM (○), 5 mM (□) y 25 mM (Δ) NO_3^-. A: curvas de crecimiento; B: nitrito excretado; C: actividad Nas (mU/mg prot.); D: actividad NiR (mU/mg prot.).

La curva de crecimiento de *Haloferax mediterranei* en medios de cultivo con 25 y 75 mM NO_3^- es prácticamente idéntica a la mostrada para cultivos con 100 mM NO_3^-. En líneas generales, las actividades Nas y NiR son proporcionales al incremento de [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 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 NO_2^- al medio tiene lugar si la concentración de NO_3^- del medio es superior a 5 mM. En medios con 5 mM de NO_3^-, todo el NO_2^- se emplea como fuente de nitrógeno para el metabolismo celular, por lo que no hay excreción de NO_2^- al medio de cultivo.

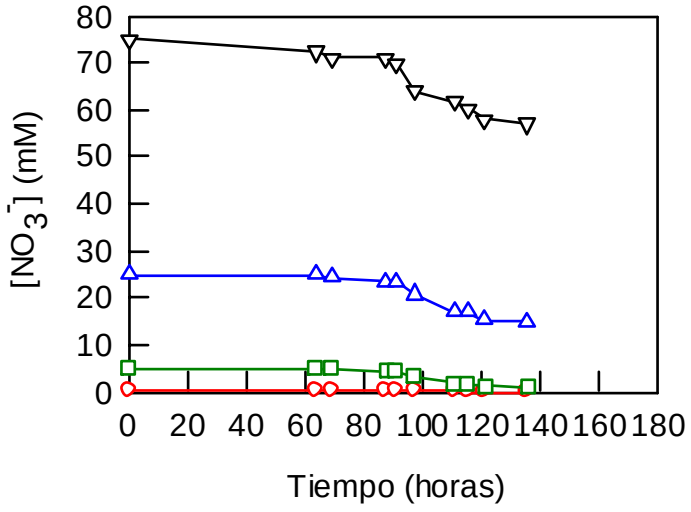

Figura 4.5. Consumo de NO_3^- en medios de cultivo con una concentración inicial inferior a 100 mM. 0,5 mM (○), 5 mM (□), 25 mM (Δ) y 75 (∇) mM NO_3^-.

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 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 NO_2^- como única fuente de nitrógeno (figura 4.6.A).

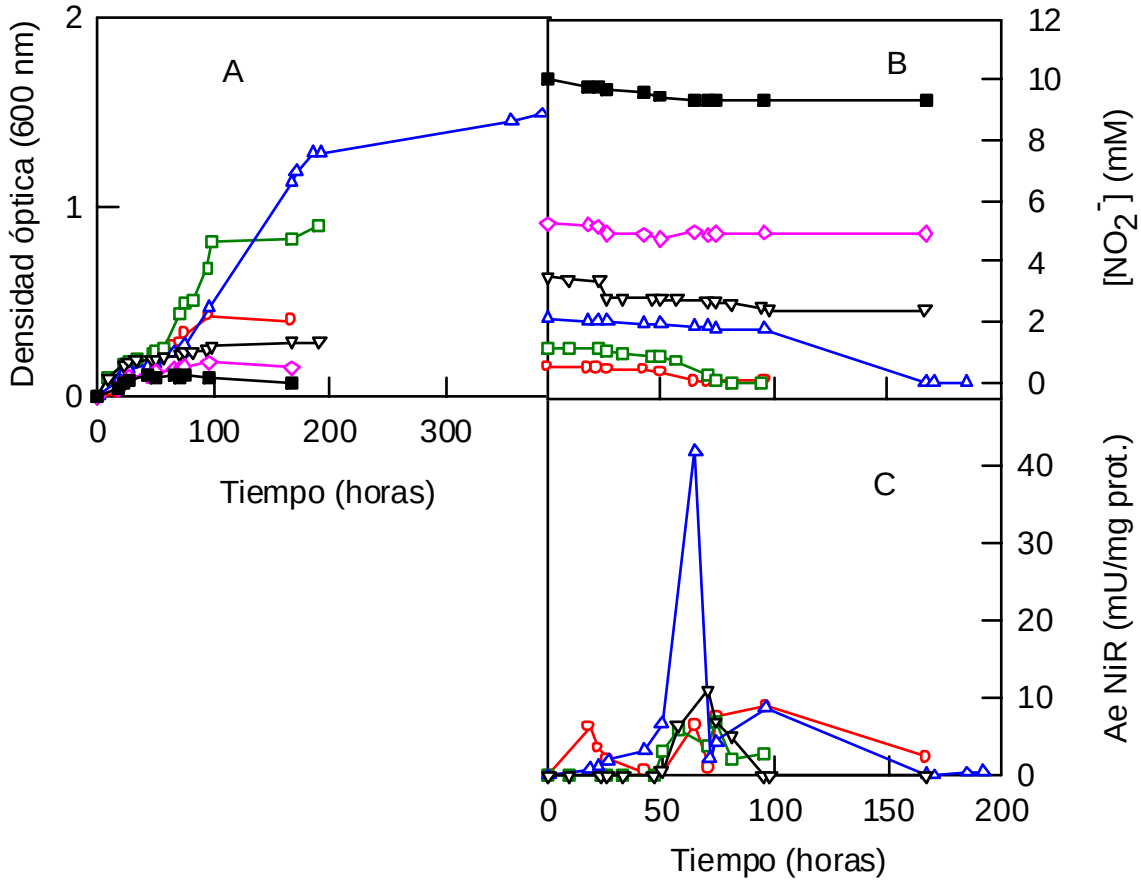

Figura 4.6. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de NO_2^-. 0,5 mM (○), 1 mM (□), 2 mM (Δ), 3,5 mM (∇), 5 mM (◊) y 10 mM (■) NO_2^-. A: curvas de crecimiento; B: nitrito consumido; C: actividad NiR (mU/mg prot.).

En medios con 2 mM 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 NO_2^-.

En medios de cultivo con concentraciones de 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 NO_3^-, se detecta una excreción de 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 NO_2^-, encontrando que la acidificación de los mismos a lo largo del crecimiento celular es mucho más acusada que en los medios con NO_3^- (apartado 4.1, págs 39-42).

Con el fin de estimar la máxima concentración de 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). Cómo puede observarse, *Haloferax mediterranei* es capaz de crecer en medios con 5 mM NO_2^-, pero concentraciones superiores resultaron tóxicas para este organismo.

$[NO_2^-]$ (mM)	D.O (Abs 600 nm)
5 mM	2,1
25 mM	1,3
75 mM	0,5

Tabla 4.3. Crecimiento celular de *Haloferax mediterranei* (estimado mediante medidas de D.O a 600 nm) en fase estacionaria en medios de cultivo con NO_2^-.

Si concentraciones superiores a 5 mM NO_2^- son tóxicas para *Haloferax mediterranei*, resulta difícil explicar el crecimiento celular observado en medios con altas concentraciones de NO_3^-, en los cuales la excreción de 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 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 NO_3^-, 2 mM NO_2^- o sin fuente de nitrógeno. Los resultados procedentes de este ensayo quedan recogidos en la siguiente figura:

BIBLIOTECA VIRTUAL

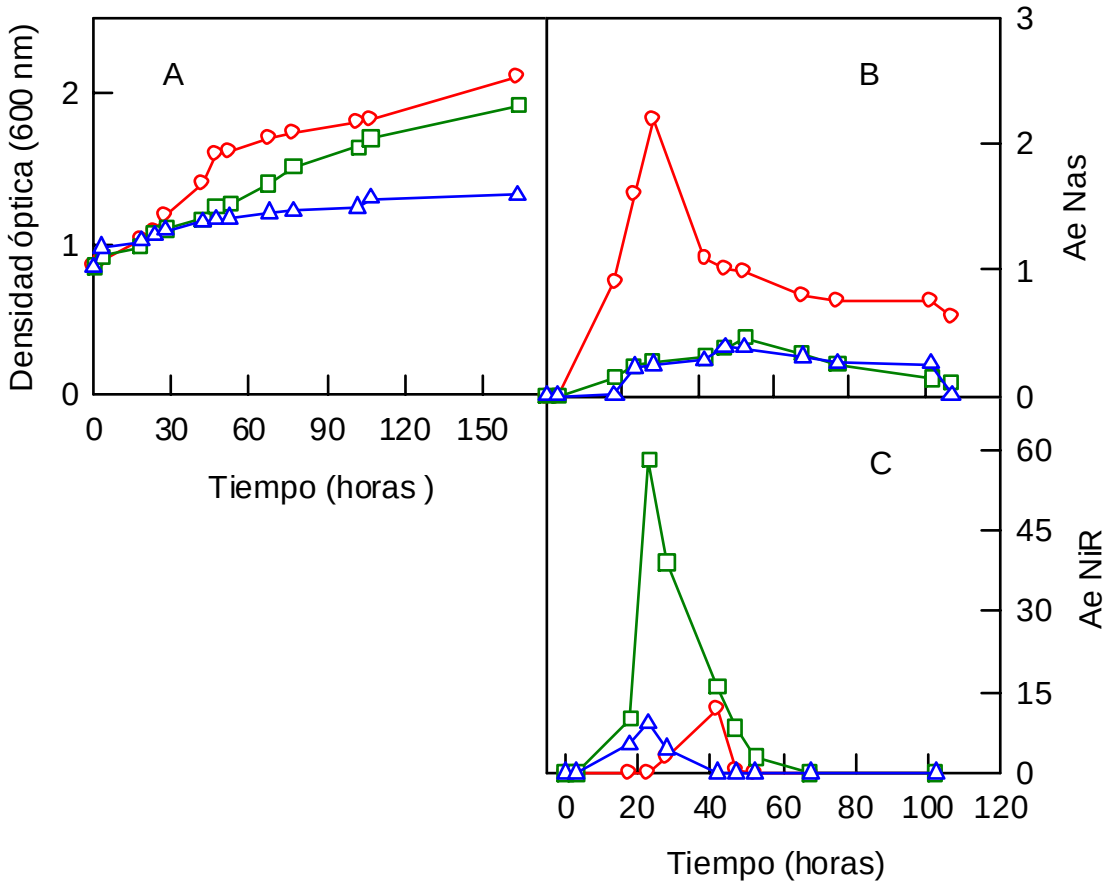

Figura 4.7. Inducción de las actividades MV-Nas y MV-NiR. Células de *Haloferax mediterranei* crecidas en medio mínimo con 20 mM de NH_4^+ fueron cosechadas y lavadas para ser posteriormente transferidas a medios con 5 mM NO_3^- (○), 2 mM NO_2^- (□) o sin fuente de nitrógeno (Δ). A: curvas de crecimiento; 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 NO_3^- superiores a 5 mM; D.O en fase estacionaria = 2,3), siendo ligeramente inferior en medios con NO_2^- o sin fuente de nitrógeno.

Tanto la actividad Nas como la NiR se detectaron en medios con NO_3^-, 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 NO_3^- es un 79 % superior a la detectada en medios con NO_2^-, mientras que la actividad NiR asimilativa en medios con NO_2^- supera en un 81% a la actividad NiR detectada en medios con NO_3^-. Este comportamiento, también ha sido descrito en cianobacterias fijadoras y no fijadoras de N_2. En muchos de estos organismos, no es necesaria la presencia de 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 NO_3^- ejerce un efecto positivo sobre la enzima (Herrero *et al*., 1984). Así mismo, el NO_3^- y el 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_2 en la asimilación del nitrógeno (Fresnedo, 1991; Ochoa de Alda *et al.*, 1995).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

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_3^- 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_2^-, 25 mM de NO_3^-, 100 mM de NH_4^+ o bien a medios sin fuente de nitrógeno.

Como se aprecia en la figura 4.8, la D.O de los cultivos con NO_3^- y con NH_4^+ 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_2^- (figura 4.9, pág. 56) es considerablemente inferior (D.O máxima = 1,23).

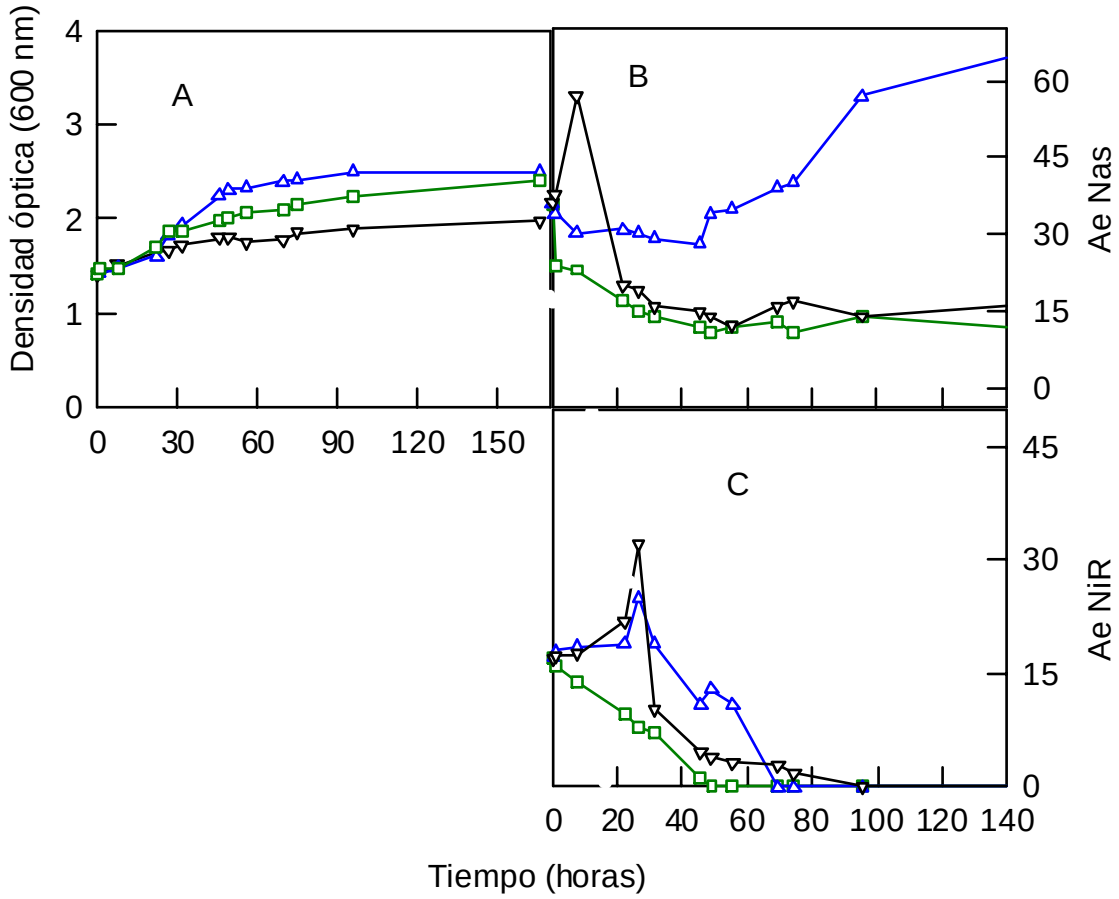

Figura 4.8. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios con 25 mM NO_3^- (Δ), 100 mM NH_4^+ (□) o a medios carentes de nitrógeno (∇). A: curvas de crecimiento; B: actividad Nas (mU/mg prot.); C: actividad 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 NO_3^- son transferidas a medios sin fuente de N o con una [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 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 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 NO_3^- dicha actividad aumenta, debido al efecto positivo del NO_3^-.

Por contra, los niveles de actividad Nas y NiR asimilativa disminuyen si las células se transfieren a medios con 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 NH_4^+. Este comportamiento coincide con el descrito para cianobacterias (Tapia *et al.*, 1996).

Cuando las células crecidas en NO_3^- se transfieren a medios con 2 mM de 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.

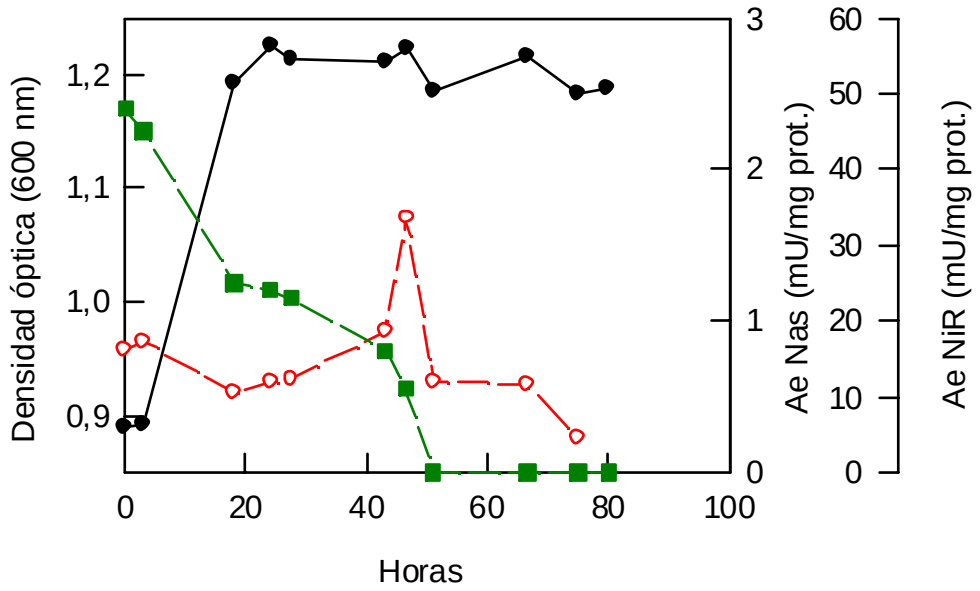

Figura 4.9. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios 2 mM NO_2^-. Densidad óptica (●), actividad específica Nas (○) y actividad específica NiR (■).

El NO_2^- es un inhibidor competitivo del transporte de 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 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).

BIBLIOTECA VIRTUAL

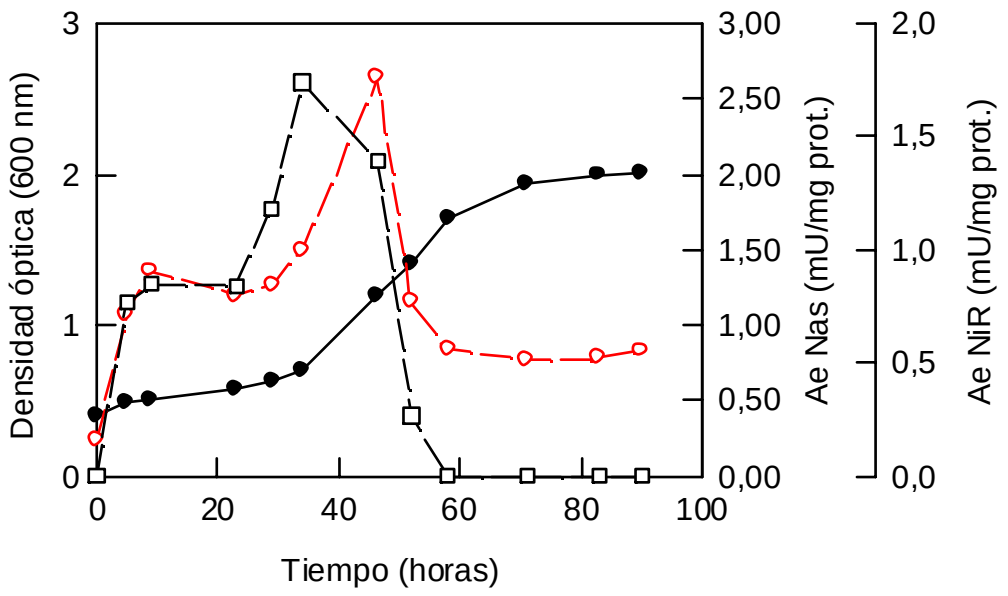

Figura 4.10. Recuperación de las actividades Nas y NiR tras la eliminación del amonio. En las células que fueron transferidas a medios con 100 mM NH_4^+ no se detectó actividad Nas ni NiR en fase estacionaria. Tras cosecharlas y lavarlas, se transfirieron a medios frescos con 5 mM NO_3^-. Densidad óptica (•), 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 NO_3^- hasta la mitad de la fase exponencial. Tras ser cosechadas y lavadas, se transfirieron a medios de cultivo con 2 mM de NO_3^-+ 2 mM de NO_2^-, 2 mM NH_4^+ + 2 mM de NO_2^-, o bien a medios de cultivo con 5 mM de NO_3^- +5 mM de NH_4^+.

El amonio es capaz de impedir la entrada de 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 NO_3^- y 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 NO_3^- y NH_4^+, durante las primeras 28 horas de incubación tras las cuales, descendió considerablemente. En medios con NO_3^- y NO_2^- ó NO_2^- y NH_4^+, la actividad Nas se mantuvo prácticamente constante.

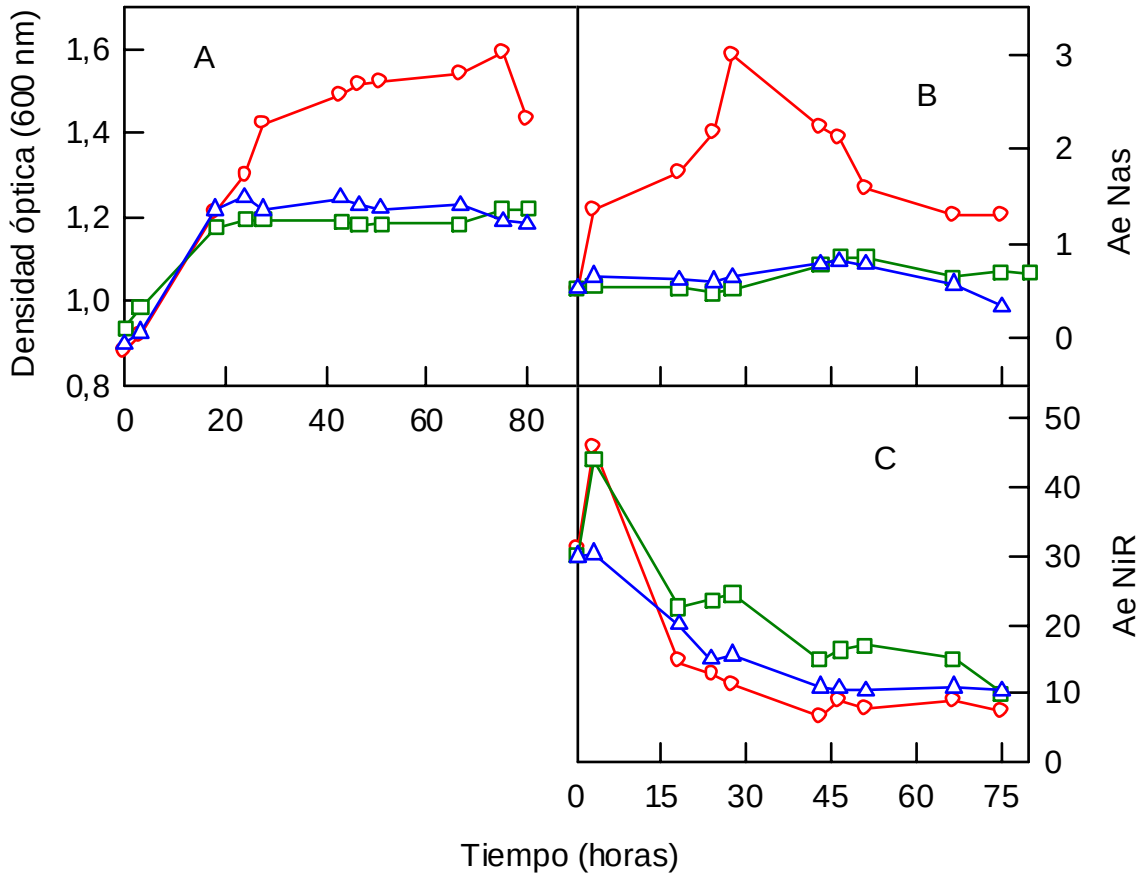

Figura 4.11. Influencia del cambio de fuente de nitrógeno. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a medios con 5 mM NH_4^+ + 5 mM NO_3^- (○), 2 mM NH_4^+ + 2 mM NO_2^- (□) o a medios con 2 mM NO_3^- + 2 mM NO_2^- (Δ). A: curvas de crecimiento; B: actividad específica Nas (mU/mg prot.); C: actividad específica NiR (mU/mg prot.).

La actividad NiR asimilativa incrementó en medios con NO_3^- y NH_4^+ ó NO_2^- y NH_4^+ 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_2^- son superiores, debido al efecto positivo que probablemente ejerce éste sobre la NiR. En medios con NO_3^- y NO_2^-, la actividad NiR fue descendiendo progresivamente.

Al final de la fase exponencial se cuantificó la concentración de NO_3^-, NO_2^- y 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.

Composición inicial	***[NO_3^-] (mM)***	***[NO_2^-] (mM)***	***[NH_4^+] (mM)***
2 mM NO_3^- + 2 mM NO_2^-	1,60 ± 0,04	1,80 ± 0,03	---
2 mM NH_4^+ + 2 mM NO_2^-	---	1,70 ± 0,03	1,5 ± 0,1
5 mM NO_3^- +5 mM NH_4^+	4,50 ± 0,04	---	3,7 ± 0,1

BIBLIOTECA VIRTUAL

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 NH_4^+ cuando éste se encuentra en el medio junto con el NO_3^-. Son numerosos los estudios que verifican la preferencia por el NH_4^+ en organismos de muy diferente naturaleza, ya que como se ha mostrado, la asimilación del NH_4^+ inhibe la asimilación del NO_3^- (Taguchi y Kinzic, 2001; Tapia *et al*., 1996; Eppley *et al*., 1969). En presencia de NH_4^+ y NO_2^- también existe una preferencia por NH_4^+.

Si en el medio de cultivo se encuentran NO_3^- y NO_2^- conjuntamente, se consume preferentemente el primero. La destacada asimilación de NO_3^- respecto del NO_2^-, podría explicar, al menos en parte, porqué no se inhibe el crecimiento celular de *Haloferax mediterranei* en medios con 100 mM NO_3^- y 15 mM 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 NO_3^- y 15 mM 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 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 $(NH_4)_2SO_4$ hasta una concentración final de 5 mM y se realizó un seguimiento de las actividades, crecimiento celular y NO_2^- excretado (figura 4.12).

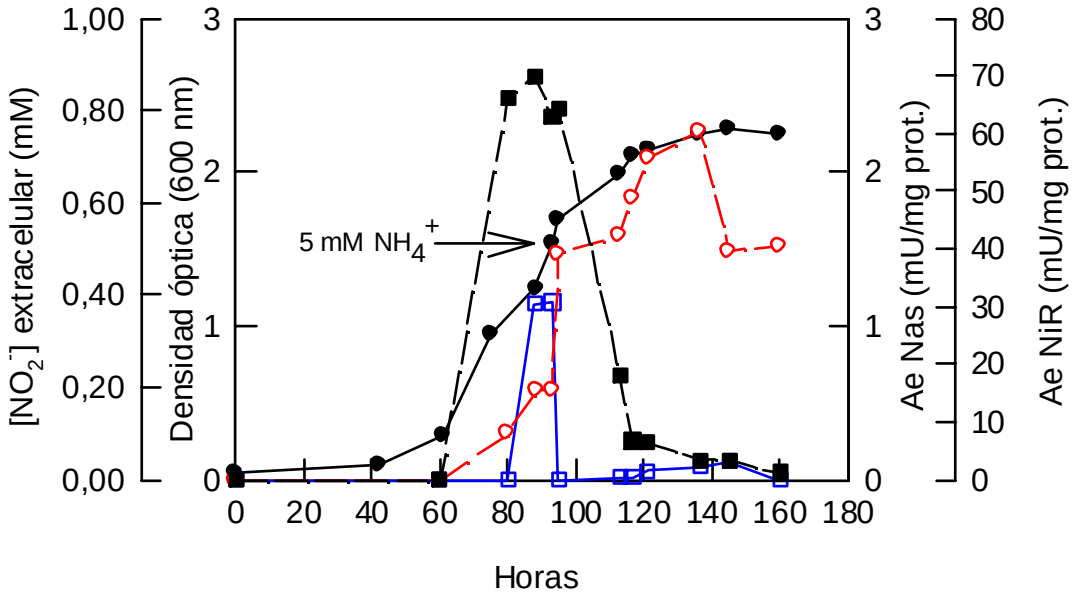

Figura 4.12. Efecto de la adición de 5 mM de sulfato amónico en un medio mínimo con 100 mM NO_3^-. Densidad óptica (●), actividad Nas (○), actividad NiR (■) y NO_2^- excretado al medio (□).

El $(NH_4)_2SO_4$ se adicionó (5 mM concentración final) cuando la concentración de NO_2^- excretado al medio alcanzó un valor de 0,38 mM. Tras la adición del sulfato amónico, la excreción de NO_2^- cesó y el 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 NO_2^- excretado es, posiblemente, la responsable del desarrollo de dicha actividad NiR durante tanto tiempo, aún en presencia de NH_4^+. La actividad Nas incrementó progresivamente, debido a la elevada concentración de NO_3^- presente en el medio. El NH_4^+ tiene un efecto negativo en el transporte de NO_2^-, pero el NO_2^- puede difundir como ácido nitroso (pK_a = 3,4) hacia el citoplasma en presencia de NH_4^+ (Tapia *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 1987). Además, el NO_2^- inhibe el transporte de NO_3^- (Rodríguez *et al.*, 1992). Ambos hechos podrían explicar la reabsorción de NO_2^- que tiene lugar en presencia de NO_3^- y NH_4^+.

Es posible que el desequilibrio en el balance C/N genere la reabsorción del 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 CO_2 (en cianobacterias), por otro (apartado 4.4., pág. 51-53). Para determinar si la reabsorción de 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 NO_3^- (se disminuye la

concentración total de nitrógeno para igualarla a la de glucosa). Además de cuantificar la cantidad de 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 NO_2^- tanto si se añadía 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ como si se adicionaba 5 mM CH_3COONH_4 (figura 4.13). La actividad IDH fue prácticamente indetectable.

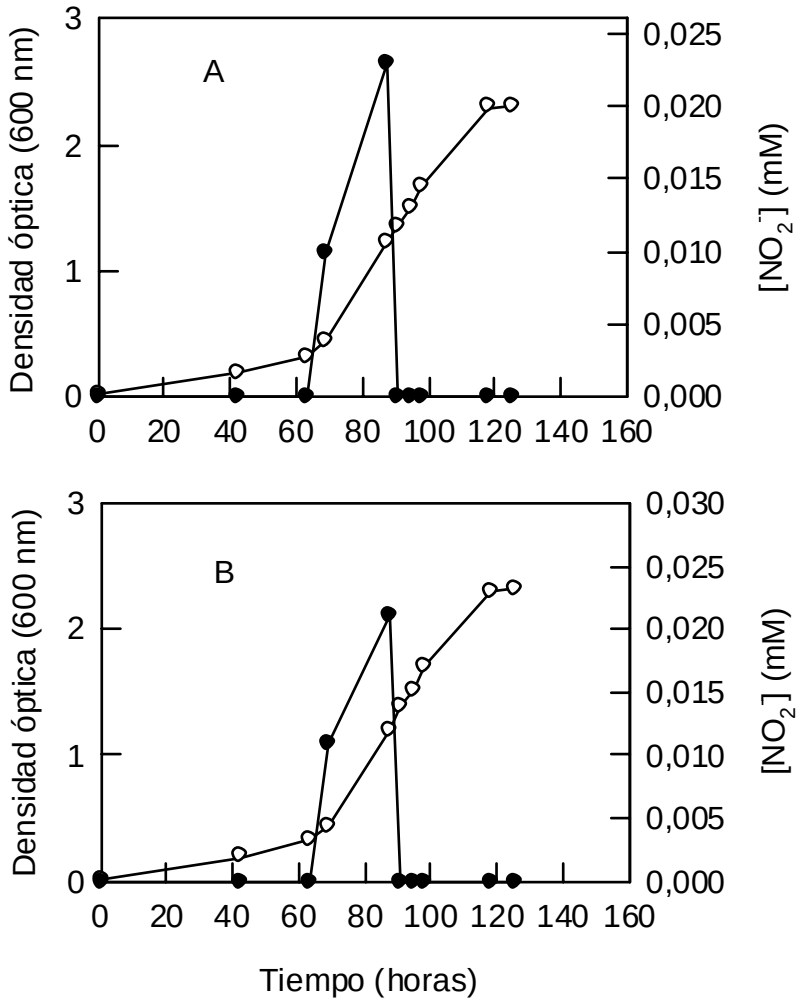

Figura 4.13. Efecto de la adición de 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ (A) o 5 mM CH_3COONH_4 (B) en medios mínimos con 5 mM NO_3^-. NO_2^- excretado al medio (●) y densidad óptica (○).

Estos resultados, podrían indicar que en presencia de NH_4^+ y 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 NO_2^- excretado.

Las células del medio B fueron cosechadas, lavadas y transferidas a un medio de cultivo que tenía 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ 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 inhibidor 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 NH_4^+, por la reabsorción de NO_2^- (figura 4.12, pág. 61), en presencia de 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 NH_4^+ (figura 4.14).

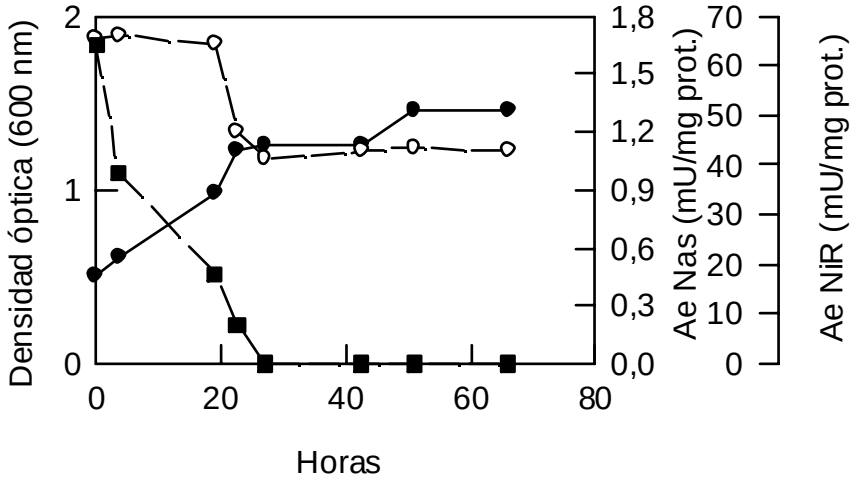

Figura 4.14. Células crecidas en medio mínimo con 100 mM NO_3^- hasta la mitad de la fase exponencial fueron transferidas a un medio mínimo con 5 mM NH_4^+. Densidad óptica (●), actividad Nas (○) y actividad NiR (■).

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 NO_3^- o NH_4^+. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 4.15.

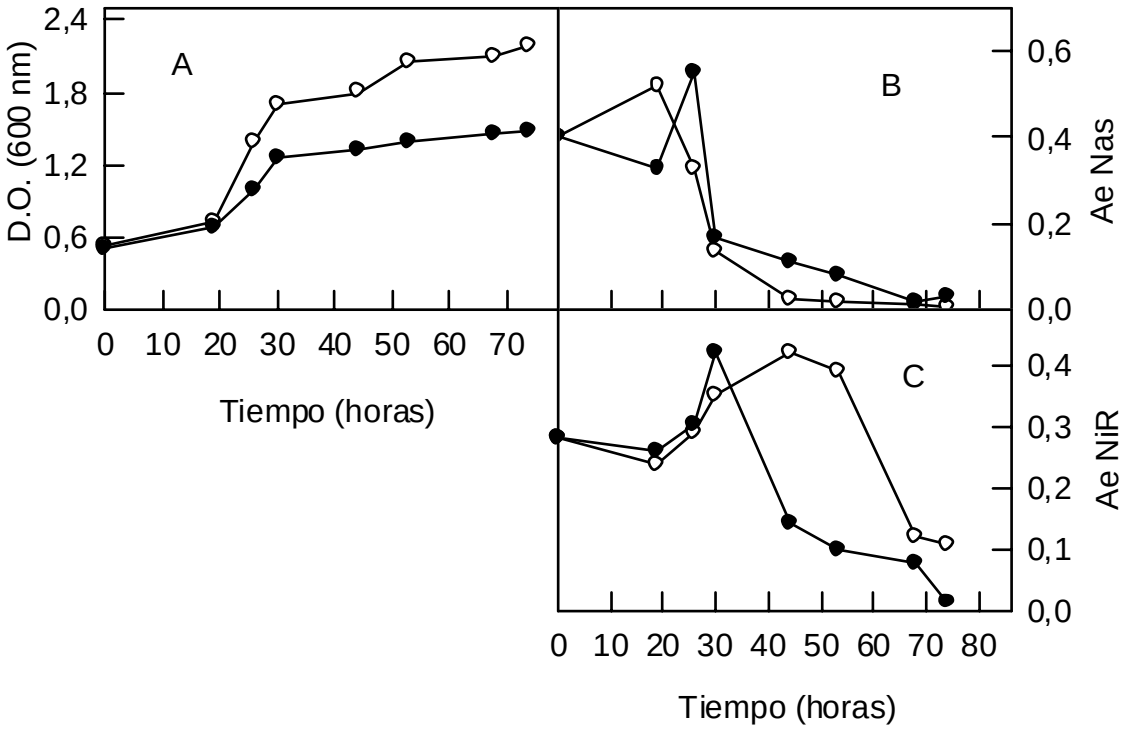

Figura 4.15. Efecto del MSX sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a tiempo 0, a medios con 5 mM NH_4^+ + MSX (●) o medios con 5 mM NO_3^- + MSX (○). A: curvas de crecimiento; B: actividad específica 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 NH_4^+ ó 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 NO_3^- o con 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 α-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 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 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 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_3^-. 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).

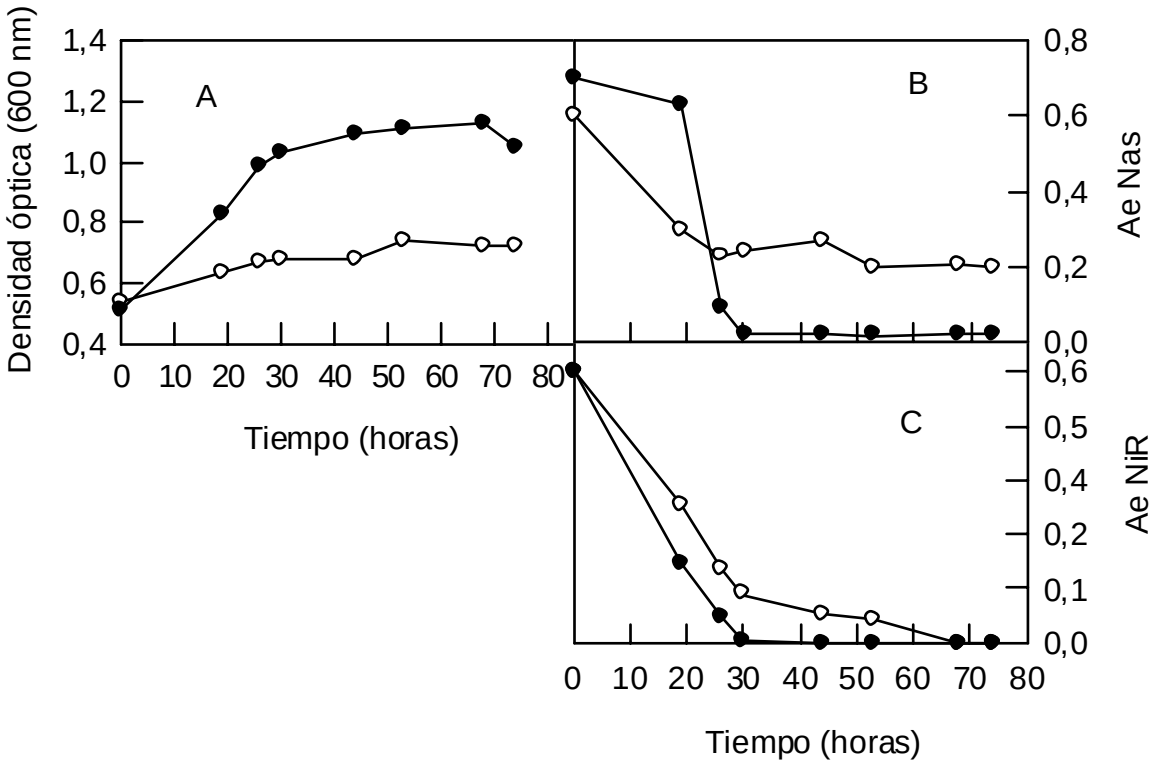

Figura 4.16. Efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron transferidas a tiempo 0 a medios con 5 mM NH_4^+ (●) o medios con 5 mM NO_3^- + cloranfenicol (50 mg/l) (○). A: curvas de crecimiento; B: actividad Nas (mU/mg prot.); C: actividad NiR (mU/mg prot.).

El crecimiento con 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 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 NH_4^+, pero los niveles de actividad en medios con NO_3^- y cloranfenicol, fueron ligeramente superiores a los detectados en medios con 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 (Bawlows *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 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.

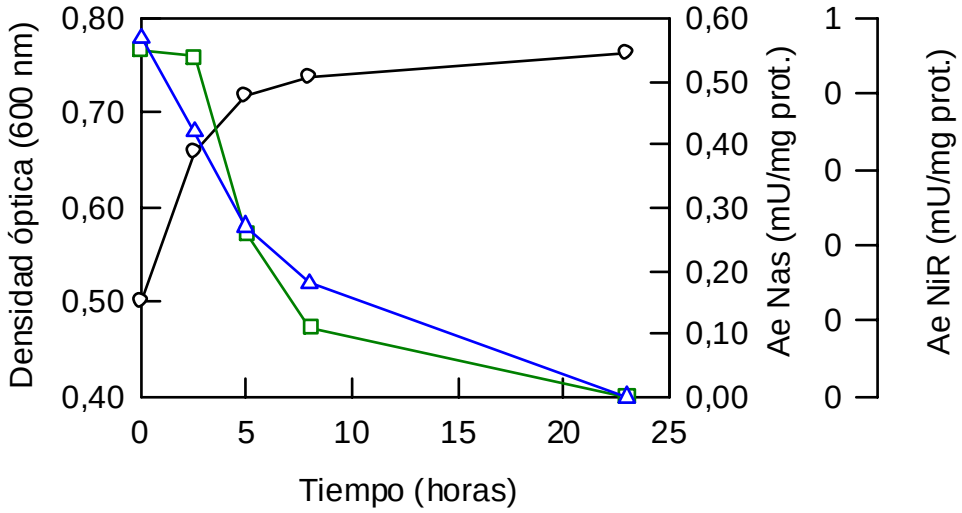

Figura 4.17. Efecto de la rifampicina sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas. Células crecidas en 100 mM de NO_3^- hasta mitad de la fase exponencial, fueron lavadas y transferidas a medios con 5 mM NO_3^- + rifampicina (50 mg/l). Densidad óptica (○), actividad Nas (□) y NiR (Δ).

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 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 μM, lo que provocó un descenso considerable de la actividad Nas, además de una disminución de la velocidad de crecimiento. La adición posterior de 200 μM de molibdeno generó un incremento de la actividad Nas hasta alcanzar valores muy próximos a los iniciales (figura 4.18).

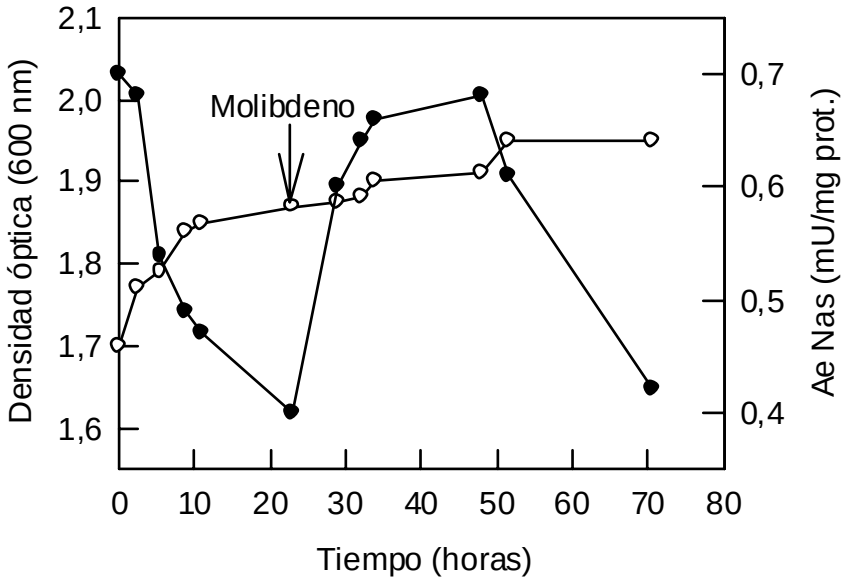

Figura 4.18. Efecto del wolframio y el molidbdeno en el crecimiento y en la actividad Nas. A tiempo cero se añadió 100 μM de wolframio a células cultivadas en medio mínimo con 100 mM NO_3^-. La flecha indica el momento en que se adicionó molibdeno hasta una concentración final de 200 μM. Actividad Nas (●) y curva de crecimiento celular (○).

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 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 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 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).

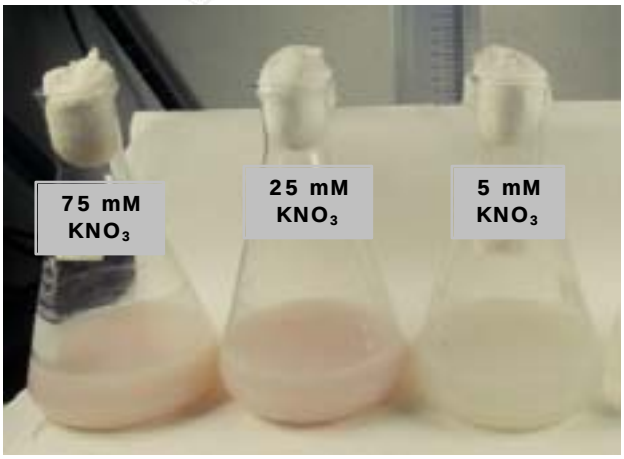

Figura 4.19. Cultivos de *Haloferax mediterranei* en medio mínimo con diferentes concentraciones de nitrato. Todos ellos tienen una densidad óptica en fase estacionaria entorno a 2,4.

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_{50}- bacterioruberinas se sintetizan mediante la adición de una unidad de isopreno-C_5 a cada uno de los extremos de la cadena C_{40}-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 ºC) 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^+ asociadas al transporte de NO_3^- y/o NO_2^-. 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 sintesis 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).

Fuente de nitrógeno	***D.O (600 nm)***	***pH***
5 mM KNO_3	2,10	6,88
25 mM KNO_3	2,30	8,00
100 mM KNO_3	2,45	8,20
0,5 mM KNO_2	0,70	6,00
1 mM KNO_2	0,90	6,00
2 mM KNO_2	1,40	5,90
100 mM $(NH_4)_2SO_4$	2,43	6,56
100 mM CH_3COONH_4	2,45	7,70
5 mM KNO_3 + 5 mM CH_3COONH_4	2,34	7,70
5 mM KNO_3 + 5 mM $(NH_4)_2SO_4$	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 NO_3^- (el pH aumentó hasta valores cercanos a 8,20; tabla 4.5), dan lugar a espectros con mayor intensidad de absorción.

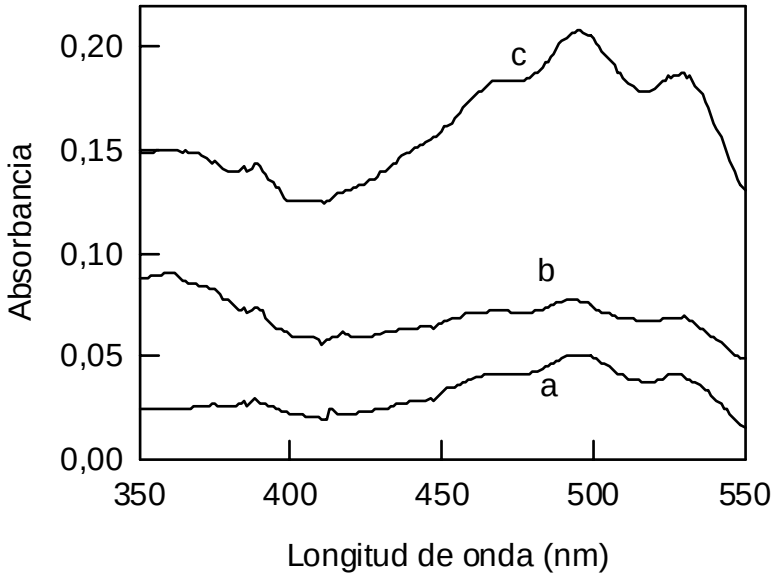

Figura 4.20. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,4, en todos los casos), crecidas en medios con 5 (a), 25 (b) y 100 mM NO_3^- (c).

En medios de cultivo con NO_2^- sin control continuo de pH, el pH inicial (7,3) descendió bruscamente por el metabolismo de la glucosa y el consumo del 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).

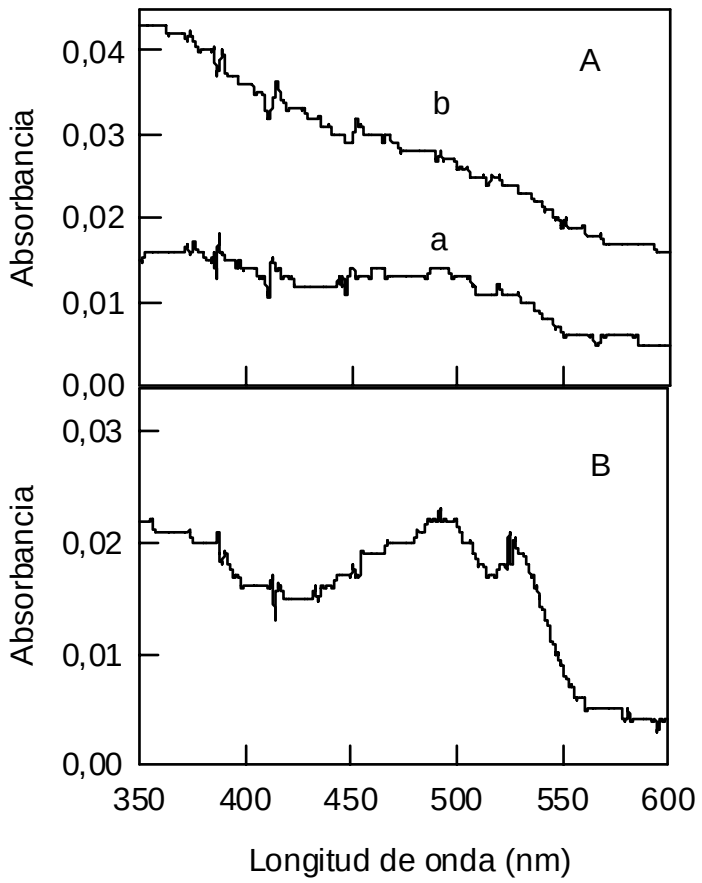

Figura 4.21. A: espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 1, en ambos casos), crecidas en medios con 0,5 (a) y 1 mM NO_2^- (b). B: espectro obtenido a partir de células crecidas en 5 mM NO_2^- con control 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).

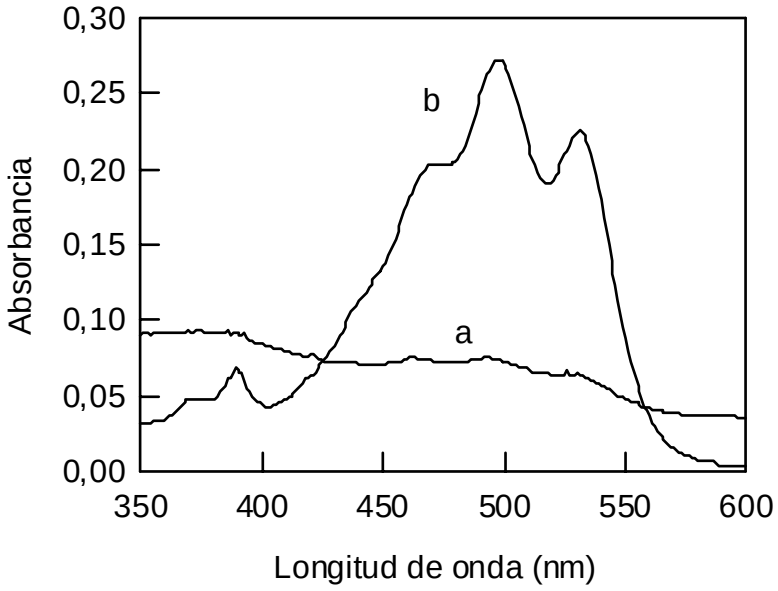

Figura 4.22. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,4, en todos los casos), crecidas en medios con 100 mM sulfato amónico (a) y 100 mM acetato amónico (b).

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.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL D

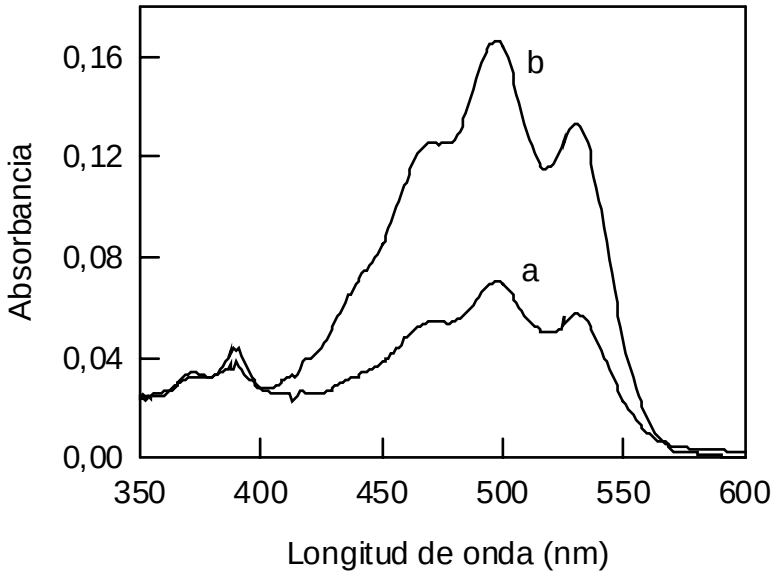

Figura 4.23. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,3, en todos los casos), crecidas en medios con 5 mM NO_3^- + 5 mM sulfato amónico (a) y 5 mM NO_3^- + 5 mM acetato amónico (b).

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.

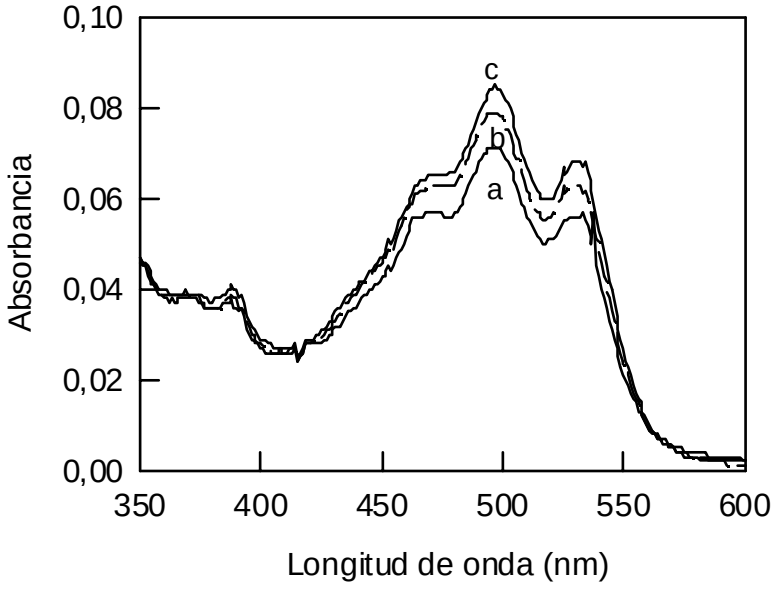

Figura 4.24. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei* en fase estacionaria (D.O = 2,3, en todos los casos), crecidas en medios máximos con 0,5 mM acetato amónico (a); 5 mM acetato amónico (b) y 50 mM acetato amónico (c).

Finalmente, para establecer la relación existente entre la síntesis de bacterioruberinas en *Haloferax mediterranei* y el pH del medio de cultivo, independientemente de la fuente de nitrógeno y carbono, se llevó a cabo el siguiente ensayo: *Haloferax 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.

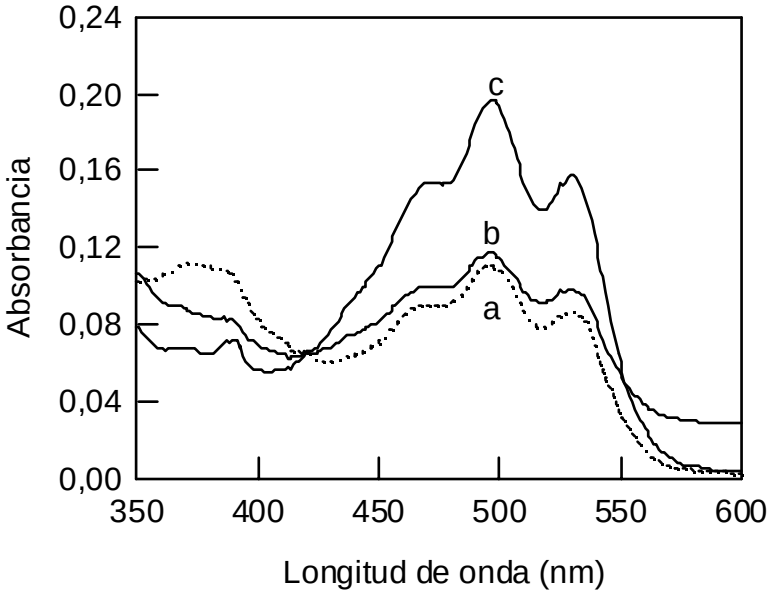

Figura 4.25. Espectro de absorción del extracto soluble en acetona obtenido a partir de células de *Haloferax mediterranei.* Las células fueron crecidas a pH 7,3 en medio máximo (0,5 % extracto de levadura). Cuando la D.O era 1,8, parte de las células fueron transferidas a medios máximos pH 5 (a), pH 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 NO_3^- cuando el cultivo se encontraba en la mitad de la fase exponencial (D.O = 1,2). Si la concentración de NO_3^- extracelular es superior a 5 mM, tiene lugar una excreción de NO_2^- al medio que es proporcional a la concentración inicial de NO_3^-. La excreción coincide con la pérdida de las actividades Nas y NiR asimilativas.

- *Haloferax mediterranei* puede utilizar NO_2^- como única fuente de nitrógeno. En medios con NO_2^- sin tamponar, se genera una brusca acidificación del medio que da lugar a una fase estacionaria temprana (el transporte del NO_2^- acoplado a bombas de 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 NO_2^-; concentraciones superiores resultaron tóxicas.

- Los perfiles de inducción de las actividades Nas y NiR asimilativa tras la transferencia de células crecidas con NH_4^+ a medios de cultivo sin fuente de nitrógeno, NO_3^- ó 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 NH_4^+ como única fuente de nitrógeno no tiene lugar la reducción asimilativa del nitrógeno. La inhibición por NH_4^+ es reversible. Si la asimilación del NH_4^+ se inhibe mediante la adición de MSX a los cultivos, tiene lugar una reversión del efecto negativo del NH_4^+ (incremento de actividades Nas y NiR asimilativa), por lo que un metabolito de su asimilación, más que el NH_4^+ *per se*, causa la inhibición de la vía asimilativa. El NH_4^+ fue preferentemente consumido por *Haloferax mediterranei* en medios en los que además de dicha fuente, están presentes el NO_3^- ó 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.

5-. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1-. PURIFICACIÓN DE NITRATO Y NITRITO REDUCTASAS ASIMILATIVAS.

5.1.1-. EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES NAS Y NIR ASIMILATIVAS DURANTE EL DESARROLLO DEL CULTIVO (MEDIO MÍNIMO 100 mM KNO_3).

Tras los estudios fisiológicos de asimilación del nitrógeno en *Haloferax mediterranei*, se ha observado que la duración de la incubación del cultivo es de suma importancia para la expresión de las actividades Nas y NiR asimilativa (apartado 4). Si se quiere detectar dichas actividades, la densidad óptica de los medios debe ser aproximadamente 1,3 (600 nm), momento en que el cultivo se encuentra en la mitad de la fase exponencial y no ha tenido lugar la excreción de NO_2^- al medio. Durante la fase exponencial, también llamada *fase logarítmica de crecimiento*, el crecimiento de la población queda definido por la expresión:

$$Z = Z_o \times 10^{K(t-t_0)/2,303}$$

donde K es la constante de velocidad de crecimiento, y Z y Z_0 corresponden a la cantidad de cualquier componente microbiano del cultivo en los tiempos t y t_0, respectivamente.

En esta fase, cabe esperar que la síntesis de enzimas implicadas en el crecimiento de la biomasa sea máxima. Si las actividades Nas y NiR asimilativas, están implicadas en la síntesis de aminoácidos que constituyen las proteínas, su expresión será máxima durante la fase exponencial.

La fase exponencial no se mantiene indefinidamente, ya que el crecimiento de la población de *Haloferax mediterranei*, al igual que ocurre en el resto de microorganismos, está limitado normalmente por el agotamiento de nutrientes disponibles o por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia, la velocidad de crecimiento disminuye llegando a detenerse. En este punto del crecimiento se dice que el cultivo está en la *fase estacionaria*. La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un período de crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. El cultivo de *Haloferax mediterranei* nunca debe llegar a esta fase, si se quiere purificar Nas y NiR asimilativa en condiciones óptimas para la expresión de ambas enzimas. Con el fin de interrumpir el crecimiento en el momento adecuado, se hizo un seguimiento del mismo mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm (figura 4.1, pág 44).

Como se ha detallado en el apartado 4.2.1 (pág 43), la actividad NiR es máxima en la mitad de la fase exponencial, precedida de la actividad Nas.

Así mismo se realizó un seguimiento de la excreción de NO_2^- (figura 4.2, pág. 44) al medio de cultivo, encontrando que dicha excreción se inicia cuando el cultivo supera la mitad de la fase exponencial, siendo máxima en la fase estacionaria del crecimiento celular. La excreción de NO_2^- coincide con la pérdida de las actividades Nas y NiR asimilativas.

En resumen, para purificar en condiciones óptimas las Nas y NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*, las células deben cosecharse a mitad de la fase exponencial, antes de que comience la excreción de NO_2^- al medio.

5.1.2-. PURIFICACIÓN DE LA NITRATO REDUCTASA ASIMILATIVA (NAS).

Etapa 1. Cromatografía en Sepharosa-4B. Como se ha citado en materiales y métodos (pág. 32), ésta fue la primera etapa del proceso de purificación y en las fracciones de elución se hallaron dos actividades: Nas y NiR asimilativas.

A partir de esta cromatografía se han desarrollado dos procesos de purificación (uno para la Nas y otro para la NiR asimilativa).

BIBLIOTECA VIRTUAL MiGUEL H

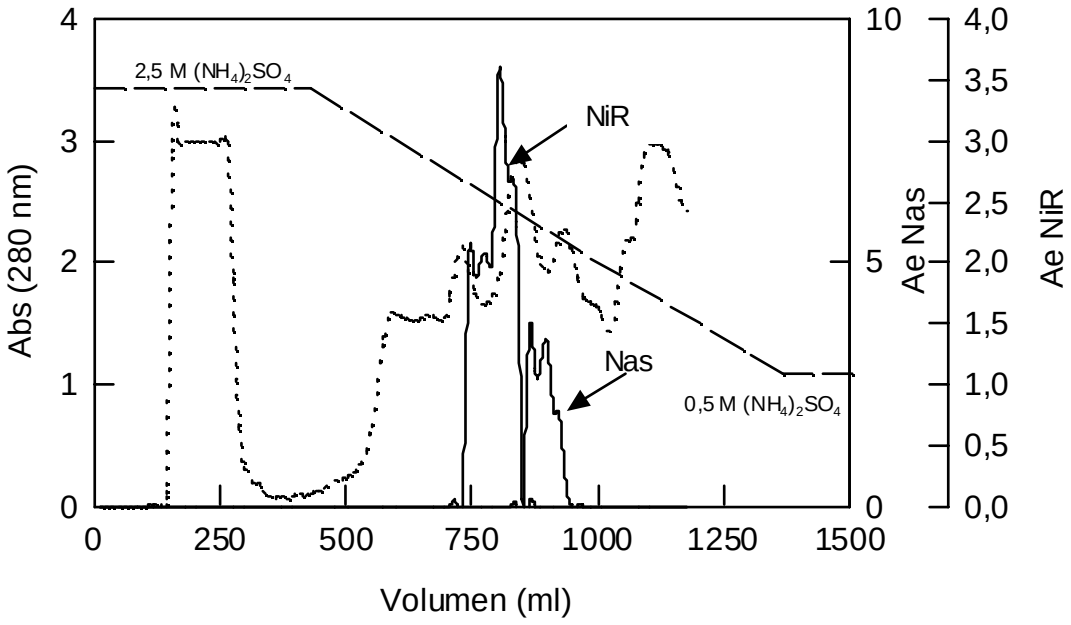

Figura 5.1. Cromatograma de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia a 280 nm (....), el perfil de actividades (___), así como el gradiente del tampón empleado para la elución (- - - -). Las actividades Nas y NiR se expresan en (mU/mg proteína).

Etapa 2. Cromatografía en DEAE-celulosa. Tras el primer paso del proceso de purificación, se realizó una cromatografía en DEAE-celulosa cuyo cromatograma se recoge en la figura 5.2.

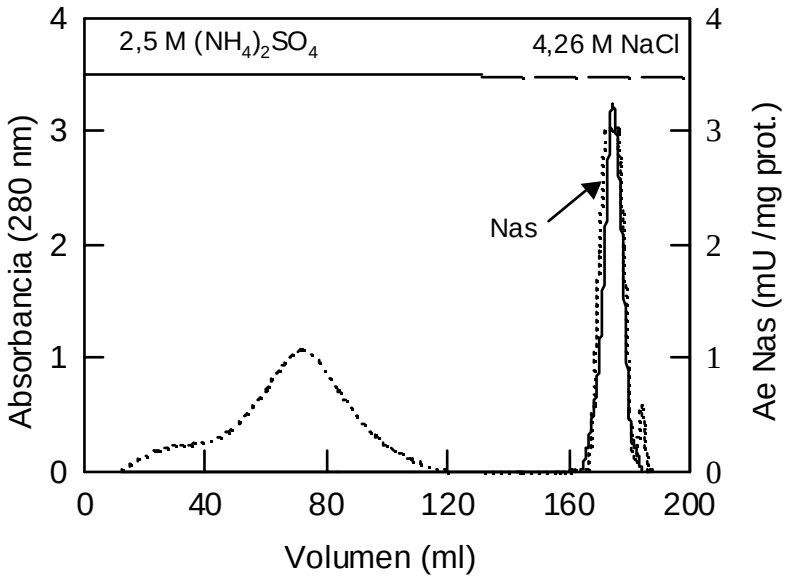

Figura 5.2. Cromatograma de DEAE-celulosa correspondiente a las fracciones con actividad Nas procedentes de la columna de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia (....) y el perfil de actividad Nas (___). Las líneas continua y discontinua de la parte superior del cromatograma, hacen referencia a los tampones empleados.

Las fracciones que presentaban actividad Nas tenían color marrón. Si este color es debido a la presencia de dicha enzima, podría indicar que en la estructura de ésta se encuentran grupos FAD, grupos hemo o bien grupos Fe-S (apartado 5.2.2.i, pág. 109).

Etapa 3. Cromatografía en Sephacryl S-300. Las fracciones con actividad Nas obtenidas en el anterior paso se utilizaron para la cromatografía en Sephacryl S-300, cuyo cromatograma aparece en la figura 5.3.

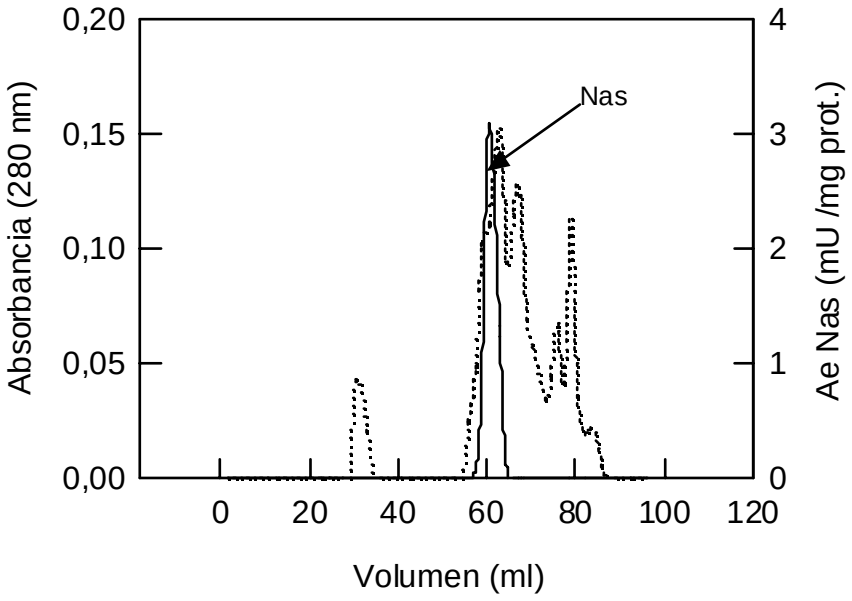

Figura 5.3. Cromatograma de Sephacryl S-300 correspondiente a las fracciones con actividad Nas procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (....) y el perfil de actividad específica Nas (___).

El peso molecular estimado para la Nas mediante esta columna cromatográfica es 132 kDa ± 6 kDa. Tras esta etapa de purificación, la pérdida de actividad fue considerable. Con el fin de recuperar al menos parte de la actividad que la muestra tenía antes de pasarla por esta columna, se dializó frente a 200 volúmenes de tampón B (4,3 M NaCl). Como es sabido, las enzimas de arqueas halófilas no son estables cuando la concentración de sal del medio en que se encuentran es baja. También se puede perder actividad dependiendo del tipo de sal presente en el medio (Zaccai y Eisenberg, 1990). El tampón empleado

en la columna de Sephacryl S-300 para eluir la muestra contiene 2 M NaCl, por lo que es posible que la enzima pierda actividad con este tampón, debido a la baja concentración de sal.

Fracción	**[prot.] mg/ml**	**Vol. (ml)**	**Actividad total (U)**	**A_e**	**f_p**	**R (%)**
Extracto crudo	7,00	124	2,65	3,10	1,0	100
Sepharosa-4B	2,20	59	0,40	3,08	1,0	15
DEAE-celulosa	2,50	8	0,11	5,50	1,8	4
Sephacryl S-300	0,40	1	0,22	550	177,0	8

Tabla 5.1. Tabla resumen del proceso de purificación de la Nas. La actividad enzimática total se expresa en unidades (μmoles NO_2^- formados min^{-1}). **f_p** es el grado de purificación, **R(%)** el rendimiento y **A_e** la actividad específica expresada en mU/mg proteína.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Tras realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se obtuvo el gel cuya imagen se presenta en la figura 5.4.

Las proteínas empleadas como patrones fueron: fosforilasa b (97,4 kDa), albúmina de suero bovino (66,2 kDa), glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (42,7 kDa), aldolasa (40,0 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa). La concentración de proteína cargada en cada calle fue 30 μg aproximadamente.

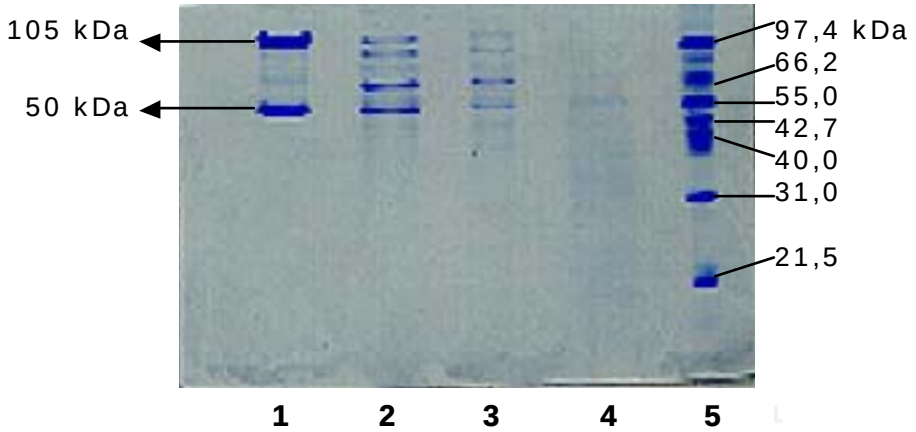

Figura 5.4. SDS-PAGE correspondiente al proceso de purificación de la Nas. Calle 1: Sephacryl S-300; Calle 2: DEAE-celulosa; Calle 3: Sepharosa-4B; Calle 4: extracto crudo y Calle 5: patrones.

Como puede observarse, aparecen dos bandas: una de 105 kDa y otra de 50 kDa. Debemos tener presente que la SDS-PAGE sobreestima el peso molecular de las proteínas obtenidas de halófilos debido a la considerable presencia de aminoácidos ácidos (Inatomi y Hochstein, 1996); de ahí que el peso estimado empleando cromatografía de tamizado molecular (Sephacryl S-300) sea más preciso (132 ± 6 kDa).

Se han purificado un gran número de NR no asimilativas a partir arqueas halófilas. NR heterodimérica (116 y 69 kDa) en *Haloferax denitrificans* (Hochstein y Lang, 1991); NR heterotrimérica (100, 60 y 31 kDa) procedente de *Haloferax volcanii* (Bickel- Sandkötter y Ufer, 1995), y homotetrámero (63 kDa) a partir de células de *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu *et al*., 2000). Estas diferencias podrían extenderse de igual forma entre las Nas en este domino, como ocurre en bacterias (Moreno-Vivián *et al*., 1999).

5.1.3-. PURIFICACIÓN DE LA NITRITO REDUCTASA ASIMILATIVA (NIR).

Etapa 1. Cromatografía en Sepharosa-4B. Tras la cromatografía en Sepharosa-4B (figura 5.1, pág 86), aquellas fracciones que presentaban actividad NiR se unieron para ser introducidas en una columna de DEAE-celulosa.

Etapa 2. Cromatografía en DEAE-celulosa. Después de proceder según se indica en materiales y métodos (página 32), se obtuvo el cromatograma que se recoge en la figura 5.5. Las fracciones con actividad NiR constituyeron la muestra que se introdujo seguidamente en la columna de Q-Sepharosa.

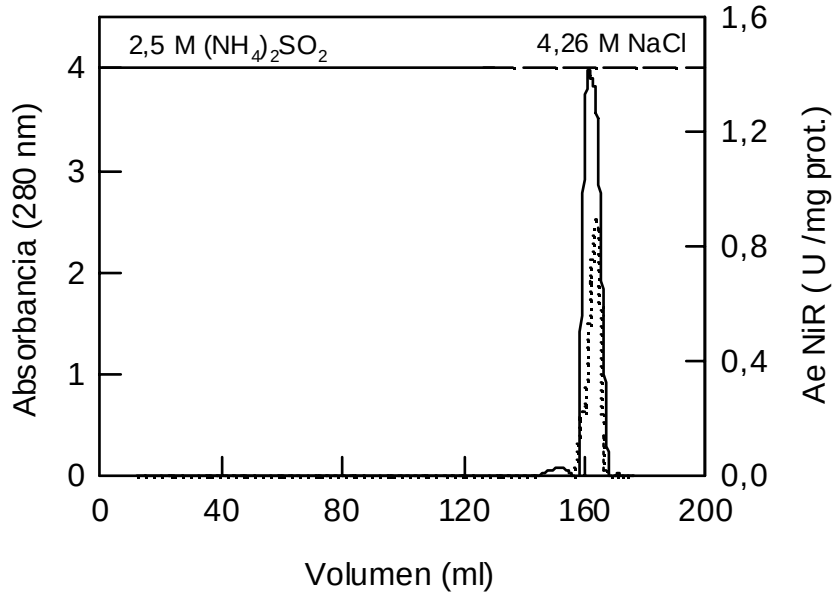

Figura 5.5. Cromatograma de DEAE-celulosa correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de Sepharosa-4B. Se ha representado el perfil de absorbancia (....) y el perfil de actividad NiR (___). Las líneas continua y discontinua que aparecen en la parte superior del cromatograma, hacen referencia a los tampones empleados.

Etapa 3. Cromatografía en Q-Sepharosa. El paso de las fracciones con actividad NiR por esta columna proporcionó el siguiente cromatograma:

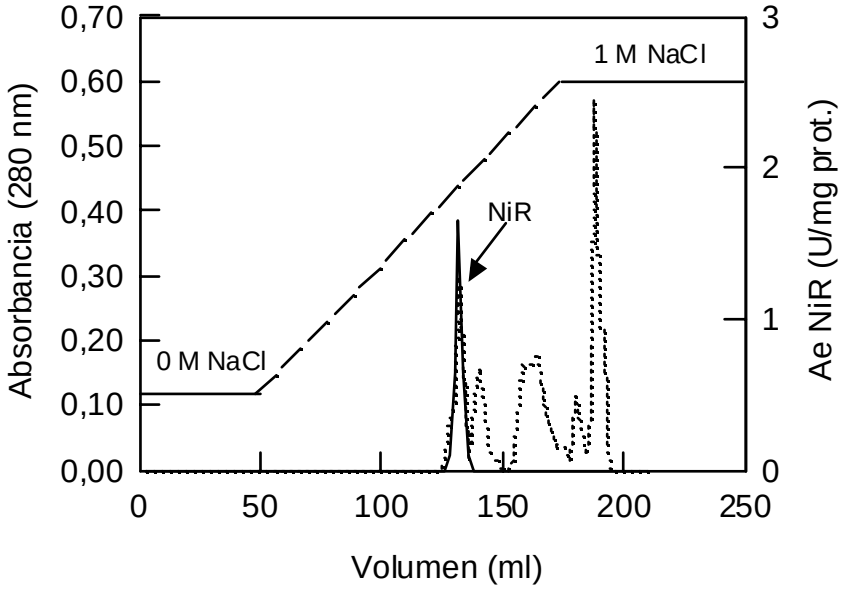

Figura 5.6. Cromatograma de Q-Sepharosa correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (....) y el perfil de actividad NiR (___), así como el gradiente del tampón empleado para la elución.

Fracción	[prot.] mg/ml	Vol. (ml)	Actividad total (U)	A_e	f_p	R (%)
Extracto crudo	7,76	30,0	80,08	0,34	1,0	100
Sepharosa-4B	0,75	38,0	60,62	2,13	6,2	76
DEAE-celulosa	2,21	4,5	22,47	2,26	6,6	28
Q-Sepharosa	0,11	2,0	3,50	15,79	46,0	4

Tabla 5.2. Tabla resumen del proceso de purificación de la NiR. La actividad enzimática total se expresa en unidades (μmoles NO_2^- descompuestos min^{-1}). **f_p** es el grado de purificación, **R(%)** el rendimiento y **A_e** la actividad específica expresada en U/mg proteína.

Parte de la muestra con actividad NiR procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa se introdujo en la columna de Sephacryl S-300 con el fin de estimar el peso molecular de la enzima nativa. El procedimiento llevado a cabo fue el mismo que el descrito para la Nas. La masa obtenida fue de 74 ± 6 kDa.

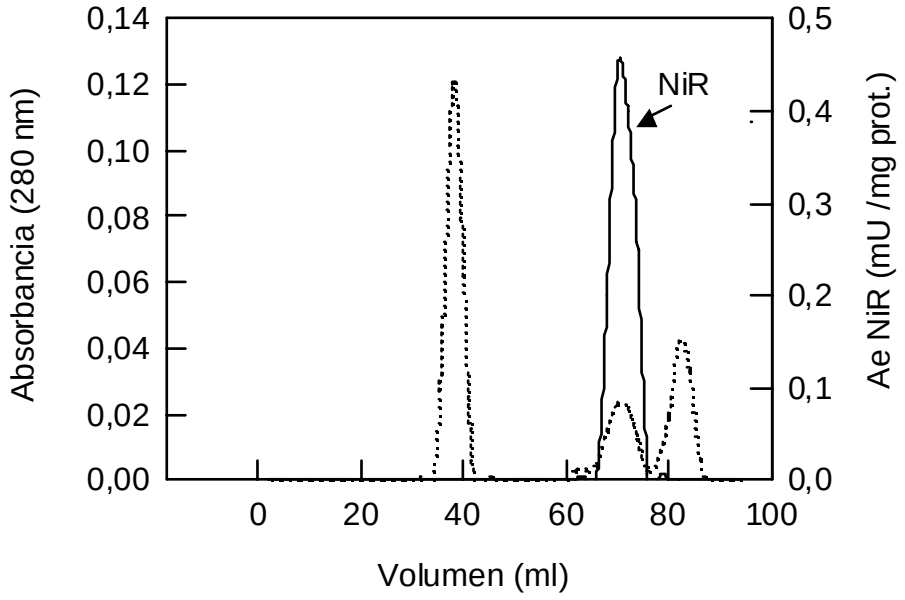

Figura 5.7. Cromatograma de Sephacryl S-300 correspondiente a las fracciones con actividad NiR procedentes de la columna de DEAE-celulosa. Se ha representado el perfil de absorbancia (....) y el perfil de actividad NiR (___). Esta columna se ha empleado únicamente para determinar el peso molecular de la NiR asimilativa. Al utilizarla para purificar la enzima, el rendimiento de la purificación resultaba muy bajo.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y nativa. La electroforesis en condiciones nativas de la enzima purificada procedente de la columna de Q-Sepharosa, mostraba dos bandas cuando se teñía con azul Coomassie (figura 5.8 a, calle 2). Sólo una de dichas bandas exhibía actividad NiR (figura 5.8 a, calle 1).

Esta banda fue cortada y sumergida en SDS al 10% durante toda la noche a 40 ºC, para extraer la proteína del gel. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la enzima purificada, procedente de la banda del gel nativo, mostraba tres bandas de 30,8 kDa ± 1,0 kDa, 62,1 ± 1,0 kDa y 66,5 ± 1,0 kDa (figura 5.8 b, calle 1). Mediante secuenciación de proteínas hemos demostrado que el péptido de menor peso molecular no corresponde a la NiR, ya que presenta gran homología con $NADP^+$ reductasas dependientes del factor 420 (transportador de electrones de bajo potencial). Así deducimos que la NiR es un monómero de 66,5 kDa. La segunda banda que aparece en SDS-PAGE (62,1 kDa) podría ser un producto de la degradación del monómero de 66,5 kDa, como ocurre en la NiR no asimilativa de *Haloferax denitrificans* (Inatomi y Hochstein, 1996). El tamaño obtenido de la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* es similar al de otras enzimas asimilativas de organismos no halofílicos (Romero *et al*., 1987).

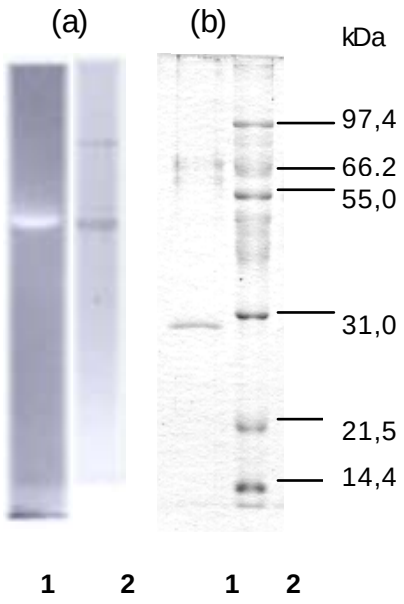

Figura 5.8. Geles de electroforesis de la purificación de la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei.* (a) Gel de electroforesis nativo: calle 1: tinción de actividad; calle 2: tinción con azul Coomassie. (b) SDS-PAGE: calle 1: NiR purificada a partir de la banda con actividad del gel nativo; calle 2: patrones.

5.2-. CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS.

5.2.1-. EFECTO DEL DITIONITO SÓDICO EN LA DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DEL NITRITO.

Se ha estudiado como influye la presencia de ditionito sódico (DT) empleado en la reducción del MV, una vez oxidado, en la determinación colorimétrica de NO_2^-. Para ello se prepararon alícuotas de 1 ml de la mezcla de reacción del ensayo MV-Nas. La mitad de las alícuotas sirvieron para los ensayos en ausencia de DT (alícuotas A) y la otra mitad para los ensayos en presencia de DT (alícuotas B). En ambos casos se añadió NO_2^-, a diferentes concentraciones, a las alícuotas (por duplicado). Todas las alícuotas se sumergieron en un baño a 60 ºC (temperatura a la que se han realizado los estudios de caracterización), durante 2 minutos, tras los cuales se añadió 17 mM de DT a las alícuotas B. El DT (disuelto en $NaHCO_3$ 0,1 M), se oxidó por agitación inmediatamente después de su adición. Seguidamente se cuantificó el NO_2^-.

Como puede apreciarse en la figura 5.9, la cantidad de NO_2^- detectado en las alícuotas A (ausencia de DT) es la misma que en las alícuotas B (presencia de DT). Blanco Mediavilla (Blanco Mediavilla, 1992) detectó una subestimación de la concentración de NO_2^- en presencia de DT oxidado. Nosotros no hemos observado este efecto cuando la concentración de DT presente en el ensayo era 17 mM.

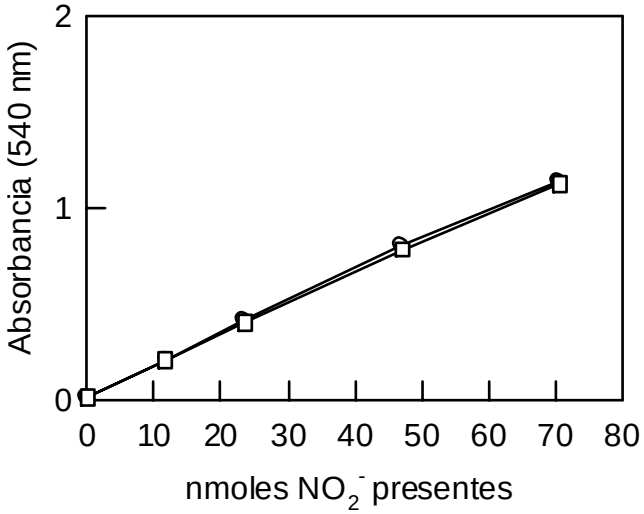

Figura 5.9. Efecto del DT (oxidado) en la determinación colorimétrica del NO_2^-. (○) Representa las alícuotas A (ausencia de DT). (□) Representa las alícuotas B (presencia de DT).

La única diferencia entre las medidas de Blanco Mediavilla y las nuestras, se encuentra en la concentración de sal presente en las mezclas de reacción: nuestras mezclas tienen concentraciones de NaCl muy elevadas, entre 2 y 4 M, por lo que la eliminación de este efecto del DT, puede ser debido a la gran fuerza iónica presente. El mismo ensayo se realizó con la mezcla de reacción empleada en las medidas de actividad MV-NiR, encontrando que el DT oxidado tampoco interfiere en la cuantificación del NO_2^-, en este caso (tabla 19 del apéndice de tablas).

5.2.2-. CARACTERIZACIÓN DE LA NAS DE HALOFERAX MEDITERRANEI.

Los estudios de caracterización se realizaron con las fracciones procedentes de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que la proteína estaba muy concentrada y la pureza era considerable.

5.2.2.a. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas.

En el ensayo de la actividad MV-Nas (figura 5.10), se aprecia que la producción de NO_2^- (ascenso del valor de la Abs. a 540 nm) aumenta de forma lineal con la cantidad de Nas purificada presente en el ensayo.

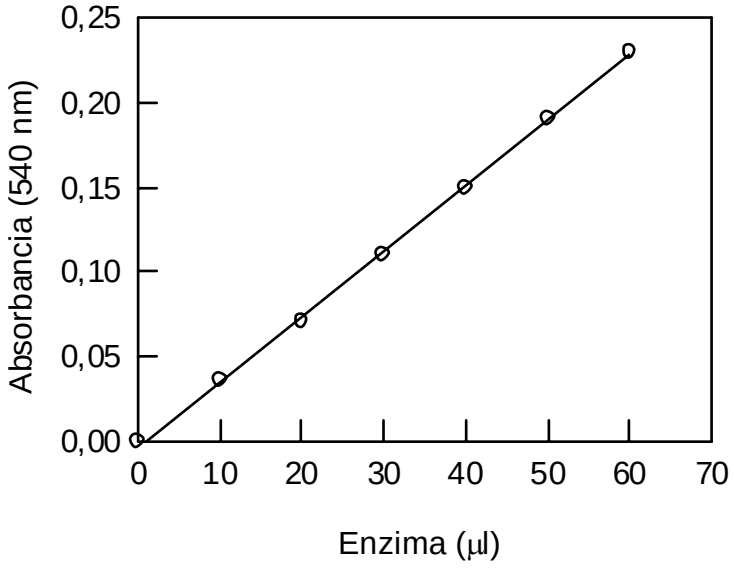

Figura 5.10. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-Nas. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,5 mg/ml, la concentración de proteína.

5.2.2.b. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas.

Además de estudiar el efecto de la cantidad de enzima presente en el ensayo (figura 5.10), se llevó a cabo un estudio del efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 5.11.

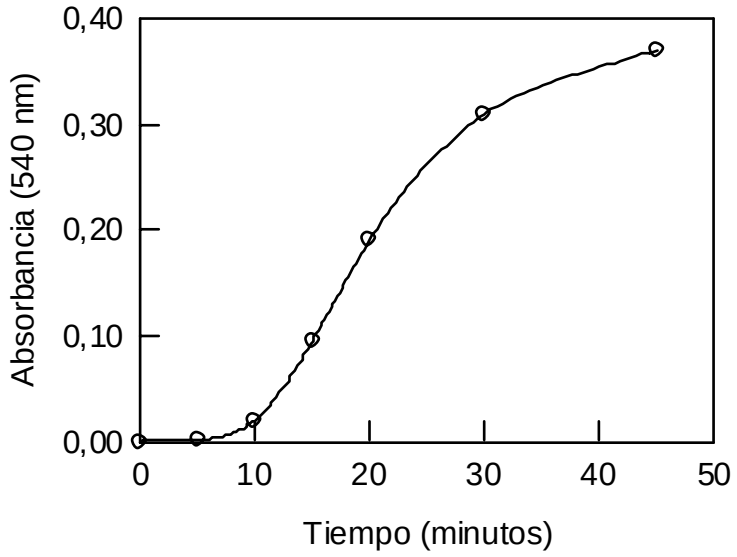

Figura 5.11. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-Nas. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,5 mg/ml, la concentración de proteína.

Como puede apreciarse, la aparición de nitrito (producto de la reacción) presenta un comportamiento sigmoideo con el tiempo de reacción. Durante los 10 primeros minutos, la cantidad de nitrito formado es muy pequeña. Tras este tiempo, hay una aceleración en la producción de nitrito, hasta que desaparece el poder reductor (oxidación completa del MV). Este comportamiento hizo necesario emplear tiempos de incubación de 20 minutos.

5.2.2.c. Efecto del pH sobre la actividad Nas.

Para determinar el pH óptimo de la actividad Nas se usaron dos disoluciones amortiguadoras (apartado 3.2.3, pág 28). Se midieron actividades para cada uno de los valores de pH, a dos temperaturas diferentes: 60 ºC, temperatura que favorece la actividad *in vitro* y 40 ºC, temperatura más próxima a la temperatura del medio en el que se hallan estas haloarqueas (salinas costeras sometidas a fuertes radiaciones solares).

Existe una variación del valor de pH en función de la temperatura. Dicha variación depende a su vez de la naturaleza de la disolución amortiguadora empleada para realizar los ensayos. Por este motivo, cuando se pretende estimar el valor de pH óptimo para la actividad de una enzima en ensayos que se realizan a temperaturas superiores a 25 ºC, el valor de pH debe ser corregido (al valor de pH obtenido se le resta el factor de corrección por cada grado de temperatura superior a 25 ºC). Los factores de corrección de pH para las disoluciones amortiguadoras empleadas en este estudio son: 0,031 para el tampón Tris-HCl y 0,009 para el tampón carbonato.

En ningún caso se observó formación espontánea de NO_2^- durante las medidas de actividad Nas. Una vez determinado el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad Nas, se escogió la temperatura de 60 ºC y un valor de pH de 9 para las medidas de actividad MV-Nas, por ser condiciones que favorecen la actividad *in vitro*. La dependencia de la actividad específica Nas respecto a diferentes valores de pH, se muestra en las siguientes figuras:

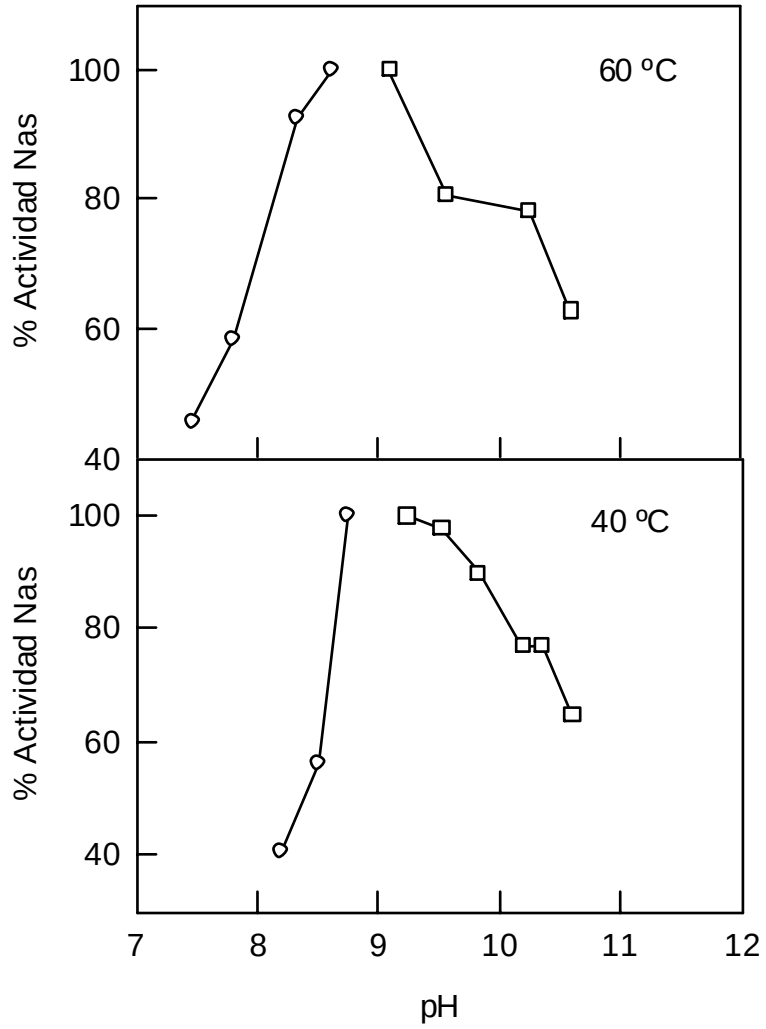

Figura 5.12. Dependencia de la actividad Nas respecto del valor de pH a 60 ºC y 40 ºC. (○) Medidas de actividad en tampón Tris. (□) Medidas de actividad en tampón carbonato.

En la figura 5.12, se observa que el valor de pH óptimo para la actividad Nas está entorno a 9 para ambas temperaturas. Este primer resultado de caracterización junto con los datos obtenidos de la purificación demuestran que la Nas analizada en el presente estudio es una NR diferente a la purificada por Alvarez-Ossorio a partir de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). Esta última NR presentaba la máxima actividad cuando el pH del medio de reacción era 7,5-7,7.

La mayor parte de Nas purificadas y caracterizadas tienen un pH óptimo superior a 7,5: pH 7,5 para la Nas de una bacteria halotolerante Ba1 (Hochman *et al*., 1988), pH 8 para la Nas de *Azotobacter vinelandii* (Gangeswaran *et al*., 1993), pH 10,3 para la Nas de *Rhodococcus* sp. RB1 (Blasco *et al*., 2001), pH 8 para la Nas de *Phormidium laminosum* en el ensayo Fd-Nas ó pH 10 en el ensayo MV-Nas (Blanco Madiavilla, 1992). Sin embargo, las NR no asimilativas estudiadas tienen valores de pH óptimos que oscilan entre 6,8 y 7,5 (Yamamoto *et al*., 1986; Blümle y Zumft, 1991).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

5.2.2.d. Efecto de la temperatura y la [NaCl] sobre la actividad Nas.

Al igual que el pH, la temperatura y la concentración de sal, también tienen influencia sobre la actividad enzimática, ya que son factores que alteran la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas.

La estabilidad de una proteína depende de las interacciones de ésta con otras proteínas, con las moléculas de agua o con las sales presentes en la disolución en la que se encuentra. Si una proteína es halofílica (generalmente son ricas en aminoácidos ácidos), sólo es estable en una disolución con elevada concentración de sal (Zaccai y Eisenberg, 1990).

En cuanto a la temperatura, la velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa conforme se eleva la temperatura, hasta un cierto valor conocido como *temperatura óptima*, a partir de la cual, la velocidad decrece rápidamente, por rotura de los enlaces no covalentes, relativamente débiles, de la estructura terciaria.

Se ha estudiado cómo varía la actividad Nas de *Haloferax mediterranei* en función de la temperatura, cuando se modifica la concentración de NaCl presente en el ensayo. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 5.13.

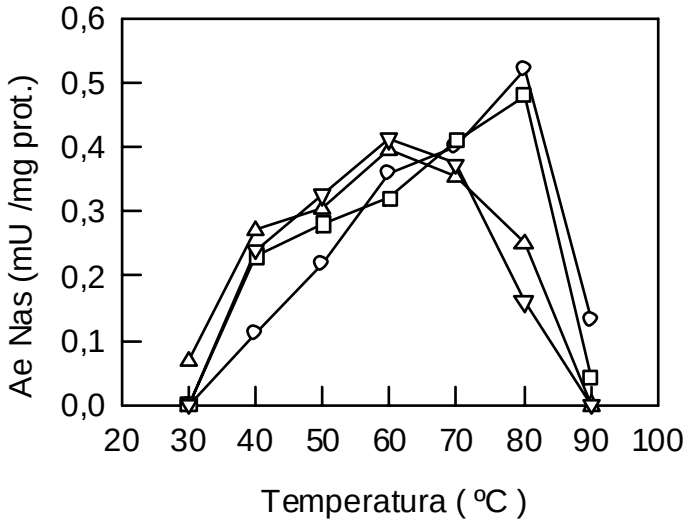

Figura 5.13. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad Nas. (○) 3,1 M NaCl, (□) 2,2 M NaCl, (Δ) 1,3 M NaCl y (∇) 0,9 M NaCl.

Empleando el tampón a pH 9 (óptimo para la actividad), se observa una fuerte dependencia entre la temperatura y la concentración de NaCl presente en la mezcla de reacción como ya mostrara el grupo de Marquez previamente, para la NiR no asimilativa de *Halobacterium* (Marquez y Brodie, 1973). La máxima actividad se desarrolló a 80 ºC para concentraciones de NaCl entre 2,2 y 3,1 M. Si la [NaCl] disminuía (1,3 y 0,9 M NaCl), los valores de actividad más altos se detectaban a 60 ºC. La NR no asimilativa purificada a partir de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992) muestra el mismo comportamiento que el observado para la Nas del presente estudio, es decir, el NaCl ejerce un claro efecto protector sobre la

actividad y estabilidad de la enzima en ambos casos. Este patrón es general para todas las enzimas halofílas estudiadas (Zaccai y Eisenberg, 1990).

5.2.2.e. Energías de activación para la actividad Nas.

En la tabla 5.3 se recogen los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la Nas de *Haloferax mediterranei*. Aquellos ensayos en los que la [NaCl] presente era más baja, implicaron una mayor energía de activación.

Pendiente	r^2	Rango de temperatura	[NaCl]	E_a (kJ/mol)
-1,83	0,93	40-80 ºC	3,1 M	35
-2,64	0,97	30-60 ºC	1,3 M	46

Tabla 5.3. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la Nas de *Haloferax mediterranei*.

Los valores de energía de activación obtenidos son del mismo orden que los descritos para la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei*. En este último caso, se ha visto que la energía de activación más alta se obtiene a partir de ensayos con alta [NaCl], si la temperatura del estudio está entre 30 y 40 ºC (89,7 kJ/mol, 3,2 M NaCl frente a 71,4 7 kJ/mol, 1,8 M NaCl). Sin embargo, a temperaturas superiores (50-60 ºC), el patrón se invierte, es decir se detectan energías de activación más altas en ensayos con baja [NaCl] (17,5 kJ/mol, 0,6 M NaCl frente a 13,8 7 kJ/mol, 1,2 M NaCl) (Alvarez-Ossorio *et al.,* 1992).

5.2.2.f. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.

La Nas fue incubada (tampón fosfato a pH 7,0) a 4 ºC en presencia de diferentes [NaCl]. A lo largo del período de incubación se extrajeron alícuotas para realizar la medida de actividad. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente gráfica:

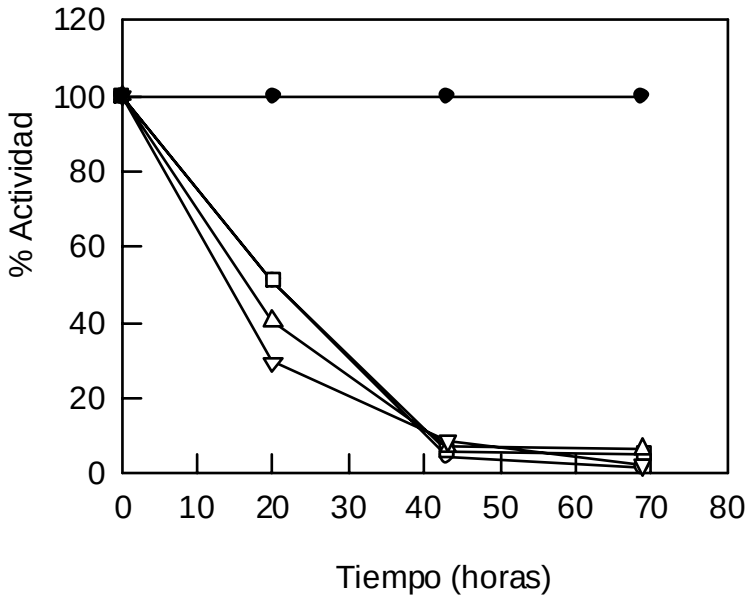

Figura 5.14. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad específica Nas. (●) 4,3 M NaCl, (○) 2,7 M NaCl, (□) 2,1 M NaCl, (Δ) 1,2 M NaCl y (∇) 0,9 M NaCl.

Tras 43 horas de incubación en presencia de 2,7, 2,1, 1,2 y 0,9 M NaCl, se había perdido el 95 % de la actividad, mientras que la enzima permanecía completamente estable después de 90 horas de incubación en presencia de 4,3 M NaCl. Estos resultados vienen a apoyar la hipótesis de que las sales tienen un efecto positivo sobre la estabilidad y la actividad de las enzimas halofílicas (Madigan y Oren, 1999).

5.2.2.g. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad Nas.

Como se desprende de los resultados recogidos en la tabla 5.4, el MV reducido es el mejor donador de electrones (*in vitro*), mientras que el NADH o NADPH no son empleados como tales (*in vitro*). El DT no fue capaz de reducir el NO_3^- en ausencia de MV.

Sistema	Actividad (%)
$S_2O_4^{2-}$ + MV	100,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + sulfito	97,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + pOH-HgBzOH	98,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + Azida	21,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + EDTA	57,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + Cianuro	3,5
$S_2O_4^{2-}$ + MV + DPIP	71,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + PMS	99,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + DTT	99,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + $KClO_3$	94,0
MV + NADH	8,0
MV + NADPH	23,0
NADH	0,6
NADPH	0,0
$S_2O_4^{2-}$	2,0
$S_2O_4^{2-}$ + PMS	6,0
$S_2O_4^{2-}$ + DPIP	5,0
$S_2O_4^{2-}$ + FAD	8,0
$S_2O_4^{2-}$ + Fd	94,0

Tabla 5.4. Reducción de NO_3^- en presencia de diferentes cofactores, donadores de electrones e inhibidores. La concentración de los diferentes compuestos fue: 17 mM DT, 4 mM MV, 200 nM Fd y 1 mM para el resto de compuestos. El 100% de actividad específica Nas es 9 mU/mg proteína.

El NADH o el NADPH tampoco son buenos donadores para la Nas de *Azotobacter vinelandii*, así como para la mayor parte de las Nas citoplasmáticas que se han purificado (Gangeswaran *et al*., 1993). Tampoco la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* emplea NADH ni NADPH como coenzimas (Alvarez-Ossorio *et al*., 1992). En presencia de FAD, se obtuvo el 8% de la máxima actividad Nas de *Haloferax mediterranei*, valor muy similar al obtenido en ensayos de actividad NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (5%) (Alvarez-Ossorio *et al*., 1992). La ferredoxina de este trabajo (apartado 6, pág 130), reducida por DT, fue tan eficiente como el MV en la reducción de NO_3^-, por lo que proponemos que es el donador fisiológico de electrones. De hecho, el empleo de ferredoxina como donador de electrones es una característica propia de Nas, ya que como se citó en el apartado de Introducción (pág. 17), las Nas pueden ser de dos tipos: ferredoxina o flavodoxina dependientes y enzimas dependientes de NAD(P)H; mientras que las NR no asimilativas no son ferredoxina o flavodoxina dependientes (Moreno-Vivián *et al*., 1999).

En cuanto a los inhibidores, el cianuro inhibió completamente la actividad Nas, con azida se detectó el 21% de la máxima actividad y el EDTA disminuyó parcialmente la actividad Nas. La NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* también se inhibe en presencia de azida (16 % de la máxima actividad), mientras que la inhibición es parcial en presencia de EDTA (75 % de la máxima actividad) (Alvarez-Ossorio *et al*., 1992). El resto de inhibidores no resultaron efectivos. Compuestos reductores de grupos –SH, como DTT y *p*OH-HgBzOH, no inhibieron la actividad Nas. Este último sí inhibe la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (sólo se detectó un 5% de la máxima actividad)(Alvarez-Ossorio *et al*., 1992), así como la Nas de *Phormidium laminosum* (Blanco Mediavilla, 1992).

5.2.2.h. Valores de K_m para el MV, NO_3^- y Fd.

Siguiendo las pautas detalladas en Materiales y Métodos (pág. 34), se llevó a cabo la determinación de K_m para el sustrato (NO_3^-), el MV y la Fd. Los valores obtenidos se recogen en la tabla 5.5.

Sustrato	***K_m***
NO_3^-	0,95 ± 0,12 mM
Fd	43,7 ± 14,0 nM
MV	0,66 ± 0,12 mM

Tabla 5.5. Valores de K_m obtenidos para el nitrato y los donadores de electrones (MV y Fd) empleados en la reducción de nitrato por la Nas.

La K_m para el NO_3^- es considerablemente inferior a la descrita para la NR no asimilativa de *Haloferax mediterranei* (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). Sin embargo, se encuentra dentro del rago obtenido para otras NR, cuyo valor oscila entre 0,1 y 1,6 mM (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992). La K_m para la Fd es mucho menor que para el MV lo que indica que la afinidad de la Nas por la Fd es mayor que la afinidad de ésta por el MV. La Nas de *Phormidium laminosum* también tiene una K_m más pequeña para la Fd que para el MV (25 μM y 1,4 mM, respectivamente) (Blanco Mediavilla, 1992). Estos datos apoyan la idea de que la Fd tiene un papel fisiológico importante en la reducción asimilativa del nitrógeno como donador de electrones.

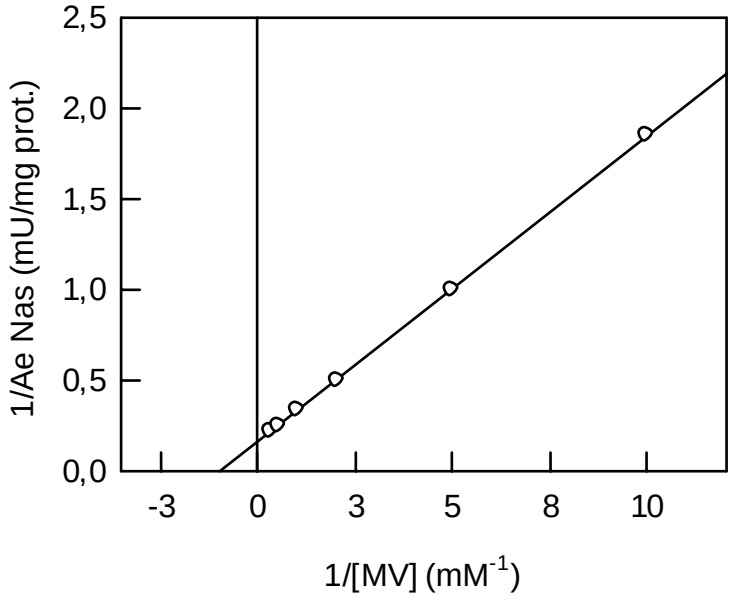

Figura 5.15. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el MV en el ensayo MV-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

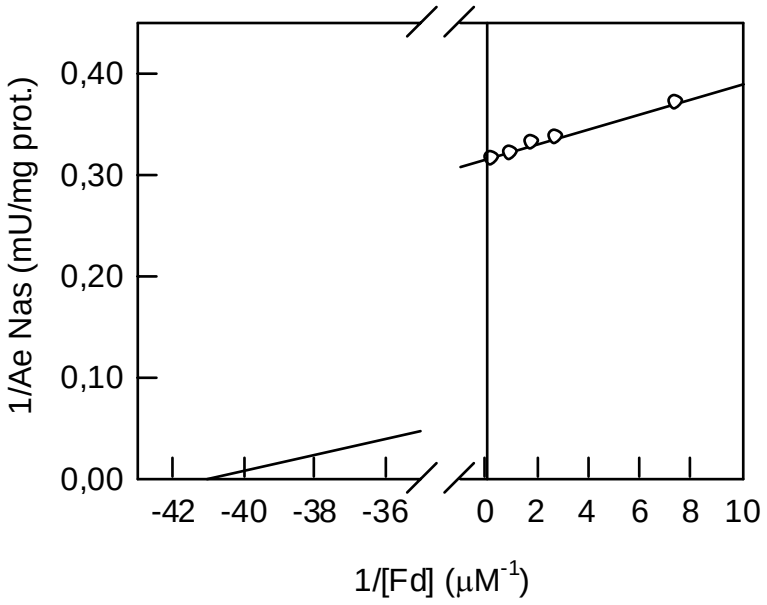

Figura 5.16. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para la ferredoxina en el ensayo Fd-DT-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

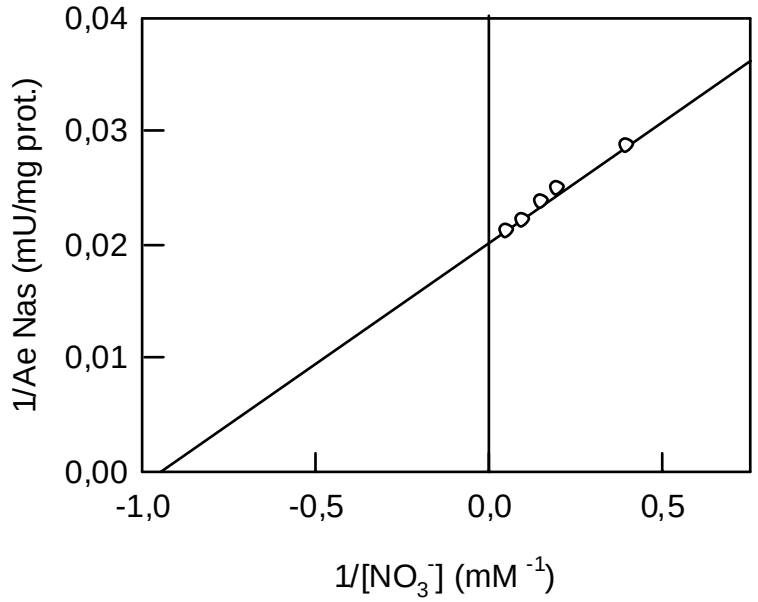

Figura 5.17. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la Nas para el NO_3^- en el ensayo MV-Nas. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

5.2.2.i. Espectro de absorción UV-visible de la Nas de Haloferax mediterranei.

El estudio de los espectros de absorción obtenidos a partir de las proteínas purificadas es importante, ya que permite deducir la presencia de grupos hemo, grupos Fe-S, centros de cobre... en la estructura. La enzima purificada mostraba una coloración rojiza con el espectro de absorción que se recoge en la figura 5.18. En él puede observarse un máximo de absorción a 404 nm (439 nm para la proteína reducida con DT).

Este máximo de absorción podría ser debido a la presencia de grupos FAD, centros Fe-S o bien citocromos. La posibilidad de encontrar grupos FAD en la estructura de la Nas se desechó, ya que los grupos FAD estudiados tienen un pico de máxima absorción a 450

nm. Los citocromos, que pueden ser de tipo a, b y c, tienen máximos de absorción a 600, 560 y 550 nm, respectivamente (Lübben, 1995). Estos máximos de absorción no son detectados en el espectro de la figura 5.18.

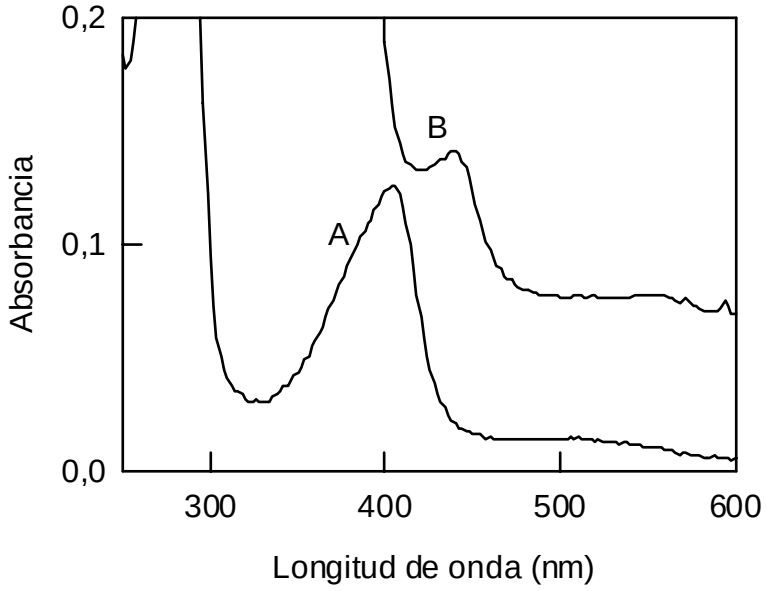

Figura 5.18. (A) espectro de la Nas purificada (30 μg de proteína /ml) en 50 mM fosfato pH 7,0, 2 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la enzima oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducir la muestra y obtener el espectro (B).

Una vez descartada la posibilidad de encontrar citocromos o grupos FAD en la estructura de la Nas, cabría la posibilidad de que el máximo de absorción detectado a 404 nm sea debido a la presencia de grupos Fe-S. Las proteínas ferro-sulfuradas contienen hierro (figura 4.19), pero este hierro no está presente en forma de grupo hemo como en los citocromos, sino que está asociado con átomos de azufre inorgánico o con átomos de azufre de residuos de Cys de la proteína, o con ambos al mismo tiempo (Lehninger *et al.*, 1993).

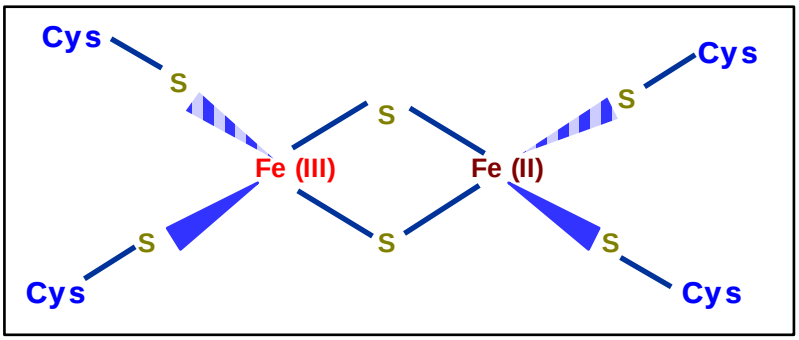

Figura 5.19. Representación esquemática de la estructura característica de los grupo Fe-S (2Fe-2S) (Lehninger *et al.*, 1993).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

El espectro de absorción de la NR no asimilativa de *Haloarcula marismortui* (Yoshimatsu *et al.*, 2000) presenta un máximo de absorción centrado en 400 nm. En este caso, los autores también proponen que la presencia de grupos Fe-S (del tipo 4Fe-4S ó 3Fe-3S) da lugar a este máximo de absorción.

5.2.2.j. Cuantificación del molibdeno presente en la Nas de Haloferax mediterranei.

Como ya se citó en el apartado 4.10 (pág. 71), el molibdeno (Mo) es un metal que está en el centro activo de las enzimas que lo contienen y se halla unido a una pterina formando un complejo denominado **MoCo.** El Mo por sí mismo es biológicamente inactivo, pero al unirse a la pterina adquiere la capacidad de ser catalizador (figura 5.20). El complejo tiene la misma estructura en todas las enzimas estudiadas, por lo que se dice que es un complejo universal y ubicuo que puede asociarse a diferentes apoenzimas, dando lugar a un conjunto de enzimas que reciben el nombre de **molibdoenzimas**. Dependiendo de la apoenzima, el Mo cataliza reacciones de reducción del C, N o S (Mendel, 1997).

Los análisis estructurales realizados, demuestran que el complejo MoCo está localizado en el interior de las enzimas y que la pterina y los grupos Fe-S encontrados en la estructura de diversas NR participan en la transferencia de electrones hasta o desde el átomo de Mo (Lin y Stewart, 1998).

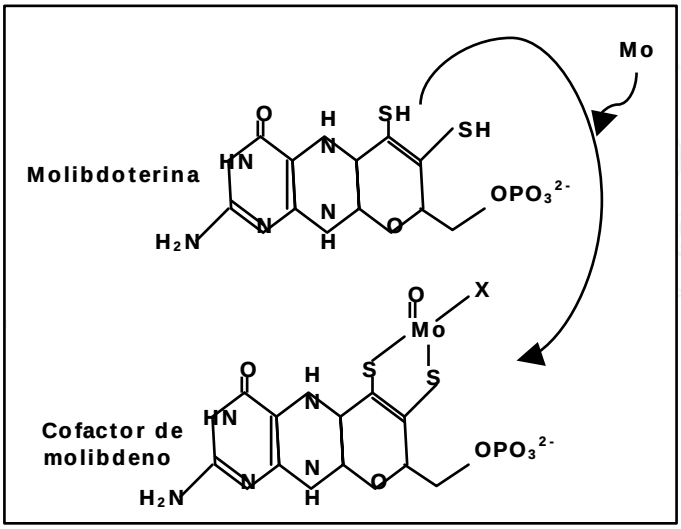

Figura 5.20. Representación esquemática de la estructura característica del cofactor de molibdeno (Mendel, 1997).

El ensayo presentado en el apartado 4.10 (pág. 71) pone en evidencia la importancia del Mo en la actividad Nas de *Haloferax mediterranei*. Hemos cuantificado el Mo presente en dicha enzima, mediante espectrometría de absorción atómica por cámara de grafito (OPTIMA 3000 de Perkin-Elmer). Para la obtención de la recta patrón se utilizó la solución patrón de Mo de la casa Panreac (1,000 ± 0,002 g/l).

Se tomaron 2 ml de Nas purificada (20 μg/ml) y se dializaron frente a 100 volúmenes de tampón 20 mM Tris pH 9, 20 (p/v) glicerol. Seguidamente, se realizó la lectura de absorbancia (por triplicado) a

313,3 nm. El paladio fue el modificador empleado durante el ensayo (5 μl de paladio/20 μl de muestra).

La cantidad de Mo estimada para la Nas de *Haloferax mediterranei* es 0,4 ± 0,065 moles de Mo/mol de enzima. Este valor es inferior a la cantidad de Mo estimada para la NR de membrana de *Pyrobaculum aerophilum* (0,8 moles Mo/mol enzima) (Afshar *et al*., 2001). Sería necesario utilizar equipos de mayor sensibilidad para mejorar la cuantificación del metal, así como una mayor cantidad de proteína pura.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

5.2.3-. CARACTERIZACIÓN DE LA NiR ASIMILATIVA DE HALOFERAX MEDITERRANEI.

Al igual que para la Nas, los estudios de caracterización se realizaron con las fracciones procedentes de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que la proteína estaba muy concentrada y la pureza era considerable.

5.2.3.a. Determinación del producto de reacción de la NiR asimilativa.

Cuando las medidas de actividad NiR se realizan empleando la determinación colorimétrica del NO_2^- consumido (Snell y Snell, 1949), resulta difícil determinar si se trata de una enzima asimilativa o no asimilativa (puesto que se estima el consumo de sustrato y no la naturaleza del producto de la reacción: NH_4^+ u óxidos de nitrógeno). Por ello, resulta necesario determinar cúal es el producto de la reacción (amonio: vía asimilativa; óxidos de nitrógeno: vía no asimilativa.

Para ello se prepararon mezclas de reacción según se indica en Materiales y Métodos (pág. 28). Tras detener la reacción mediante agitación vigorosa (oxidación de DT), la mezcla de reacción se empleó como muestra para ensayos de cuantificación de amonio (apartado 3.2.4, pág. 29). La cuantificación de amonio se realizó por triplicado frente a un control que consisitía en mezcla de reacción sin extracto enzimático. En todos los ensayos realizados, se detectó la presencia de amonio como producto de la reacción. Este ensayo resultó determinante para proponer que la NiR estudiada es una enzima asimilativa.

5.2.3.b. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR asimilativa.

En el ensayo de la actividad MV-NiR asimilativa (figura 5.21), se aprecia que el consumo de NO_2^- (disminución de la Abs. a 540 nm) aumenta de forma lineal con la cantidad de NiR purificada presente en el ensayo.

BIBLIOTECA VIRTUAL

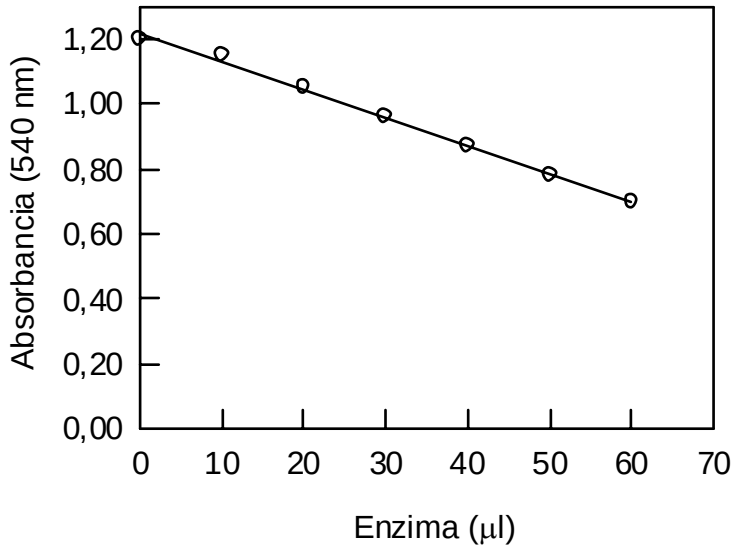

Figura 5.21. Efecto de la cantidad de enzima en el ensayo de actividad MV-NiR. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,2 mg/ml, la concentración de proteína.

5.2.3.c. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR asimilativa.

Se llevó a cabo un estudio del efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 5.22.

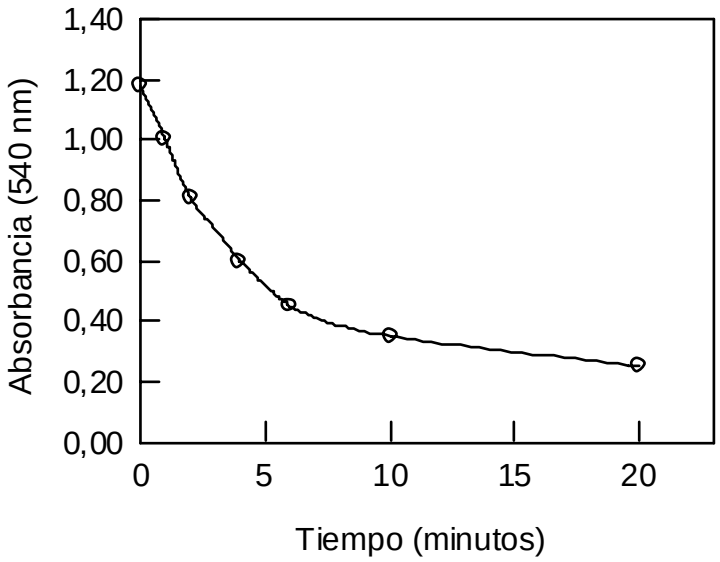

Figura 5.22. Efecto del tiempo de ensayo en la actividad MV-NiR. Las condiciones fueron las del ensayo estándar siendo 2,2 mg/ml, la concentración de proteína.

Como puede apreciarse, el consumo de NO_2^- (sustrato de la reacción) se desarrolla durante los primeros 5 minutos (empleando la concentración de enzima indicada). Tras este tiempo, el consumo de NO_2^- es prácticamente nulo.

5.2.3.d. Efecto del pH sobre la actividad NiR asimilativa.

Con el fin de determinar el pH óptimo para la actividad NiR preparamos tampón de reacción a distintos valores de pH y medimos actividades para cada uno de los valores de pH, a dos temperaturas diferentes: 60 ºC y 40 ºC.

El factor de corrección de pH para la disolución amortiguadora (tampón fosfato) empleada en este estudio es 0,0028. Debido a la pequeña magnitud de este factor, la variación de pH en los ensayos realizados es también pequeña.

Se ha detectado descomposición espontánea del NO_2^- en función del valor de pH y de la temperatura escogidos para los ensayos. Esta descomposición, aumentaba a medida que la temperatura se incrementaba y cuando el valor pH de la disolución era más ácido. Para eliminar el error que había a causa de la descomposición espontánea, se determinó ésta para cada valor de pH y temperatura, corrigiendo así el valor de la actividad enzimática. Una vez cuantificada la descomposición espontánea, escogimos la temperatura de 60 ºC y un valor de pH de 7,5 para la medida de actividad NiR, ya que son las condiciones en las que la actividad NiR es mayor. La dependencia de la actividad específica NiR respecto a diferentes valores de pH, se muestra en la siguiente figura:

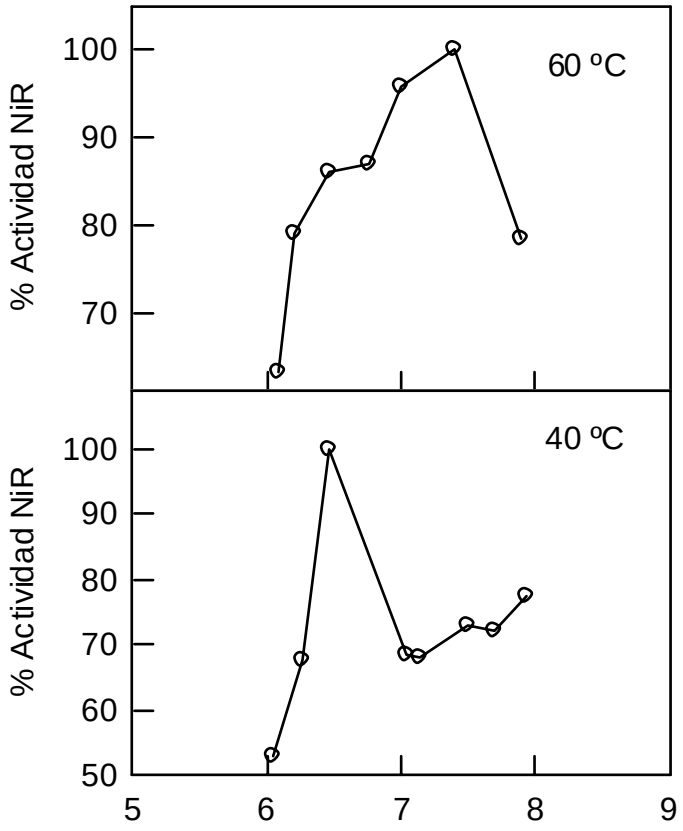

Figura 5.23. Dependencia de la actividad NiR asimilativa respecto del valor de pH a 60 ºC y 40 ºC.

Como puede observarse en la figura 5.23, el pH óptimo para la actividad NiR asimilativa es 7,5 cuando la actividad es medida a 60 ºC. Si la temperatura es 40 ºC, el pH óptimo para la actividad es 6,5. El valor de pH óptimo para la NiR a 60 ºC (7,5) es el mismo que el obtenido para la actividad NiR de *Candida utilis* (Sengupta *et al*., 1996). También la NiR asimilativa de la cianobacteria *Phormidium laminosum* tiene un pH óptimo entre 7,3 y 7,6, aunque esta enzima se inactiva totalmente a partir de los 60 ºC (Arizmendi, 1989).

Existe una NiR no asimilativa extraída de *Haloferax denitrificans* que contiene cobre. El valor de pH óptimo para esta actividad está entre 4,8 y 5,0 (Inatomi y Hochstein, 1996). Analizando toda la bibliografía consultada, destaca el hecho de que las NiR asimilativas de procariotas suelen tener valores de pH cercanos a 7, mientras que las no asimilativas trabajan a valores menores de pH, como es el caso de esta NiR no asimilativa de *Haloferax denitrificans*.

En principio, las diferencias entre la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* y la NiR de *Haloferax denitrificans*, respecto a los valores de pH óptimo, concuerdan con el hecho de que a pesar de ser enzimas de la misma familia, en el fondo son muy diferentes. Las NiR de cobre son enzimas que participan en la reducción no asimilativa del NO_2^- (desnitrificación) y pueden tener uno o dos átomos de Cu en su centro activo (Suzuki *et al*., 1997; Inatomi y Hochstein, 1996), mientras que la NiR de *Haloferax mediterranei* pertenece a la vía asimilativa del NO_2^- y como se discute en el apartado 5.2.3.j (pág. 127) no tiene Cu en su estructura.

5.2.3.e. Efecto de la temperatura y la [NaCl] sobre la actividad NiR asimilativa.

Al igual que para la Nas, se ha estudiado cómo varía la actividad NiR de *Haloferax mediterranei* en función de la temperatura, cuando se modifica la concentración de NaCl presente en el ensayo. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 5.24.

A medida que aumenta la temperatura, se observa una primera fase en la que la actividad aumenta debido al incremento de la energía cinética de las moléculas que participan en la reacción. Si la temperatura sigue incrementando, la enzima comienza a desnaturalizarse y por ello disminuye la actividad.

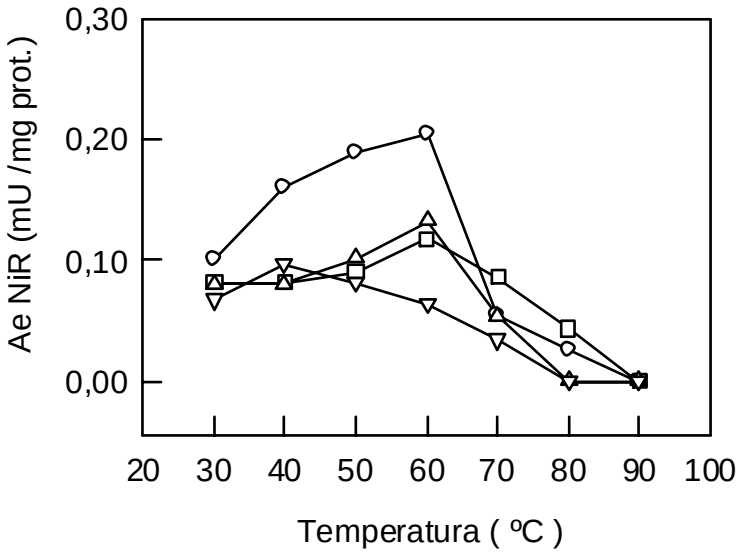

Figura 5.24. Efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre la actividad NiR. (○) 3,3 M NaCl, (□) 2,7 M NaCl, (△) 2,0 M NaCl y (▽) 0.9 M NaCl.

La máxima actividad se obtiene cuando la temperatura es 60 ºC y la concentración de NaCl es 3,3 M. Si la concentración de NaCl es baja (0,9 M), la máxima actividad se desarrolla a una temperatura de 38 ºC. Con este ensayo podemos apreciar el efecto protector de la sal frente a la desnaturalización por calor. Este comportamiento es característico de la mayor parte de enzima halofílicas estudiadas hasta el momento (Camacho *et al*., 1995; Dym *et al*., 1995).

5.2.3.f. Energías de activación para la actividad NiR asimilativa.

En la tabla 5.6 se recogen los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*. Como ocurre para la Nas, aquellos ensayos en los que la [NaCl] presente era más baja, implican una mayor energía de activación.

Pendiente	r^2	Rango de temperatura	[NaCl]	E_a (kJ/mol)
-1,01	0,91	30-60 ºC	3,3 M	10,4
-0,80	0,90	30-60 ºC	2,0 M	21,4

Tabla 5.6. Resumen de los parámetros obtenidos a partir de las representaciones de Arrhenius para la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei*.

Los valores de E_a obtenidos, son menores que los encontrados para la NiR asimilativa de *Phormidium laminosum* (Arizmendi, 1989), cuya E_a se encuentra en torno a 50 kJ/mol (en ensayos a 50 ºC). No se ha descrito la E_a para la NiR asimilativa de *Candida utilis* (Sengupta *et al*., 1996) ni tampoco se han caracterizados otras NiR asimilativas halófilas (la NiR presentada en esta memoria es la primera NiR

asimilativa halófila caracterizada), de manera que resulta difícil contrastar los valores de E_a observados.

5.2.3.g. Estudio de la dependencia de la estabilidad con la concentración de NaCl.

La NiR fue incubada (tampón fosfato a pH 7,0) a 4 ºC en presencia de diferentes [NaCl]. A lo largo del período de incubación se extrajeron alícuotas para realizar la medida de actividad. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente gráfica:

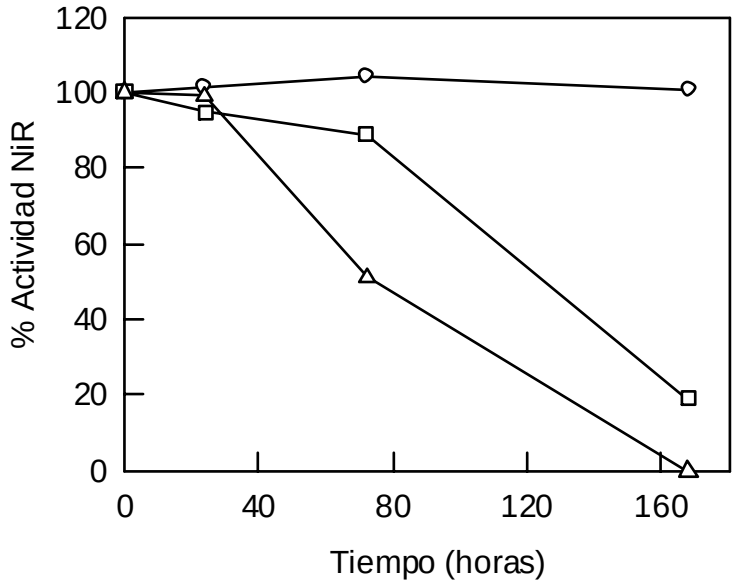

Figura 5.25. Dependencia de la estabilidad-concentración de NaCl para la actividad específica NiR asimilativa. (○) 3,6 M NaCl, (□) 2,6 M NaCl y (Δ) 1,8 M NaCl.

Como se desprende de la figura 5.25, la estabilidad de la NiR depende de la concentración de sal. Tras 160 horas de incubación, la enzima permaneció prácticamente estable en presencia de 3,6 M de NaCl; con 2,6 M se detectó un 20 % de la actividad inicial; y en

presencia de 1,8 M de NaCl, la actividad se perdió por completo. La IDH y la GDH de *Haloferax mediterranei* manifiestan el mismo comportamiento (Camacho *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1996). Cuando dializábamos la NiR frente a tampón 50 mM fosfato pH 7,0 y 20 % glicerol, la enzima podía ser almacenada más de dos semanas sin que hubiese una pérdida de actividad significativa.

La NiR de *Haloferax denitrificans* (Inatomi y Hochstein, 1996) resultó ser una enzima muy estable durante un período de dos semanas en ausencia de NaCl. Esta diferencia nos hace pensar que las enzimas de la vía asimilativa son más inestables y vulnerables que las enzimas no asimilativas. Esta hipótesis no puede ser constrastada por el momento, ya que no existe ninguna NiR asimilativa de arqueas purificada y caracterizada, a excepción de la que se presenta en esta memoria.

5.2.3.h. Efecto de diferentes inhibidores y donadores de electrones sobre la actividad NiR asimilativa.

Los resultados recogidos en la tabla 5.7 muestran que el MV reducido es el mejor donador de electrones (*in vitro*). La NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* no es capaz de emplear NADH como donador de electrones, sin embargo, con NADPH se obtenía el 10 % de la máxima actividad. La NiR asimilativa de *Candida utilis* sí emplea el NADPH como donador de electrones (se detectó la máxima actividad, al igual que con MV) (Sengupta *et al.*, 1996), sin embargo la enzima de *Phormidium laminosum* no es capaz de emplear nucleótidos de piridina (Arizmendi, 1989).

El DT no fue capaz de reducir el NO_2^- en ausencia de MV. En presencia de FAD, se obtuvo el 50 % de la máxima actividad. La ferredoxina reducida por DT fue tan eficiente como el MV en la

reducción de NO_2^-, por lo que proponemos que es el donador de electrones fisiológico. Las NiR no asimilativas no pueden emplear Fd como donador de electrones (Zumft, 1997). En presencia de donadores de electrones reducidos, como DPIP o PMS, se obtuvo una actividad inferior al 35 % de la máxima actividad NiR (obtenida en las condiciones estándar).

Sistema	***Actividad (%)***
$S_2O_4^{2-}$ + MV	100,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + sulfito	75,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + pOH-HgBzOH	75,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + Azida	54,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + EDTA	47,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + Cianuro	9,5
$S_2O_4^{2-}$ + MV + DPIP	10,5
$S_2O_4^{2-}$ + MV + PMS	34,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + DTT	93,0
$S_2O_4^{2-}$ + MV + $KClO_3$	73,0
MV + NADH	2,7
MV + NADPH	17,0
NADH	0,0
NADPH	10,0
$S_2O_4^{2-}$	0,0
$S_2O_4^{2-}$ + PMS	17,0
$S_2O_4^{2-}$ + DPIP	24,0
$S_2O_4^{2-}$ + FAD	55,0
$S_2O_4^{2-}$ + Fd	100

Tabla 5.7. Reducción de NO_2^- en presencia de diferentes cofactores, donadores de electrones e inhibidores. La concentración de los diferentes compuestos fue: 17 mM DT, 4 mM MV, 200 nM Fd y 1 mM para el resto de compuestos. El 100% de actividad específica NiR es 0,9 x 10^{-2} U/mg proteína.

En cuanto a los inhibidores, el $KClO_3$ y el DTT no inhibieron la NiR. Al igual que ocurre con la Nas caracterizada, la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* se inhibió en presencia de cianuro y azida, aunque la inhibición por cianuro es mucho más acusada. En este sentido cabe destacar que la NiR de *Phormidium laminosum* también resultó ser una enzima fuertemente inhibida por cianuro y parcialmente inhibida por azida (Arizmendi, 1989). Compuestos que reaccionan con grupos sulfidrilo como *p*OH-HgBzOH y el sulfito, inhibieron la actividad NiR del presente estudio. La inhibición por *p*OH-HgBzOH implica la presencia de grupos sulfidrilo libres que participan en la reducción de NO_2^-. Van't Riet y Planta (1975) observaron que el *p*OH-HgBzOH afecta la conformación de la NiR en las proximidades del centro activo mediante su unión a cisteínas y a los átomos de S de los centros Fe-S.

5.2.3.i. Valores de K_m para el MV, NO_2^- y Fd.

Siguiendo las pautas detalladas en Materiales y Métodos (pág. 34), se llevó a cabo la determinación de K_m para el sustrato (NO_2^-), el MV y la Fd. Los valores obtenidos se recogen en la tabla 5.8.

Sustrato	***K_m***
NO_2^-	8,6 ± 0.2 mM
Fd	32 ± 11 nM
MV	1,9 ± 0.2 mM

Tabla 5.8. Valores de K_m obtenidos para el nitrito y los donadores de electrones (MV y Fd) empleados en la reducción de nitrito por la NiR asimilativa.

La K_m para el NO_2^- es muy alta en comparación con las de NiR asimilativas de otros organismos no halófilos, tales como cianobacterias fotosintéticas (0,1-0,8 mM) (Arizmendi *et al.*, 1981) o calabacín (1 μM) (Vega *et al.*, 1980). No obstante, también se han descrito valores altos (2 mM) de K_m para el nitrito en el caso de la NiR asimilativa de hojas y raíces de cebada (Bourne y Miflin, 1973). El valor de K_m obtenido para el MV también es superior al descrito para NiR asimilativas de cianobacterias (Arizmendi, 1989), así como para la NiR asimilativa de *Candida utilis* (Sengupta *et al.*, 1996). No obstante, Romero (1988) obtuvo un valor de 0,91 mM para la enzima de *Chlamydomonas reinhardtii*. La K_m para la Fd es mucho menor que para el MV lo que indica que la afinidad de la NiR por la Fd es mayor que la afinidad de ésta por el MV. Este dato apoya la idea de que la Fd tiene un papel fisiológico importante en la reducción asimilativa del nitrógeno, como donador de electrones.

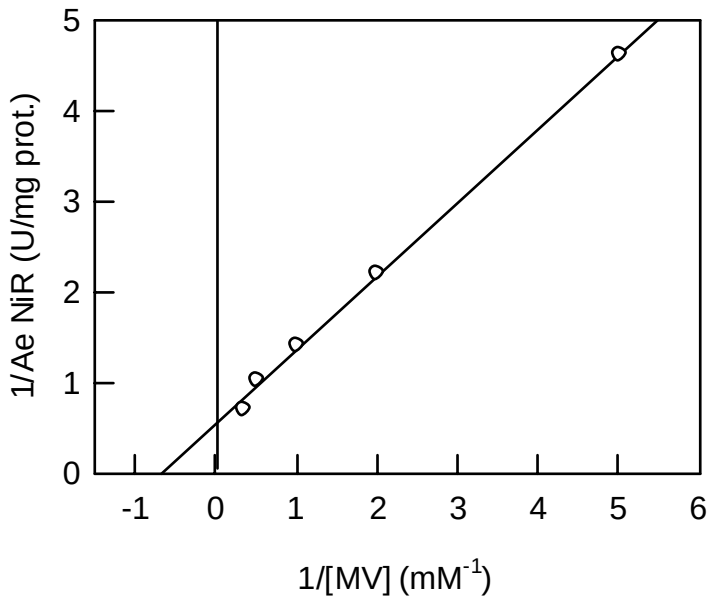

Figura 5.26. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR asimilativa para el MV en el ensayo MV-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

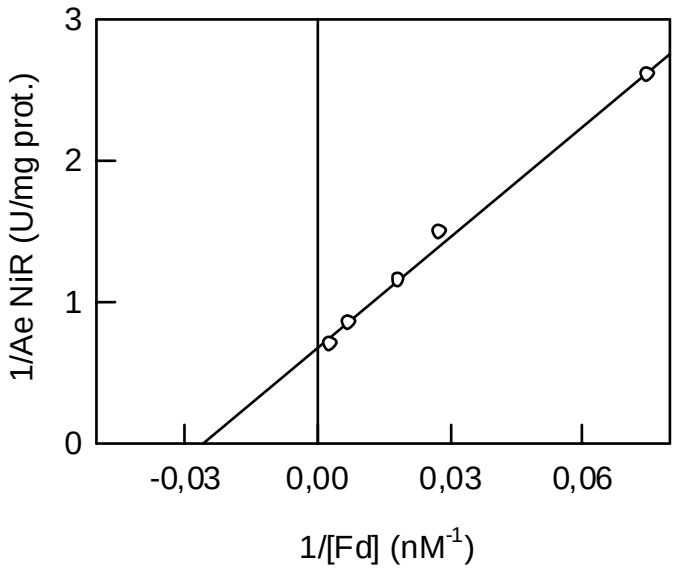

Figura 5.27. Representación doble-inversa para el cálculo de K_m de la NiR asimilativa para la ferredoxina en el ensayo Fd-DT-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

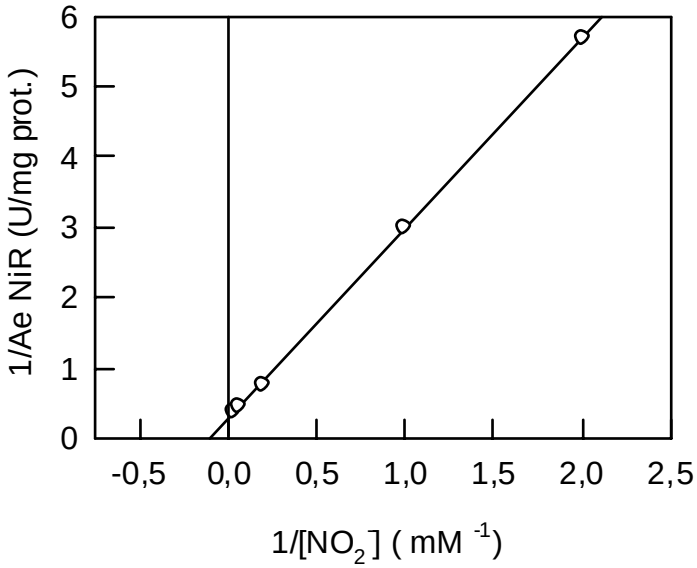

Figura 5.28. Representación doble-recíproca para el cálculo de Km de la NiR asimilativa para el NO_2^- en el ensayo MV-NiR. Las medidas de actividad se realizaron según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

5.2.3.j. Espectro de absorción de la NiR asimilativa de Haloferax mediterranei.

Como ya se citó en el apartado 5.2.2.i (pág. 109), el estudio de los espectros de absorción obtenidos a partir de las proteínas puras permiten deducir la presencia de grupos hemo, grupos Fe-S o centros de cobre en la estructura. En el espectro de la NiR asimilativa se observa, además del máximo de absorbancia a 288 nm debido a la presencia de proteína, valores elevados de absorbancia a 310, 410, 500 y 545 nm. Este espectro no es el característico de proteínas que tienen citocromos o FAD, tanto en estado oxidado como reducido. La adición de unos cristales de DT para recudir la enzima provocó un desplazamiento del espectro de absorción, de manera que el máximo de absorbancia centrado en 410 nm en la forma oxidada se desplazó hasta 428 nm en la forma reducida.

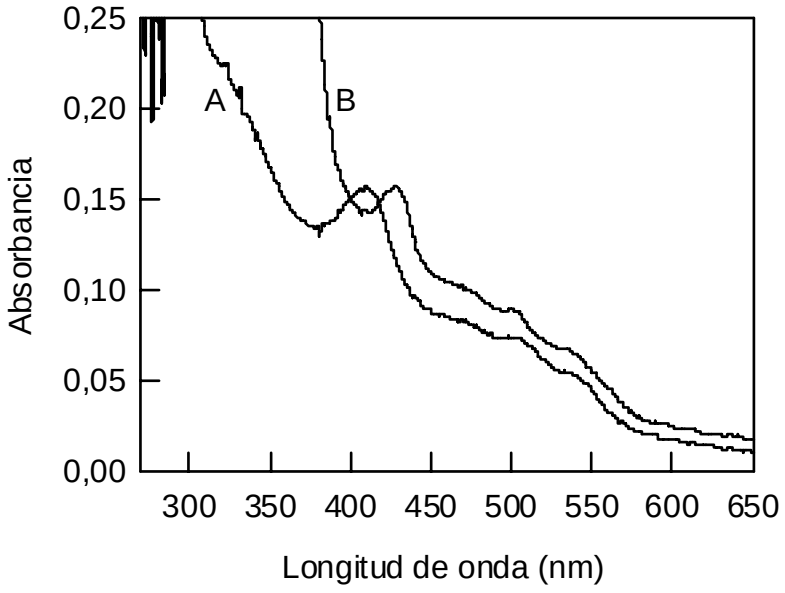

Figura 5.29. (A) espectro de la NiR purificada (30 μg de proteína /ml) en 50 mM fosfato pH 7,0, 20 % glicerol y 0,5 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la enzima oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducir la muestra y obtener el espectro (B).

Mediante comparación con otros espectros de NiR asimilativas citoplasmáticas, deducimos que la NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* es una proteína que contiene sirohemo y centro Fe-S (Moreno-Vivián *et al*., 1999). Los grupos sirohemo son característicos de enzimas multielectrónicas como la NiR (Murphy *et al*., 1973). El desplazamiento que se observa a 410 nm (428 nm en la forma reducida) puede ser debido a la reducción que sufre el grupo sirohemo en presencia de DT (Arizmendi, 1989).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS Nas , NiR ASIMILATIVAS DE *Haloferax mediterranei*.

- Las dos enzimas purificadas y caracterizadas en esta memoria, nitrato y nitrito reductasas asimilativas, forman parte de la vía asimilativa del nitrato/nitrito en *Haloferax mediterranei*, de manera que esta arquea halófila es capaz de crecer en medios mínimos con nitrato y/o nitrito como única fuente de nitrógeno.

- La Nas estudiada es una molibdoenzima heterodimérica con una pH óptimo en torno a 9. Es una enzima termoactiva cuya estabilidad y actividad dependen de la concentración de NaCl presente en el medio. La enzima no es NAD(P)H dependiente y contiene Mo en su estructura.

- La NiR asimilativa es un monómero cuyo pH óptimo es 7,5 a temperaturas próximas a los 60 ºC (3,3 M NaCl). La actividad y la estabilidad de la enzima dependen de la concentración de NaCl presente en el medio. La enzima no es NAD(P)H dependiente y contiene sirohemo y centro Fe-S en su estructura.

6-. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LA FERREDOXINA EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1-. OBTENCIÓN DE LA FERREDOXINA.

La ferredoxina de *Haloferax mediterranei* se purificó siguiendo el protocolo propuesto por Kerscher (Kerscher *et al*., 1976). Este proceso ha sido ampliamente descrito en haloarqueas (Kerscher *et al*., 1976; Kerscher y Oesterhelt, 1977). Puesto que nuestro objetivo es obtener la Fd para posteriores estudios de caracterización, no detallaremos las etapas de purificación llevadas a cabo.

Con el objetivo de estimar la masa molecular de la ferredoxina, parte de la muestra purificada se introdujo en en un HPLC-masas (apartado 3.3.5, pág 34). Los resultados obtenidos mostraban que la ferredoxina tiene una masa de 12 kDa. La masa molecular de esta proteína también se estimó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la muestra de Fd purificada, muestra dos bandas de 31 y 21 kDa aproximadamente. Sólo la banda de 21 kDa corresponde a la ferredoxina (figura 6.1, pág 131). Cuando se lleva a cabo SDS-PAGE con proteínas que presentan gran cantidad de aminoácidos acídicos, se sobreestima el peso molecular de la misma. Este efecto se ha observado en estudios realizados con las Fds halofílicas de *Halobacterium halobium* (Kerscher *et al*., 1976) y *Halobacterium marismortui* (Werber y Mevarech, 1978b). Así mismo,

para la Fd de *Haloarcula japonica* se ha propuesto que su masa molecular, estimada mediante SDS-PAGE, es 24 kDa, mientras que la masa estimada mediante espectrometría de masas es 15 kDa (Sugimori *et al*., 2000).

En base al índice de pureza que presentaba la muestra (A_{420}/A_{280} = 0,2) (Geiger *et al*., 1978) y teniendo en cuenta la sobreestimación del peso molecular, podríamos interpretar que la Fd de *Haloferax mediterranei* es una proteína monomérica con una masa molecular en torno a 12 kDa (HPLC-masas).

BIBLIOTECA VIRTUAL

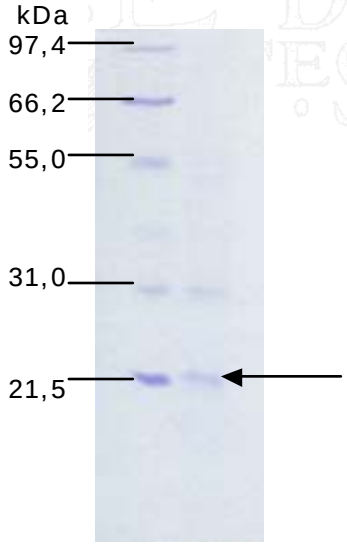

Figura 6.1. SDS-PAGE correspondiente a la muestra purificada de Fd. Calle 1: patrones; Calle 2: DEAE-celulosa (30 μg proteína). La muestra tiene un índice de pureza de 0,2 y la concentración molar es 60 μM (ε = 9600 $M^{-1}cm^{-1}$ a 420 nm; (Geiger *et al*., 1978)).

La masa molecular estimada para la Fd de *Haloferax mediterranei* se encuentra dentro del rango de masas moleculares de las Fds estudiadas (12.500 y 24.000 Da).

6.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei.*

Hemos purificado la Fd de *Haloferax mediterranei* siguiendo el protocolo desarrollado por Kerscher para ferredoxinas de halobacterias, partiendo de células crecidas en medio mínimo (100 mM NO_3^-). La muestra de Fd purificada presentaba un color marrón cuyo espectro de absorción se presenta en la figura 6.2.

BIBLIOTECA VIRTUAL

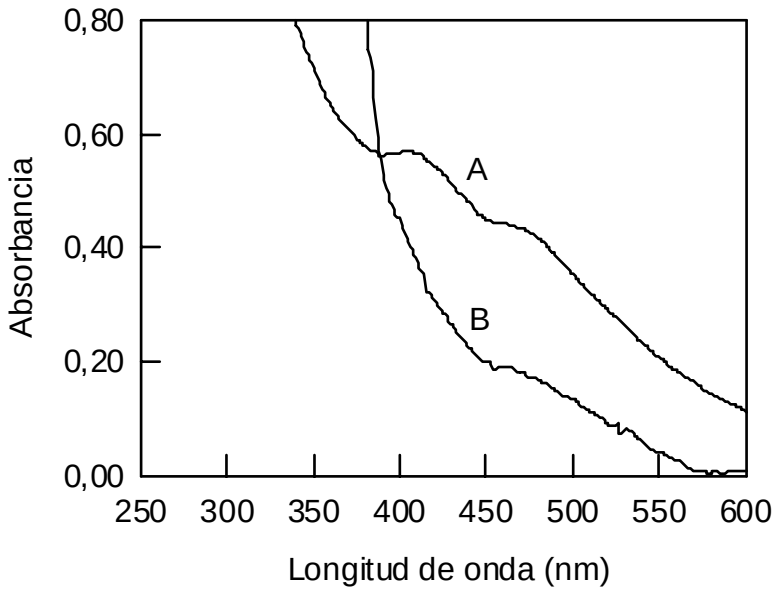

Figura 6.2. (A) espectro de la Fd purificada (60 μM, asumiendo que el coeficiente de extinción molar a 420 nm es 9600 M^{-1}) en 50 mM fosfato pH 7,5, 4,3 M NaCl. En primer lugar se obtuvo el espectro de la forma oxidada. Seguidamente se adicionaron unos cristales de DT para reducir la muestra y obtener el espectro (B).

El pico de máxima absorción centrado en 420 nm es característico de los grupos Fe-S oxidados. El perfil del espectro mostrado es muy similar al obtenido para la Fd aislada de cianobacterias, plantas y haloarqueas (Sugimori *et al*., 2000). También se aprecia un pico de elevada absorción centrado en 465 nm, que ha sido igualmente descrito en las Fds de *Haloarcula japonica* (Sugimori *et al*., 2000) y *Halobacterium halobium* (Kerscher *et al*., 1976). El máximo de absorción a 465 nm no aparece en el espectro de la Fd purificada a partir de la arquea hipertermófila *Pyrococcus woesei* (Blamey *et al*., 2000). La ausencia del pico centrado en 465 nm en el espectro de la Fd de *Pyrococcus woesei* podría deberse al hecho de que esta Fd es de tipo 4Fe-4S en lugar de 2Fe-2S como ocurre con las Fds anteriormente mencionadas. Si se adiciona DT a la Fd de *Haloferax mediterranei*, la absorción a 420 nm disminuye un 44 %, y un 57 % a 465 nm.

6.3. ESPECTRO DE RMN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei.*

En colaboración con el Dr. Antonio Donaire (Universidad de Valencia), se obtuvo el espectro de resonancia magnética nuclear de la Fd purificada con un espectrómetro Bruker 400 MHz. Dicho espectro se recoge en la figura 6.3

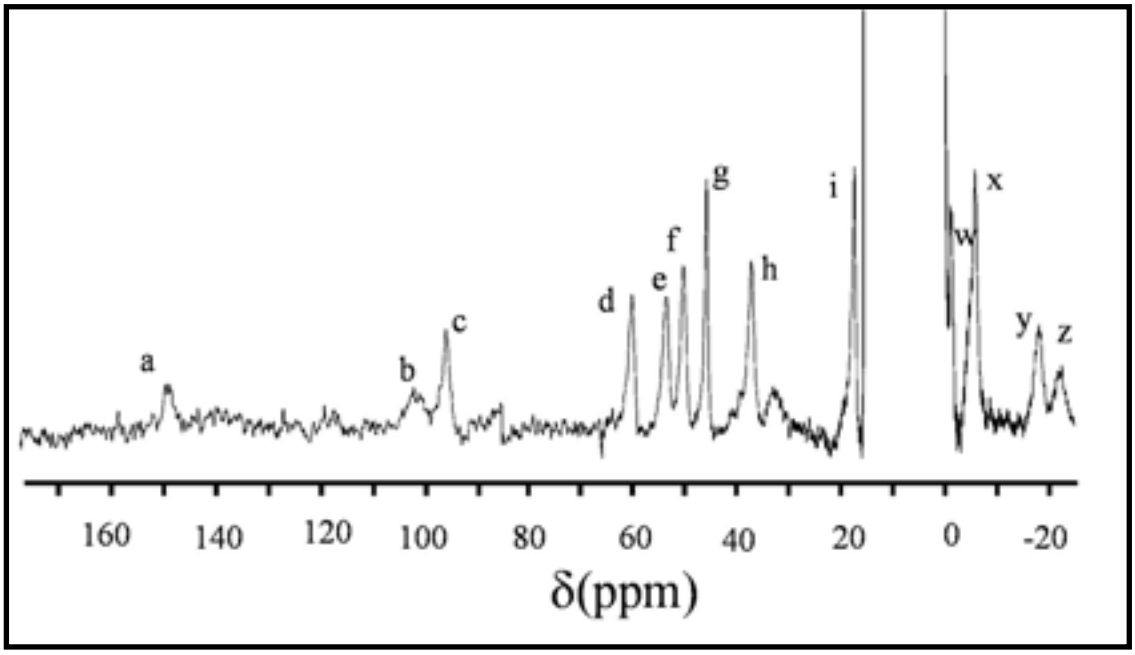

Figura 6.3. Espectro super WEFT 1H RMN (400 MHz) a 298 K de la forma reducida de la ferredoxina Fe_2S_2 (500 μM) de *Haloferax mediterranei* en 20 mM fosfato pH 7,2 y 2 M KCl, en D_2O.

Se han identificado trece señales hiperfinas (denominadas **a-i** y **w-z**, como se aprecia en la figura 6.3). Estas señales corresponden típicamente a los protones α y β de las cisteínas coordinadas a los átomos de Fe o, para señales más desplazadas, a residuos que forman puentes de hidrógeno con los átomos de azufre (tanto azufre inorgánico como cisteínico). El espectro de 1H RMN presentado aquí, así como la variación de las señales con la temperatura (tabla 6.1), es similar al de otras Fds tipo planta, lo cual indicaría que esta Fd contiene un grupo Fe_2S_2 (Bertini *et al.*, 1993).

Señal	Comportamiento	Temperatura 24 ºC	Temperatura 30 ºC
a	Curie	148,5	147,9
b	Curie	101,5	100,3
c	Curie	95,7	94,9
d	anti-Curie	59,9	61,6
e	anti-Curie	53,4	54,9
f	anti-Curie	49,9	51,1
g	Curie	45,5	45,2
h	anti-Curie	36,7	37,9
i	Pseudo-Curie	15,1	15,1
w	anti-Curie	-1,65	-1,48
x	anti-Curie	-6,1	-5,9
y	anti-Curie	-18,5	-18,3
z	anti-Curie	-22,6	-21,9

Tabla 6.1. Variación de las señales del espectro de RMN de la figura 6.3 con la temperatura.

Las señales **a, b, c** y **g** muestran un comportamiento Curie, que corresponderían a las cisteínas coordinadas al ion Fe (III). La señal **g**, más estrecha que las otras tres, probablemente corresponda al protón α; mientras que las señales **a, b** y **c** (por analogía con otras Fds de Fe_2S_2) deben corresponder a tres de los cuatro protones β de las dos cisteínas coordinadas al ion Fe (III). La señales **d, e** y **f** muestran un comportameinto anti-Curie, por lo que corresponderían a las cisteínas coordinadas al ion Fe (II). La señal **i** no muestra una dependencia clara con la temperatura (comportamiento pseudo- Curie), por lo que se asignaría al ion Fe (II), siendo probablemente un protón α. Las señales **w** y **x**, de una magnitud baja en el desplazamiento hiperfino, posiblemente se debían a residuos enlazados por puentes de hidrógeno a los átomos de azufre inorgánico.

Sin embargo, el hecho más interesante de este espectro es la presencia de las señales no intercambiables **y** y **z**, desplazadas a campo alto. Estas señales corresponderían a los protones β. Sin embargo, en las otras dos Fds estudiadas hasta ahora por RMN (Bertini *et al.*, 1993) todos los protones β aparecen desplazados a campo bajo. Esto indicaría una fuerte constante de acoplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de hierro o una orientación totalmente diferente de una de las cisteínas (o una combinación de ambos factores) en esta Fd de *Haloferax mediterranei*, respecto a las otras Fds estudiadas.

BIBLIOTECA VIRTUAL MiGUEL DE CERVANTES

6.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD *MV-DT-Fd-Nas y MV-DT-Fd-NiR.*

Parte de la Fd obtenida se empleó en los ensayos de actividad Fd-Nas y Fd-NiR que se recogen en los apartados 5.2.2. (pág. 107) y 5.2.3 (pág. 124), para obtener la K_m para la Fd en cada caso. Estos estudios, además de mostrar la presencia de actividad en ensayos Fd-Nas ó Fd-NiR, dejan claro que el papel de la Fd en la reducción asimilativa del nitrógeno es "donar electrones durante el proceso catalítico".

De la misma forma se han realizado medidas de actividad en ensayos MV-DT-Fd-Nas y MV-DT-Fd-NiR, detectando que los valores de actividad son mayores a los esperados.

Condiciones	***% Actividad Nas***	***% Actividad NiR***
MV-DT	100	100
Fd-DT	94	100
MV-DT-Fd	275	280

Tabla 6.2. Medidas de actividad Nas y NiR asimilativas en presencia de Fd y MV.

La Fd de *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de recibir electrones muy eficientemente desde el MV reducido (Vega y Menacho, 1990). Partiendo de estos datos, es posible pensar que el incremento de actividad que observamos en presencia de MV y Fd sea debido a un fenómeno de este tipo. Así, el DT reduciría el MV y éste cedería los electrones a la Fd. La Fd reducida, cede a su vez los electrones a las enzimas y éstas al NO_3^- o al NO_2^-.

6.5. FUNCIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei* EN LA REDUCCIÓN ASIMILATIVA DEL NITRÓGENO.

La Fd es una proteína de pequeño peso molecular que tiene en su estructura grupos Fe-S. Participa en reacciones de transporte de electrones y tiene un papel muy importante en reacciones metabólicas de diversa naturaleza: foto-reducción del NADP (en plantas), reacciones de hidroxilación (bacterias aeróbicas y mitocondrias), fijación del nitrógeno (en bacterias y cianobacterias) y en la reducción del nitrito (bacterias y plantas) (Werber y Mevarech, 1978b).

Según el número de grupos Fe-S que se detectan en la estructura, se distinguen diferentes tipos de Fd: 2Fe-2S, 4Fe-4S y 8Fe-8S. En los años 70 se realizaron las primeras purificaciones y caracterizaciones de Fds empleando arqueas halófilas como fuentes de dicha proteína (Kerscher *et al*., 1976; Werber y Mevarech, 1978). No obstante, los autores de estos estudios no propusieron ninguna función para la Fd obtenida a partir de células de *Halobacterium*.

En base a los resultados presentados en los anteriores apartados (6.1-6.4), proponemos que la ferredoxina de *Haloferax mediterranei*es el donador fisiológico de electrones en los procesos de reducción de nitrato y nitrito.

CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA FERREDOXINA DE *Haloferax mediterranei*.

- La ferredoxina aislada de *Haloferax mediterranei*, de tipo Fe_2S_2, es el donador fisiológico de electrones en la reducción asimilativa del nitrógeno.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

7-. CONCLUSIONES GENERALES.

- Los resultados incluidos en la presente memoria suponen el primer estudio, tanto a nivel fisiológico como bioquímico, que se lleva a cabo sobre la reducción asimilativa del nitrógeno en un organismo halófilo del dominio *Archaea* (*Haloferax mediterranei*). Por tanto, se abre una nueva línea de investigación en haloarqueas que puede contribuir a la mejora del conocimiento del metabolismo de estos organismos, la evolución de los seres vivos, futuras aplicaciones tecnológicas de las haloarqueas, características de los lugares que deberían ser estudiados para detectar vida en planetas como Marte (Astrobiología).

- *Haloferax mediterranei* es un excelente candidato para llevar a cabo el desarrollo de técnicas de bioremediación de suelos salinos y aguas contaminadas, puesto que es capaz de crecer en medios con elevada concentración de nitrato, nitrito y NaCl. Esta aplicación resulta especialmente interesante en regiones como el Levante español, donde la sobreexplotación de acuíferos y el abono en exceso de los suelos están deteriorando un gran número de ecosistemas.

- Las enzimas Nas y NiR asimilativa de *Haloferax mediterranei* reúnen las condiciones ideales de las enzimas de interés industrial, ya que su actividad óptima se desarrolla a altas temperaturas (factor característico de numerosos procesos industriales).

AFSHAR, S., JOHNSON, E., DE VRIES, S. y SCHRÖDER, I. (2001) Properties of a thermostable nitrate reductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. J. Bacteriol. **183**, 5491-5495.

AICHI, M. y OMATA, T. (1997) Involvement of NtcB, a LysR family transcription factor, in nitrite activation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. J. Bacteriol. **179**, 4671-4675.

ALVAREZ-OSSORIO, M., MURIANA, F.J.G., DE LA ROSA, F.F. y RELIMPIO, A.M. (1992) Purification and Characterization of Nitrate Reductase from the Halophile Archaebacterium *Haloferax mediterranei*. Z. Naturforsch. **47**c, 670-676.

APARICIO, P.J., WITT, F.G., RAMÍREZ, J.M., QUIÑONES, M.A. y BALADÍN, T. (1995) Incorporación de NO_3^-, NO_2^- y Cl^- en el alga verde *Monoraphidium braunii* inducida por la luz azul. pp. 79-88. Editado por García-Guerrero, M. En: Avances en el metabolismo del nitrógeno inorgánico. Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

ARIZMENDI, J.M. (1989) Regulación, purificación y propiedades de la NiR de la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco, País Vasco.

ARIZMENDI, J.M., BENITO, M.P., IBARLUCEA, J.M., LLAMA, M.J. y SERRA, J.L. (1981) Purification and characterization of nitrite reductase from barley leaves. Ciênc. Biol. **6**, 155-158.

ASKER, D. y OHTA, Y. (2002) *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 729-738.

BALOWS, A., TRÜPER, H.G., DWOEKIN, M., HARDER, W. y SCHLEIFER, K.H. (1991) The family *Halobacteriaceae*. pp. 768-800. Editado por Balows, Trüper, Dwoekin, Harder y Schleifer. En: The Prokaryotes. Vol. I. 2ª Edición. Springer-Verlag.

BARNS, S.M., DELWICHE, C.F., PALMER, J.D. y PACE, N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl Acad. Sci. USA. **93**, 9188-9193.

BARNS, S.M., FUNDYGA, R.E., JEFFRIES, M.W. y PACE, N.R. (1994) Remarkable archaeal divertsity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**, 1609-13.

BEILBY, M.J. y WALKER, N.A. (1981) Chloride transport in *Chara*. I. Kinetics and currentvoltage curves for a probable protonsymport. J. Exp. Bot. **32**, 43-54.

BERKS, B.C., RICHARDSON, D.J., REILLY, A., WILLIS, A.C. y FERGURSON, S.J. (1995) The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. Biochem. J. **309**, 983-992.

BERTINI, I., TURANO, P. y VILA, A. (1993) Nuclear Magnetic Resonance of Paramagnetic Metalloproteins. Chem. Rev. **93**, 2833-2932.

BICKEL SANDKÖTTER, S. y UFER, M. (1995) Properties of a Dissimilatory Nitrate Reductase from the Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*. Z. Naturforsch. **50** c, 365-372.

BLAMEY, J.M., CHIONG, M., LÓPEZ, C. y SMITH, E.T. (2000) Purification and characterization of ferredoxin from hyperthermophilic *Pyrococcus woesei*. Anaerobe **6**, 285-290.

BLANCO MEDIAVILLA, F. (1992) La actividad nitrato reductasa en *Phormidum laminosum*: regulación, purificación y caracterización. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco, País Vasco.

BLASCO, F., GUIGLIARELLI, B., MAGALON, A., ASSO, M., GIORDANO, G. y ROTHERY, A. (2001) The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**, 179-193.

BLASCO, R., MARTÍNEZ-LUQUE, M., MADRID, M.P., CASTILLO, F. y MORENO-VIVIÁN, C. (2001) *Rhodococcus* sp. RB1 grows in the presence of high nitrate and nitrite concentrations and assimilates nitrate in moderately saline environments. Arch. Microbiol. **175**, 435-440.

BLASCO, R., CASTILLO, F. y MARTÍNEZ-LUQUE, M. (1997) The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus E1F1*, is a flavoprotein. FEBS Lett. **414**, 45-49.

BLÜMLE, S. y ZUMFT, W.G. (1991) Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolisis. Biochim. Biophys. Acta. **1057**, 102-108.

BOURNE, W.F. y MIFLIN, B.J. (1973) Studies on nitrite reductase in barley. Planta **111**, 47-56.

BRADFORD, M., (1976) A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.

BROWN, J.R. y DOOLITTLE, W.F. (1995) Root of the universal tree of life based on ancient aminopacyl-tRNA synthetase gene duplications. Proc. Nat. Acad. Sci. **92**, 2441-45.

BUSHY, S. y KOLB, A. (1996) The CAP modulon. pp. 255-279. Editado por Lin, E.C.C. y Lynch, S.A. En: Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. TX: Landes Company, Georgetown.

CAMACHO L.M., BROWN A.R., BONETE M.J., DANSON J.M. y HOUGH W.D. (1995) Isocitrate dehydrogenases from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. FEMS Microbiol. Lett. **134**, 85-90.

CAMPBELL, W.H. y KINGHORN, J.R. (1990) Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. Trends Biochem. Sci. **15**, 315-319.

CHATTON, E. (1938) Titres et Travoux Scientifiques (1906-1937) de Edouard Chatton (E. Sottano, Sète, France). Referenciado en Woese *et al.*, (1990).

CLELAND, W.W. (1979) Statistical analysis of enzyme kinetic data. Methods Enzymol. **63**, 103-138.

CLINE, S.W. y DOOLITTLE, W.F. (1987) Efficient transfection of the archaebacterium *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. **169**, 1341-1344.

CRAWFORD, N.M. y GLASS, A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci. **3**, 389-395.

D'SOUZA, S.E., ALTEKAR, W. y D'SOUZA, S.F. (1997) Adaptative response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the qrowth medium. Arch. Microbiol. **168**, 68-71.

De MORENO, M.R., SMITH, J.F. y SMITH, R.V. (1985) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensivity through a combined Coomassie Blue-silver stain procedure. Anal. Biochem. **151**, 466-470.

DeMOSS, J.A. y HSU, P.Y. (1991) Nark enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **173**, 3303-3310.

DYM, O., MEVARECH, M. y SUSSMAN, J.L. (1995) Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from archaebacterium. Science **267**, 1344-1346.

EMERSON, D., CHAUHAN, S., ORIEL, P. y BREZNAK, A. (1994) *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds. Arch. Microbiol. **161**, 445-452.

EPPLEY, R.W., COATSWORTH, J.L. y SOLORZANO, L. (1969) Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton. Limmol. Oceanogr. **14**, 194-205.

FERNÁNDEZ, E., GALVAN, A. y QUESADA, A. (1998) Nitrogen assimilation and its regulation. pp. 637-659. Editado por Rochaix, J.D. En: The molecular biology of chloroplast and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

FERRER, J., PÉREZ-POMARES, F. y BONETE, M.J. (1996) NADP-glutamate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, N-terminal sequence and stability. FEMS Microbiol. Lett. **32**, 72-76.

FERRER CASANOVA, J. (1995) Glutamato deshidrogenasa $NADP^+$ dependiente del Archaea *Haloferax mediterranei*. Estudios cinéticos y características moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, Alicante.

FLORENCIO, F.J., MARQUÉS, S. y CANDAU, P. (1987) Identification and Characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicelular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. FEBS Lett. **223**, 37-41.

FLORES, E., MURO-PASTOR, A.M., y HERRERO, A. (1999) Cyanobacterial nitrogen assimilation genes and NtcA-dependent control of gene expresión. pp. 463-477. Editado por Pescheck, G.A., Loffelhardt, W. Y Schmetterer, G. En: Phototrophic Prokaryotes. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

FLORES, E., FRÍAS, J.E., VALLADARES, A., MURO-PASTOR, A.M., MONTESINOS, M.L., QUINTERO, M.J., RUBIO, L.M., VÁZQUEZ, M.F. y HERRERO, A. (1998) Asimilación de nitrógeno y su regulación en Cianobacterias. Editado por Vega, J.M. En: Avances en el metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

FLORES, E., HERRERO, A. y GUERRERO, M.G. (1987) Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta **896**, 103-108.

FLORES, E., RAMOS, J.L., HERRERO, A. y GUERRERO, M.G. (1983a) Nitrate assimilation by *cyanobacteria*. pp. 363-387. Editado por Papageorgieu, G.C. y Pacher, L. En: Photosynthetic Procaryotes: Cell Diferentiation and Function. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

FLORES, E., ROMERO, J.M., GUERRERO, M.G. y LOSADA, M. (1983b) Regulatory interaction of photosynthetic nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta **725**, 529-532.

FORDE, B.G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochim. Biophys. Acta **1465**, 219-235.

FORTERRE, P. (1997) *Archaea*: what can we learn from their sequences?. Curr. Opin. Genet. Dev. **7**, 764-770.

FRANCO, A.R., CÁRDENAS, J. y FERNÁNDEZ, E. (1984) Ammonium (methylammonium) is the co-repressor of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhartii*. FEBS Lett. **176**, 453-456.

FRESNEDO, O. (1991) Estudio de la deficiencia de nitrógeno en la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco, País Vasco.

FRÍAS, J.E., FLORES, E. y HERRERO, A. (2000) Activation of the *Anabaena* nir operon promoter requires both NtcA (CAP family) and Tncb. (LysR family) transcription factors. Mol. Microbiol. **38**, 613-625.

FRÍAS, J.E., FLORES, E. y HERRERO, A. (1997) Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. J. Bacteriol. **179**, 477-486.

FRÍAS, J.E., FLORES, E. y HERRERO, A. (1994) Requeriment of the regulatory protein NtcA for the expresión of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Mol. Microbiol. **14**, 823-832.

FRÍAS, J.E., MÉRIDA, A., HERRERO, A., MARTÍN-NIETO, J. y FLORES, E. (1993) General distribution of the nitrogen control gene ntcA in cianobacteria. J. Bacteriol. **175**, 5710-5713.

FUGGI, A. (1990) Uptake of inorganic nitrogen compounds in an acidophilic alga. pp. 66-72. Editado por Ullrich, W.R. En: Inorganic nitrogen in plants and microporganisms. Springer, Berlín.

FUGGI, A., Di MARTINO-RIGANO, V., VONA, V. y RIGANO, C. (1981) Nitrate and ammonium assimilation in algal cell-suspensions and related pH variations in the external medium, monitored by electrodes. Plant. Sci. Lett. **23**, 129-138.

GALVÁN, A. y FERNÁNDEZ, E. (2001) Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**, 225-233.

GALVÁN, A., QUESADA, A. y FERNÁNDEZ, E. (1996) Nitrate and nitrite are transported by different specific transport system and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. **271**, 2088-2092.

GANGESWARAN, R. y EADY, R.A. (1996) Flavodoxin 1 of *Azotobacter vinelandii*: characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. Biochem. J. **317**, 103-108.

GANGESWARAN, R., LOWE, D.J. y EADY, R.A. (1993) Purification and charactrization of the assimilatory nitrate reductase in *Azotobacter vinelandii.* Biochem. J. **289**, 335-342.

GEIGER, B., MEVARECH, M. y WERBER, M.M. (1978) Immunochemical characterization of ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea. Eur. J. Biochem. **84**, 449-455.

GOLDENBERG, D.P. (1990) Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. Editado por Creighton. En: Protein Structure a practical approach. T.E. IRL Press.

GOLDMAN, B.S., LIN, J.T. y STEWART, V. (1994) Identification and structure of the nasR gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of nasFEDCBA (Nitrate Assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol. **176**, 5077-5085.

GU, Z., HARROD, R., ROGERS, E.J. y LOVETT, P.S. (1994) Properties of a pentapeptide inhibitor of a peptidyl transferase that is essential for *cat* gene regulation by translation attenuation. J. Bacteriol. **176**, 6238-6244.

GUERRERO, M.G. y LARA, C. (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. pp. 163-186. Editado por Fay, P. En: The cyanobacteria. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

GUERRERO, M.G., VEGA, J.M. y LOSADA, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. **32**, 169-204.

GUTIERREZ, J.C., RAMOS, F., ORTNER, L. y TORTOLERO, M. (1995) NasST, two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite-nitrate reductase operon (nasAB) of *Azotobacter vinelandii*. Mol. Microbiol. **18**, 579-591.

HAECKEL, E. (1866). Generelle Morphologie der Organismen. Reimer, Berlín. Referenciado en Woese *et al*., (1990).

HARBORNE, N.R., GRIFFITHS, L., BUSHY, S.J.W. y COLE, J.A. (1992) Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli* nir operon. Mol. Microbiol. **6**, 2805-2813.

HARROD, R. y LOVETT, P.S. (1997) Leader peptides of inducible chloramphenicol resistance genes from Gram-positive and Gram-negative bacteria bind to yeast and Archaea large subunit rRNA. Nucleic Acids Res. **25**, 1720-1726.

HERRERO, A. y GUERRERO, M.G. (1986) Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J. Gen. Microbiol. **132**, 2463-2468.

HERRERO, A., FLORES, E. y GUERRERO, M.G. (1985) Regulation of nitrate reductase cellular levels in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. FEMS Microbiol. Lett. **26**, 21-25.

HERRERO, A., FLORES, E. y GUERRERO, M.G. (1984) Regulation of the nitrate reductase level in *Anacystis nidulans*: activity decay under nitrogen stress. Arch. Biochem. Biophys. **234**, 454-459.

HERRERO, A., FLORES, E. y GUERRERO, M.G. (1981) Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. Strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. J. Bacteriol. **145**, 175-180.

HIGGINS, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. **8**, 67-113.

HIPKIN, C.R., AL-BASSAM, B.A. y SYRETT, P.J. (1980) The roles of nitrate and ammonium in the regulation of the development of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhartii*. Planta **150**, 13-18.

HOCHMAN, A., NISSANY, A. y AZIMUR, M. (1988) Nitrate reduction and assimilation by modetately halophilic, halotolerant bacterium Ba_1. Biochim. Biophys. Acta **965**, 82-89.

HOCHSTEIN, L.I. y LANG, F. (1991) Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. Arch. Biochem. Biophys. **288**, 380-385.

HOCHSTEIN, L.I. (1978) Carbohydrate metabolism in the extremely halophilic bacteria: the role of glucose in the regulation of citrate synthase activity. pp. 397-412. Editado por Caplan, S.R. y Ginzburg, M. En: Energetics and structure of halophilic microorganisms. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

HUANG, L. y HUANG, A. (1974) Regulation of membrane lipid fluidity in *Acholeplasma laidlawii*. Effect of carotenoid pigment content. Biochim. Biophys. Acta **352**, 361-370.

IKEDA, T.P., SHAUGER, A.E. y KUSTU, S. (1996) *Salmonella typhimurium* apparently percives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. J. Mol. Biol. **259**, 589-607.

INATOMI, K.I. y HOCHSTEIN, L.I. (1996) The purification and properties of a copper nitrite reductase from *Haloferax denitrificans*. Curr. Microbiol. **32**, 72-76.

JACOBS, M.H.J., VAN DER HEIDE, T., DRIESSEN, A.J.M. y KONINGS, W.N. (1996) Glutamate transport in *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by a novel binding protein-dependent secondary transport system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 12786-12790.

JAGANNADHAM, M.V., RAO, V.J., y SHIVAJI, S. (1991) The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: purification, structure, and interaction with synthetic membranes. J. Bacteriol. **173**, 7911-7917.

KAMEKURA, M. y KATES, M. (1988) Lipids of Halophilic *Archaebacteria*. pp. 25-54. Editado por Rodríguez-Valera, F. En: Halophilic Bacteria. Boca Raton, FL: CRC Press.

KATES, M. (1992) Archaebacterial lipids: Structure, biosynthesis and function. Biochem. Soc. Sym. **58**, 51-72.

KATES, M. y KUSHWAHA, S.C. (1978) Biochemistry of the lipids of extremely halophilic bacteria. pp. 461-481. Editado por Caplan, S.R. y Ginzsburg, M. En: Energetics and Structure of halophilic microorganisms. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Amsterdam, KERSCHER, L. y OESTERHELT, D. (1977) Ferredoxin is the coenzyme of α-ketoacid oxidoreductases in *Halobacterium halobium*. FEBS Lett. **83**, 197-201.

KERSCHER, L., OESTERHELT, D., CAMMACK, R. y HALL, D. (1976) A new plant-type ferredoxin from halobacteria. Eur. J. Biochem. **71**, 101-107.

KIKUCHI, H., AICHI, M., SUZUKI, I. y OMATA, T. (1996) Positive regulation by nitrite of nitrate assimilation operon in the cyanobacteria *Synecchococcus* sp. strain PCC 7942 and *Plectonema boryanum*. J. Bacteriol. **178**, 5822-5825.

KLEINHOFS, A. y WARNER, R.L. (1990) Advances in Nitrate Assimilation. Biochem. Plants. **16**, 89-115.

KLENK, H.P., CLAYTON, R.A., TOMB, J.F., WHITE, O., NELSON, K.E., KETCHUM, K.A. *et al*. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus lugidus*. Nature **390**, 365-370.

KLETZIN, A. y ADAMS, M.W.W. (1996) Tungsten in biological systems. FEMS Microbiol. Rev. **18**, 5-63.

KRAMER, E. y SCHMIDT, A. (1989) Nitrite accumulation by *Synechococcus* 6301 as a consequence of carbon -or sulfur- deficiency. FEMS Microbiol. Lett. **59**, 191-196.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680.

LARSEN, H. (1962) Halophilism. pp. 297-342. Editado por Gunsalus, I.C. y Stanier, R.Y. En: The bacteria, Vol. IV. Academic Press, New York.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. y COX, M.M. (1993) Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. 2ª Edición.

LIN, J.T. y STEWART, V. (1996) Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of nasF (nitrate assimilation) operon expresion in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Mol. Biol. **256**, 423-435.

LIN, J.T., GOLDMAN, B.S. y STEWART, V. (1994) The nasFEDCBA operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al. J. Bacteriol. **176**, 2551-2559.

LÓPEZ GARCÍA, P., ABAD, J.P., SMITH, C. y AMILS, R. (1992) Genomic organization of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: phisical map of the chromosome. Nucleic Acids Res. **20**, 2459-2464.

LÜBBEN, M. (1995) Cytochromes of archaeal electron transfer chains. Biochim. Biophys. Acta **1229**, 1-22.

LUQUE, I., FLORES, E. y HERRERO, A. (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. Plant Mol. Biol. **21**, 1201-1205.

MADIGAN, M.T. y OREN, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. Curr. Microbiol. **2**, 265-269.

MAEDA, S., KAWAGUCHI, Y., OHE, T. y OMATA, T. (1998) Cis-acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Bacteriol. **180**, 4080-4088.

MARGULIS, L. y GUERRERO, R. (1995). Life as a planetary phenomenon: the colonization of Mars. Microbiol. **11**, 173-184.

MARHUENDA-EGEA, F.C., PIERA-VELÁZQUEZ, S., CADENAS, C. y CADENAS, E. (2000) Kinetic studies of an extremely halophilic enzyme entrapped in reversed micelles. Biocat. Biotrans. **18**, 201-222.

MARINI, A., VISSERS, S., URRESTARAZU, A. y ANDRE, B. (1994) Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. **13**, 3456-3463.

MARQUEZ, E.D. y BRODIE, A.F. (1973) The effect of cations on the heat stability of a halophilic nitrate reductase. Biochim. Biophys. Acta **321**, 84-89.

MAYR, E. (1991) The ideological resistance to Darwin's theory of natural selection. Proceed. American Philosophical Soc. **135**, 123-139.

McGENITY, T.J., GEMMELL, R.T. y GRANT, W.D. (1998) Proposal of a new halobacterial genus Natrinema gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 1187-1196.

McKINTOSH, C. y MEEK, S.E.M. (2001) Regulation of plant nitrate reductase activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**, 205-214.

McMASTER, J. y ENEMARK, J.H. (1998) The active sites of molybdenum-and tungsten-containing enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol. **2**, 201-207.

MENDEL, R. (1997) Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. Planta **203**, 399-405.

MENDEZ, J.M. y VEGA, J.M. (1981) Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. Physiol. Plantarum. **52**, 7-14.

MIKAMI, B. y IDA, S. (1984) Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Biochim. Biophys. Acta **791**, 294-304.

MOIR, J.W.B y WOOD, N.J. (2001) Nitrate and nitrite transport in bacteria. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**, 215-224.

MOORE, R.L. y McCARTHY, B.J. (1969) Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. J. Bacteriol. **99**, 248-254.

MORELL, V. (1997) Microbiology's Scarred Revolutionary. Science **276**, 699-702.

MORENO-VIVIÁN, C., CABELLO, P., MARTÍNEZ-LUQUE, M., BLASCO, R. y CASTILLO, F. (1999) Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. J. Bacteriol. **181**, 6573-6584.

MOURA, I., BURSAKOV, S., COSTA, C. y MOURA, J.J.G. (1997) Nitrate and Nitrite Utilization in Sulfate-Reducing Bacteria. Anaerobe **3**, 279-290.

MULLAKHANBHAI, M.F. y LARSEN, H. (1975) *Halobacterium volcanii*, sp. nov. a Dead sea halobacterium with a moderate salt requeriment. Arch. Microbiol. **104**, 207-214.

MURO-PASTOR, A.M., VALLADARES, A., FLORES, E. y HERRERO, A. (1999) The *hetC* gene is a direct target of the NtcA transcriptional regulator in cyanobaterial heterocyst development. J. Bacteriol. **181**, 6664-6669.

MURPHY, M.J. y SIEGEL, L.M. (1973) Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new tyupe of porphyrin-related prothetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases. J. Biol. Chem. **248**, 6911-6919.

NAKATANI, Y., LAZRAK, T., MILAN, A., WOLF, G y OURISSON, G. (1991) Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes. pp. 207-215. Editado por Rodríguez-Valera, F. En: General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms. Plenum Publishing Corporation, New York.

NIETO, J.J (1991) The response of halophilic bacteria to heavy metals. pp. 173-179. Editado por Rodríguez-Valera, F. En: General and Applied of Halophilic Microorganisms. Plenum Publishing Corporation, New York.

NOLLER, H.F. (1993) Peptidyl transferase - protein, ribonucleoprotein or RNA?. J. Bacteriol. **175**, 5297-5300.

OCHOA DE ALDA, J.A.G., TAPIA, M.I., LLAMA, M.J. y SERRA, J.L. (1995) Utilización de nitrato en *Phormidium laminosum.* Efecto de la deficiencia de nitrógeno. pp. 29-36. Editado por García Guerrero, M. En: Avances en el metabolismo del nitrógeno inorgánico. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

OREN, A. (2002) Taxonomy of halophilic microorganisms: *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. En: Halophilic microorganisms and their environments. Editado por Oren, A. Kluwer Academic Publishers, 23-68.

OREN, A. (1995) The role of glycerol in the nutrition of halophilic archaeal communities: a study of respiratory electron transport. FEMS Microbiol. Lett. **16**, 281-290.

OREN, A. y GUREVICH, P. (1994) Production of D-lactate, acetate, and pyruvate from glycerol in communities of halophilic archaea in the Dead Sea and in saltern crystallizer ponds. FEMS Microbiol. Ecol. **14**, 147-156.

OREN, A. y GUREVICH, P. (1993) Characterization of the dominant halophilic archaea in bacterial bloom in the Dead Sea. FEMS Microbiol. Ecol. **12**, 249-256.

OTIMORI, K. y HATTORI, A. (1970) Induction of nitrate and nitrite reductases in *Anabaena cylindrica*. Plant. Cell. Physiol. **11**, 873-878.

PACE, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the Biosphere. Science **276**, 734-740.

PALOD, A., CHAUHAN, V.S. y BAGCHI, S.N. (1990) Regulation of nitrate reduction in a cyanobacterium *Phormidium uncinatum*: distinctive modes of ammonium-represion of nitrate and nitrite reductases. FEMS Microbiol. Lett. **68**, 285-288.

RAJU, K.S., SHARMA, N.D. y LODHA, M.L. (1996) Inhibition of assimilatory nitrate uptake by ammonium ions in *Azorhizobium caulinodans* IRBG46. J. Plant Biochem. Biotech. **5**, 119-121.

RAMOS CORMENZANA, A. (1991) Halophilic organisms and the environment. pp. 15-21. Editado por Rodríguez-Valera, F. En: General and Applied

of Halophilic Microorganisms. Plenum Publishing Corporation, New York.

REDINBAUGH, M.G. y CAMPBELL, W.H. (1991) Higher plants response to environmental nitrate. Physiol. Plant **82**, 640-650.

REYES, F., GAVIRA, M., CASTILLO, F. y MORENO-VIVIÁN, C. (1998) Periplasmic nitrate-reducing system of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: transcriptional and mutational analysis of the napKEFDABC gene cluster. J. Biochem. **331**, 897-904.

RICHARDSON, D.J. (2001) Introduction: nitrate reduction and the nitrogen cycle. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **58**, 163-164.

RICHARDSON, D.J. y WATMOUGH, N.J. (1999) Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol. **3**, 207-219.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. (1995) Cultivation of halophilic *Archaea*. pp. 13-16. Editado por DasSarma, S. En: Archaea. A Laboratory Manual Halophiles. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

RODRÍGUEZ-VALERA, F., GARCÍA LILLO, J.A., ANTÓN, J. y MESEGUER, I. (1991) Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. pp. 373-378. Editado por Rodríguez-Valera, F. En: General and Applied of Halophilic Microorganisms. Plenum Publishing Corporation, New York.

RODRÍGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., y RAMOS-CORMENZANA, A. (1980a) Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. J. Gen. Microbiol. **119**, 535-538.

RODRÍGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F., y RAMOS-CORMENZANA, A. (1980b) Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. Can. J. Microbiol. **26**, 1259-1263.

RODRÍGUEZ, R., LARA, C. y GUERRERO, M.G. (1992) Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2: kinetic and energetic aspects. Biochem. J. **282**, 639-643.

ROMERO, L.C. (1988) Estudios moleculares e inmunológicos de la ferredoxina-nitrito reductasa del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

ROMERO, L.C., GALVAN, F, y VEGA, J.M. (1987) Purification and properties of the siroheme-containing ferredoxin-nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta **914**, 55-63.

RUBIO, L.M., HERRERO, A. y FLORES, E. (1996) A cyanobacterial narB gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. Plant Mol. Biol. **30**, 845-850.

SENGUPTA, S., SHAILA, M.S. y RAO, G.R. (1996) Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. Biochem. J. **331**, 147-155.

SERRANO, A., RIVAS, J. y LOSADA, M. (1981) Photosynthesis Research **2**, 175-184.

SHAHMOHAMMADI, H.R., ASGARANI, E., TERATO, H., SAITO, T., OHYAMA, Y., GEKKO, K., YAMAMOTO, O. y IDE, H. (1998) Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarum* against DNA-damaging agents. J. Radiat. Res. **39** (4), 251-262.

SHAPIRO, B.M. y STADTMAN, E.R. (1970) Glutamine synthetase. Methods Enzymol. **17**, 910-922.

SNELL, C.D. y SNELL, C.T. (1949) Colorimetric methods of analysis 2. pp. 802-807. Van Nostrand, New York.

SOLOMONSON, L.P. y BALBER, M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. **41**, 225-253.

STANIER, R.Y. (1970) The concept of a bacterium. Arch. Microbiol. **42**, 17-35.

STANIER, R.Y. y van NIEL, C.B. (1962) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **11**, 285-300.

STEWART, V. (1994) Regulation of nitrate and nitrite reduction in enterobacteria. Antonie Leeuwenhoek **66**, 37-45.

SUGIMORI, D., ICHIMATA, T., IKEDA, A. y NAKAMURA, S. (2000) Purification and characterization of a ferredoxin from *Haloarcula japonica* strain TR-1. Biometals **13**,23-28.

SUZUKI, I., SUGIYAMA, T. y OMATA, T. (1996) Regulation by cyanate of the genes involved in carbon and nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. J. Bacteriol. **178**, 2688-2694.

SUZUKI, I., HORIE, N., SUGIYAMA, T. y OMATA, T. (1995) Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. J. Bacteriol. **177**, 290-296.

SUZUKI, I., SUGIYAMA, T. y OMATA, T. (1993) Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Plant Cell Physiol. **34**, 1311-1320.

SUZUKI, S., DELIGEER, YAMAGUCHI, K., KATAOKA, K., KOBAYASHI, K., TAGAWA, S., KOHZUMA, T., SHIDARA, S. y IWASAKI, H. (1997) Spectroscopic characterization and intramolecular electron transfer processes of native 2 Cu-depleted nitrite reductases. J. Biol. Inorg. Chem. **2**, 265-274.

TAGUCHI, S. y KINZIE, R.A. (2001) Growth of zooxanthellae in culture with two nitrogen sources. Marine Biology, **138**, 149-155.

TAPIA, M.I., LLAMA, M.J. y SERRA, J.L. (1996) Regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Planta **198**, 24-30.

TAPIA, M.I., LLAMA, M.J. y SERRA, J.L. (1995) Active glutamine synthetase is required for ammonium- or glutamine-promoted prevention of nitrate and nitrite reduction in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Physiol. Plantarum **94**, 241-246.

TINDALL, B.J. (1992) The Family halobacteriaceae. pp. 768-800. Editado por Balows, A. En: The Prokaryotes. 2ª edición. Springer-Verlag, Berlín.

TISCHNER, R. y SCHMIDT, A. (1984) Light mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. Arch. Microbiol. **137**, 151-154.

TOMLINSON, G.A., STROHM, M.P. y HOCHSTEIN, L.I. (1978) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: the identification of lactobionic acid as a product of lactose metabolism by *Halobacterium saccharovorum*. Can. J. Microbiol. **24**, 898-903.

TOMLINSON, G.A. y HOCHSTEIN, L.I. (1976) *Halobacterium saccharovorum* sp.nov., a carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium[1]. Can. J. Microbiol. **22**, 587-591.

TOMLINSON, G.A., KOCH, T.K. y HOCHSTEIN, L.I. (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. Can. J. Microbiol. **20**, 1085-1091.

TOMLINSON, G.A. y HOCHSTEIN, L.I. (1972) Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. **18**, 1973-1976.

TORREBLANCA, M., RODRÍGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., VENTOSA, A., KAMEKURA, M. y KATES, M. (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. **8**, 89-99.

TRAVIS, J. (1996) Third Branch of Life Bares its genes. Science News. **150**, 116.

TREHAN, K. (1986) Regulation of glutamate dehydrogenase activityand ammonia production in a nitrogen fixing cyanobacterium. Acta Microbiol. Hung. **33**, 111-116.

TSAY, Y.F., SCHROEDER, J.I., FELDMAN, K.A. y CRAWFORD, N.M. (1993) A herbicide sensitive gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell **72**, 705-713.

ULLRICH, W.R. y NOVACKY, A. (1981) Nitrate-dependent membrane potential changes and their induction in *Lemma gibba* G1. Plant Sci. Lett. **22**, 211-217.

VALLADARES, A., MURO-PASTOR, A.M., FILLAT, M.F. HERRERO, A. y FLORES, E. (1999) Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin: $NADP^+$ reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. FEBS Lett. **449**, 159-164.

VALLEJO ACEVO, J.M. et al. (1986) Cuantificación de nitrato mediante ultravioleta. pp. 246-247. Editado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En: Métodos oficiales de Análisis. Tomo III. Dirección General de Política Alimentaria. Madrid.

VAN MAANEN, J.M.S., WELLE, I.J., HAGEMAN, G., DALLINGA, J.W. MERTENS, P.L.J.M. y KLEINJANS, J.C.S. (1996) Nitrate contamination of drinking water: relationship with HPTR variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines. Environ. Health. Perspect. **104**, 522-528.

VAN'T RIET, J. y PLANTA, R.J. (1975) Purification, structure and properties of the respiratory nitrte reductase of *Klebsiella aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta **379**, 81-94.

VEGA, J.M. y MENACHO, A. (1990) Regulation of inorganic nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. pp. 73-78. Editado por Ullrich, C. En: Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms. Springer-Verlag Berlin.

VEGA, J.M., CARDENAS, J. y LOSADA, M. (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. Methods Enzymol. **69**, 255-270.

VEGA, J.M. y KAMIN, H. (1977) Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme. J. Biol. Chem. **252**, 896-909.

VENTOSA, A. Y NIETO, J.J. (1995) Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. World J. Microbiol. Biotech. **11**, 85-94.

VIÑEGLA, B., MAESTRE, C. y FIGUEROA, F.L. (2000) Effect of ultraviolet radiation on nitrate reductase activity in marine microalgae. pp. 337. Editado por Cánovas, F.M. En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular. Servicio de Publicaciones e intercambio científico de la Universidad de Málaga, Málaga, España.

VOLKL, P., HUBER, R., DROBNER, E., RACHEL, R., BURGGRAF, S., TRINCONE, A. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. Appl. Environ. Microbiol. **59**, 2918-2926.

WATRIN, L., CORRE, E. y PRIEUR, D. (1996) In vivo susceptibility of sulfothermophilic archaea to antimicrobial agents. J. Marine Biotech. **4**, 215-219.

WEATHERBURN, M.W. (1967) Phenol hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. **39**, 971.

WEI, T.F., RAMASUBRAMANIAN, T.S. y GOLDEN, J.W. (1994) *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development. J. Bacteriol, **176**, 4473-4482.

WERBER, M.M. y MEVARECH, M. (1978a) Induction of a dissimilatory reduction pathway of nitrate in halobacterium of the Dead Sea. Arch. Biochem. Biophys. **186**, 60-65.

WERBER, M.M. y MEVARECH, M. (1978b) Purification and characterization of a highly acidic 2Fe-ferredoxin from *Halobacterium* of the Dead Sea. Arch. Biochem. Biophys. **187**, 447-456.

WHITTAKER, R.H. (1959) Q. Rev. Biol. **34**, 210-226. Referenciado en Woese *et al.*, (1990)

WILLIAMS y WILKINS (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. pp. 739-746. 9ª Edición. Baltimore, Maryland, U.S.A.

WOESE, C.R. (1993) The archaea: Their history and significance. pp. vii-xxix. Editado por Kates, M., Kushner, D.J. y Matheson, A.T. En: The Biochemistry of Archaebacteria. Elsevier Science Publishers.

WOESE, C.R., KANLER, O. y WHEELIS M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea, Bacteria*, and *Eucarya*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**, 4576-4579.

WU, Q. y STEWART, V. (1998) NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Kelsiella oxytoca* (pneumoniae) M5al. J. Bacteriol. **180**, 1311-1322.

YAMAMOTO, I., SHIMIZU, H., TSUJI, T. y ISHIMOTO, M. (1986) Purification ans properties of nitrate reductase from *Mitsuokella multiacidus*. Biochem. J. **99**, 961-969.

YOSHIMATSU, K., SAKURAI, T. y FUJIWARA, T. (2000) Purification and characterization of dissimilatory nitrate reductase from a dinitrifying halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*. FEBS Lett. **470**, 216-220.

ZACCAI, G. y EISENBERG, H. (1990) Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. Trends Biochem. Sci. **15**, 333-337.

ZHAG, H., LEGGEWIE, G., HANSEN, M., JENNINGS, A.J. y FORDE, B.G. (2000) The NRT" Family of high-affinity nitrate transporters. Editado por Cánovas, F.M. En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular. Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Málaga, Málaga, España.

ZILLING, W. (1991) Comparative biochemistry of *Archaea* and *Bacteria*. Curr. Opin. Genet. Dev. **1**, 544-551.

ZIMMER, C. (1995) Triumph of the *Archaea*. Discover. February, 30-31.

ZUMFT, W.G. (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**, 533-616.

Tabla 1: datos correspondientes a la figura 4.1. Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD NiR*
0,0	0,0500	0,0000	0,0
18,0	0,0510	0,0000	0,0
42,0	0,0970	0,0000	0,0
58,0	0,1880	0,0000	0,0
61,0	0,2840	0,7000	0,0
75,5	0,9460	0,9000	380,0
79,0	1,2110	0,8400	460,0
85,0	1,5870	0,8349	198,0
103,5	2,0630	0,0000	0,0
108,0	2,0650	0,0000	0,0
114,0	2,1420	0,0000	0,0
138,0	2,2910	0,0000	0,0
151,0	2,3020	0,0000	0,0
175,0	2,2820	0,0000	0,0

Tabla 2: datos correspondientes a la figura 4.2.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*[NO_2^-] mM extracelular*
0,0	0,050	0,0000
18,0	0,051	0,0000
42,0	0,097	0,0000
58,0	0,188	0,3800
61,0	0,284	0,2726
75,5	0,946	0,2602
79,0	1,211	0,8565
85,0	1,587	7,3500
103,5	2,063	10,2100
108,0	2,065	12,7600
114,0	2,142	16,1900
138,0	2,291	18,1800
151,0	2,302	19,0500
175,0	2,282	20,9130

Tabla 3: datos correspondientes a la figura 4.3.

ABS (600 nm)	*[NO_2^-] mM extracelular*	*ACTIVIDAD NiR* mU/mg prot.	*ABS (600 nm)*	*[NO_2^-] intracelular μmoles/mg prot.*
0,050	0,000	0,0	0,167	0,00
0,051	0,000	0,0	0,184	0,00
0,097	0,000	0,0	0,227	0,00
0,188	0,000	0,0	0,236	0,00
0,284	0,000	0,0	0,275	0,00
0,946	0,000	380,0	0,277	0,00
1,211	5,000e-4	460,0	0,286	0,00
1,587	0,017	198,0	0,290	0,00
2,063	5,780	0,0	0,297	0,00
2,065	7,090	0,0	0,306	0,00
2,142	7,300	0,0	0,360	0,00
2,291	7,720	0,0	0,410	1,60e-3
2,302	7,700	0,0	0,625	3,20e-3
----	----	----	0,789	0,011
----	----	----	0,921	5,00e-3
----	----	----	1.485	1,00e-3
----	----	----	1,638	3,80e-5
----	----	----	1,773	5,30e-5

Tabla 4: datos correspondientes a la figura 4.4.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm) 0,5 mM NO_3^-*	*ABS (600 nm) 5 mM NO_3^-*	*ABS (600 nm) 25 mM NO_3^-*	*ABS (600 nm) 75 mM NO_3^-*
0,0	0,016	0,015	0,018	0,017
42,0	0,097	0,094	0,098	0,097
63,5	0,344	0,325	0,385	0,356
69,0	0,431	0,441	0,465	0,454
87,5	0,466	1,233	1,500	1,290
90,5	0,465	1,328	1,522	1,400
97,0	0,464	1,710	2,078	1,943
110,5	0,532	1,869	2,373	2,428
115,0	0,568	1,941	2,436	2,495
121,0	0,584	1,950	2,454	2,514
135,5	0,560	2,057	2,440	2,524

TIEMPO (h)	*[NO_2^-] mM extra. 0,5 mM NO_3^-*	*[NO_2^-] mM extra. 5 mM NO_3^-*	*[NO_2^-] mM extra. 25 mM NO_3^-*	*[NO_2^-] mM extra. 75 mM NO_3^-*
0,0	0,000	0,000	0,000	0,00
63,5	0,000	0,000	0,000	0,35
69,0	0,000	0,000	0,000	0,70
87,5	0,000	0,000	0,049	8,25
90,5	0,000	0,000	3,425	9,00
97,0	0,000	0,000	9,950	9,80
110,5	0,040	0,000	14,540	10,40
115,0	0,062	0,015	14,200	11,95
121,0	0,092	0,021	14,500	14,30
135,5	0,400	0,084	14,230	16,80

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ACTIV. Nas 0,5 mM NO_3^-*	*ACTIV. Nas 5 mM NO_3^-*	*ACTIV. Nas 25 mM NO_3^-*	*ACTIV. Nas 75 mM NO_3^-*
0,0	0,0000	0,00	0,00	0,00
63,5	0,0000	0,00	0,00	0,00
69,0	0,0000	0,00	0,00	0,00
87,5	0,0000	4,57e-3	9,60	4,84e-3
90,5	0,0000	2,10e-3	7,05	1,69e-3
97,0	0,0000	5,37	12,00	9,74
110,5	0,5200	0,11	70,10	79,80
115,0	0,0000	3,42e-3	45,00	84,50
121,0	0,0000	2,24	50,00	65,40
135,5	0,9616	7,58e-3	53,00	67,30

TIEMPO (h)	*ACTIV. NiR 0,5 mM NO_3^-*	*ACTIV. NiR 5 mM NO_3^-*	*ACTIV. NiR 25 mM NO_3^-*	*ACTIV. NiR 75 mM NO_3^-*
0,0	0,00	0,000	0,000	0,00
63,5	0,00	0,000	0,000	0,00
69,0	0,00	0,000	0,000	10,45
87,5	0,00	0,000	0,000	268,90
90,5	0,00	7,500	9,000	150,00
97,0	25,00	4,010	5,900	0,75
110,5	25,00	1,460	4,540	0,00
115,0	22,00	0,987	3,090	0,00
121,0	3,54	1,030	0,416	0,00
135,5	4,36	1,280	0,146	0,00

Tabla 5: datos correspondientes a la figura 4.5.

TIEMPO (h)	$[NO_3^-]$ mM extra. 0,5 mM NO_3^-	$[NO_3^-]$ mM extra. 5 mM NO_3^-	$[NO_3^-]$ mM extra. 25 mM NO_3^-	$[NO_3^-]$ mM extra. 75 mM NO_3^-
0,0	0,500	5,00	25,00	75,0
63,5	0,440	4,97	24,90	72,3
69,0	0,430	4,88	24,30	71,0
87,5	0,430	4,54	23,40	71,0
90,5	0,397	4,40	23,30	69,9
97,0	0,336	3,30	20,76	64,0
110,5	0,260	1,83	16,96	61,6
115,0	0,000	1,56	16,90	60,3
121,0	0,000	1,20	15,20	58,0
135,5	0,000	1,00	14,95	57,0

Tabla 6: datos correspondientes a la figura 4.6.

TIEMPO (h)	ABS (600 nm) 0,5 mM NO_2^-	ABS (600 nm) 1 mM NO_2^-	ABS (600 nm) 2 mM NO_2^-	ABS (600 nm) 3,5 mM NO_2^-	ABS (600 nm) 5 mM NO_2^-	ABS (600 nm) 10 mM NO_2^-
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18,0	0,013	0,102	0,092	0,095	0,042	0,039
22,0	0,064	0,166	0,140	0,168	0,078	0,077
26,5	0,096	0,191	0,146	0,187	0,103	0,088
42,5	0,114	0,193	0,164	0,189	0,110	0,118
50,0	0,143	0,224	0,170	0,199	0,135	0,104
65,0	0,266	0,245	0,226	0,200	0,149	0,116
71,0	0,286	0,257	0,236	0,212	0,150	0,105
74,5	0,332	0,440	0,269	0,220	0,159	0,115
94,5		0,498		0,234		
96,0	0,423	0,513	0,471	0,235	0,180	0,102
98,0		0,677		0,245		0,076
167,0	0,400	0,813	1,130	0,264	0,150	
170,5		0,828	1,187	0,287		
185,0		0,903	1,281	0,288		
192,0			1,282			
356,0			1,451			
382,0			1,491			

TIEMPO (h)	$[NO_2^-]$ (mM) 0,5 mM NO_2^-	$[NO_2^-]$ (mM) 1 mM NO_2^-	$[NO_2^-]$ (mM) 2 mM NO_2^-	$[NO_2^-]$ (mM) 3,5 mM NO_2^-	$[NO_2^-]$ (mM) 5 mM NO_2^-	$[NO_2^-]$ (mM) 10 mM NO_2^-
0,0	0,530	1,140	2,110	3,50	5,24	10,00
18,0	0,490	1,130	2,060	3,42	5,22	9,80
22,0	0,480	1,120	2,040	3,37	5,17	9,79
26,5	0,440	1,040	2,030	2,80	4,92	9,66
42,5	0,430	0,970	1,940	2,80	4,89	9,61
50,0	0,340	0,900	1,930	2,80	4,74	9,45
65,0	0,052	0,890	1,850	2,75	4,99	9,35
71,0	0,027	0,740	1,840	2,75	4,86	9,30
74,5	0,086	0,250	1,780	2,73	4,92	9,36
81,0		0,055		2,66		
94,5		0,027		2,60		
96,0	0,089	0,015	1,770	2,49	4,94	9,32
98,0				2,40		
167,0			0,021	2,39	4,91	9,32
170,5			0,018			
185,0			0,020			

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	ACTIVIVIDAD NiR 0,5 mM NO_2^-	ACTIVIDAD NiR 1 mM NO_2^-	ACTIVIDAD NiR 2 mM NO_2^-	ACTIVIDAD NiR 3,5 mM NO_2^-	ACTIVIDAD NiR 5 mM NO_2^-	ACTIVIVIDAD NiR 10 mM NO_2^-
0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,00	0,000
18,0	6,300	0,0	0,716	0,0	0,00	0,000
22,0	3,500	0,0	1,170	0,0	6,28	0,082
26,5	2,000	0,0	2,000	0,0	5,00	0,000
42,5	0,500	0,0	3,330	0,0	0,00	0,000
50,0	0,342	0,0	6,660	0,0	0,00	0,000
65,0	6,500	3,0	42,000	0,5	1,90	00000
71,0	0,822	6,0	2,160	6,4	7,10	0,000
74,5	7,660	4,0	4,400	11,0	0,76	2,000
81,0		7,0		7,0		
94,5		2,2		5,0		
96,0	8,920	2,8	8,790	0,0	3,30	3,200
98,0				0,0		
167,0	2,340		0,086		0,00	0,000
170,5			0,000		0,00	0,000
185,0			0,330			
192,0			0,490			

Tabla 7: datos correspondientes a la figura 4.7.

TIEMPO (h)	ABS (600 nm) 5 mM NO_3^-	ABS (600 nm) 2 mM NO_2^-	ABS (600 nm) Sin N
0,0	0,850	0,850	0,850
3,0	0,889	0,917	0,980
18,0	1,035	0,980	1,020
23,0	1,080	1,066	1,053
28,0	1,190	1,100	1,088
42,0	1,402	1,166	1,149
47,0	1,591	1,255	1,162
52,5	1,613	1,267	1,175
67,5	1,693	1,400	1,209
77,0	1,740	1,515	1,222
102,0	1,800	1,640	1,244
107,0	1,825	1,700	1,300
164,0	2,100	1,917	1,325

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	ACTIVIDAD Nas 5 mM NO_3^-	ACTIVIDAD Nas 2 mM NO_2^-	ACTIVIDAD Nas Sin N	ACTIVIDAD NiR 5 mM NO_3^-	ACTIVIDAD NiR 2 mM NO_2^-	ACTIVIDAD NiR Sin N
0,0	0,000	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000
3,0	0,000	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000
18,0	0,000	10,00	5,30	0,900	0,150	0,010
23,0	0,000	58,00	9,20	1,600	0,242	0,225
28,0	2,760	39,00	4,50	2,200	0,272	0,250
42,0	12,000	16,00	0,00	1,100	0,308	0,280
47,0	0,232	8,30	0,00	1,000	0,380	0,390
52,5	0,000	2,92	0,00	0,980	0,462	0,380
67,5	0,000	0,00	0,00	0,800	0,334	0,310
77,0				0,760	0,254	0,266
102,0				0,752	0,141	0,255
107,0				0,630	0,105	3,220e-3

Tabla 8: datos correspondientes a la figura 4.8.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm) 25 mM NO_3^-*	*ABS (600 nm) 100 mM NH_4^+*	*ABS (600 nm) Sin N*
0,0	1,416	1,416	1,416
1,0	1,417	1,476	1,426
7,5	1,490	1,486	1,515
22,0	1,610	1,700	1,653
26,5	1,830	1,860	1,661
31,5	1,940	1,875	1,720
45,5	2,240	1,990	1,800
49,0	2,310	2,020	1,821
55,5	2,330	2,060	1,760
69,5	2,400	2,100	1,790
74,5	2,420	2,150	1,850
95,5	2,500	2,250	1,900
165,5	2,500	2,420	1,980

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ACTIVIDAD Nas 25 mM NO_3^-*	*ACTIVIDAD Nas 100 mM NH_4^+*	*ACTIVIDAD Nas Sin N*	*ACTIVIDAD NiR 25 mM NO_3^-*	*ACTIVIDAD NiR 100 mM NH_4^+*	*ACTIVIDAD NiR Sin N*
0,0	36,0	36,0	36,0	17,0	17,0	17,0
1,0	34,0	24,0	38,0	18,0	16,0	17,4
7,5	30,0	23,0	57,0	18,5	14,0	17,5
22,0	31,0	17,0	20,0	19,0	9,8	22,0
26,5	30,0	15,0	19,0	25,0	8,0	32,0
31,5	29,0	14,0	16,0	19,0	7,3	10,4
45,5	28,0	12,0	15,0	11,0	1,2	4,7
49,0	34,0	11,0	14,0	13,0	0,0	3,9
55,5	35,0	12,0	12,0	11,0	0,0	3,2
69,5	39,0	13,0	16,0	0,0	0,0	3,0
74,5	40,0	11,0	17,0	0,0	0,0	1,8
95,5	57,0	14,0	14,0	0,0	0,0	0,0
165,5	69,0	11,0	17,0	0,0	0,0	0,0

Tabla 9: datos correspondientes a la figura 4.9.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD* NiR
0,0	0,890	0,814	48
3,0	0,891	0,865	45
18,0	1,192	0,520	25
24,0	1,225	0,590	24
27,5	1,214	0,614	23
43,0	1,211	0,930	16
46,5	1,224	1,680	11
51,0	1,186	0,600	0
66,5	1,217	0,580	0
75,0	1,184	0,224	0
80,0	1,187		0

Tabla 10: datos correspondientes a la figura 4.10.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD NiR*
0,0	0,400	0,2372	0,00000
5,0	0,487	1,0697	0,76405
9,0	0,505	1,3631	0,84734
23,0	0,575	1,1972	0,84125
29,0	0,631	1,2678	1,17938
34,0	0,695	1,4991	1,74000
46,5	1,200	2,6357	1,39535
52,0	1,400	1,1561	0,26578
58,0	1,715	0,8353	0,00000
71,0	1,940	0,7672	0,00000
83,0	2,000	0,7814	0,00000
90,0	2,010	0,8330	0,00000

Tabla 11: datos correspondientes a la figura 4.11.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)* $NO_3^- + NH_4$	*ABS (600 nm)* $NO_2^- + NH_4^+$	*ABS (600 nm)* $NO_3^- + NO_2^-$
0,0000	0,8840	0,9370	0,9000
3,0000	0,9220	0,9850	0,9260
18,0000	1,2100	1,1750	1,2190
24,0000	1,3000	1,1940	1,2480
27,5000	1,4240	1,1950	1,2180
43,0000	1,4900	1,1900	1,2450
46,5000	1,5150	1,1820	1,2300
51,0000	1,5230	1,1830	1,2200
66,5000	1,5410	1,1840	1,2280
75,0000	1,5900	1,2180	1,1900
80,0000	1,4310	1,2200	1,1850

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ACTIVIDAD Nas* $NO_3^- + NH_4^+$	*ACTIVIDAD Nas* $NO_2^- + NH_4^+$	*ACTIVIDAD Nas* $NO_3^- + NO_2^-$	*ACTIVIDAD NiR* $NO_3^- + NH_4^+$	*ACTIVIDAD NiR* $NO_2^- + NH_4^+$	*ACTIVIDAD NiR* $NO_3^- + NO_2^-$
0,0	0,52	0,528	0,53	31,00	30,00	30,00
3,0	1,36	0,548	0,66	46,00	44,00	30,34
18,0	1,76	0,536	0,62	14,60	22,60	20,00
24,0	2,18	0,485	0,60	13,00	23,60	15,00
27,5	2,99	0,520	0,65	11,40	24,50	15,60
43,0	2,24	0,770	0,79	6,70	15,00	11,00
46,5	2,11	0,860	0,82	8,90	16,30	16,80
51,0	1,59	0,850	0,78	7,90	17,00	10,50
66,5	1,31	0,640	0,57	8,86	15,10	11,00
75,0	1,30	0,700	0,33	7,40	10,00	10,50
80,0		0,690				

Tabla 12: datos correspondientes a la figura 4.12.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*[NO_2^-] extracelular*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD NiR*
0,0	0,044	0,000	0,000	0,00
42,0	0,090	0,000	0,000	0,00
61,0	0,280	0,000	0,300	66,00
75,0	0,946	0,380	0,578	70,00
88,0	1,246	0,385	0,590	63,00
93,0	1,538	0,000	1,470	64,30
95,0	1,693	4,700e-3	1,590	18,10
113,0	1,993	5,900e-3	1,830	6,70
116,5	2,112	0,019	2,090	6,40
121,0	2,150	0,029	2,270	3,31
136,5	2,242	0,039	1,490	3,29
145,0	2,277	0,000	1,520	1,23
160,0	2,244			

Tabla 13: datos correspondientes a la figura 4.13.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm) Figura A*	*[NO_2^-] mM extracelular Figura A*	*ABS (600 nm) Figura B*	*[NO_2^-] mM extracelular Figura B*
0,0	0,015	0,000	0,015	0,000
42,0	0,194	0,000	0,194	0,000
63,5	0,325	0,000	0,325	0,000
69,0	0,441	0,010	0,441	0,011
87,5	1,233	0,023	1,200	0,021
90,5	1,360	0,000	1,400	0,000
95,0	1,510	0,000	1,510	0,000
98,0	1,680	0,000	1,700	0,000
118,0	2,300	0,000	2,300	0,000
125,0	2,310	0,000	2,330	0,000

Tabla 14: datos correspondientes a la figura 4.14.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD NiR*
0,0	0,500	1,68	64,0
3,5	0,620	1,70	38,5
19,0	0,980	1,65	18,0
22,5	1,220	1,20	7,9
27,0	1,256	1,06	0,0
42,5	1,263	1,10	0,0
51,0	1,457	1,12	0,0
66,0	1,457	1,10	0,0

Tabla 15: datos correspondientes a la figura 4.15.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm) 5 mM NO_3^- + MSX*	*ABS (600 nm) 5 mM NH_4^+ + MSX*
0,0	0,52	0,500
19,0	0,73	0,687
26,0	1,40	0,990
30,0	1,70	1,254
44,0	1,80	1,320
53,0	2,05	1,400
68,0	2,10	1,450
74,0	2,18	1,470

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ACTIVIDAD Nas 5 mM NO_3^- + MSX*	*ACTIVIDAD Nas 5 mM NH_4^+ + MSX*	*ACTIVIDAD NiR* 5 mM NO_3^- + MSX	*ACTIVIDAD NiR 5 mM NH_4^+ + MSX*
0,0	0,400	0,40	0,280	0,2800
19,0	0,520	0,33	0,240	0,2600
26,0	0,330	0,55	0,290	0,3050
30,0	0,140	0,17	0,350	0,4200
44,0	0,025	0,11	0,420	0,1430
53,0	0,020	0,08	0,390	0,1000
68,0	0,013	0,02	0,120	0,0760
74,0	9,000e-3	0,03	0,110	0,0015

BIBLIOTECA VIRTUAL MiGUEL HERNANDEZ

Tabla 16: datos correspondientes a la figura 4.16.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm) 5 mM NO_3^- + Cloranfenicol*	*ABS (600 nm) 5 mM NH_4^+*
0,0	0,536	0,512
19,0	0,632	0,830
26,0	0,670	0,990
30,0	0,675	1,028
44,0	0,682	1,098
53,0	0,743	1,110
68,0	0,725	1,130
74,0	0,723	1,050

Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ACTIVIDAD Nas 5 mM NO_3^- + Cloranf.*	*ACTIVIDAD Nas 5 mM NH_4^+*	*ACTIVIDAD NiR 5 mM NO_3^- + Cloranf.*	*ACTIVIDAD NiR 5 mM NH_4^+*
0,0	0,600	0,700	0,600	0,600
19,0	0,300	0,630	0,308	0,175
26,0	0,230	0,070	0,165	0,060
30,0	0,240	0,015	0,108	0,005
44,0	0,270	0,000	0,062	0,000
53,0	0,200	0,000	0,050	0,000
68,0	0,206	0,000	0,000	0,000
74,0	0,200	0,000	0,000	0,000

Tabla 17: datos correspondientes a la figura 4.17.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*	*ACTIVIDAD NiR*
0,0	0,500	0,55	0,95
2,5	0,660	0,54	0,70
5,0	0,719	0,26	0,45
8,0	0,739	0,11	0,30
23,0	0,763	0,00	0,00

Tabla 18: datos correspondientes a la figura 4.18.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

TIEMPO (h)	*ABS (600 nm)*	*ACTIVIDAD Nas*
0,0	1,700	0,70
2,5	1,770	0,68
5,5	1,790	0,54
9,0	1,840	0,49
11,0	1,850	0,47
23,0	1,870	0,40
29,0	1,876	0,60
32,0	1,880	0,64
34,0	1,900	0,66
48,0	1,910	0,68
51,5	1,950	0,61
70,5	1,950	0,42

Tabla 19: datos correspondientes a la figura 5.9.

nmoles NO_2^- (MV-NR)	*ABS (540 nm) sin DT*	*ABS (540 nm) con DT*	*nmoles NO_2^- (MV-NiR)*	*ABS (540 nm) sin DT*	*ABS (540 nm) con DT*
0,00	0,018	0,018	14,40	0,25	0,24
11,75	0,219	0,211	20,61	0,35	0,35
23,50	0,418	0,406	26,82	0,45	0,44
46,99	0,806	0,787	36,14	0,60	0,61
70,50	1,136	1,128	49,20	0,81	0,80
			60,99	1,00	1,02
			71,55	1,17	1,15

Tabla 20: datos correspondientes a las figuras 5.10 y 5.11.

Enzima (μl) (5.11)	*ABS (540 nm) (5.11)*	*Tiempo (min) (5.12)*	*ABS (540 nm) (5.12)*
0,0	0,000	0,0	0,000
10,0	0,035	5,0	1,000e-3
20,0	0,070	10,0	0,020
30,0	0,110	15,0	0,095
40,0	0,150	20,0	0,190
50,0	0,190	30,0	0,310
60,0	0,230	45,0	0,370

Tabla 21: datos correspondientes a las figura 5.12.

pH	*% ACTIV. Nas (60 ºC)*	*pH*	*% ACTIV. Nas (40 ºC)*
7,46	45,45	8,20	40,50
7,80	58,18	8,50	56,20
8,33	92,72	8,75	100,00
8,61	100,00	9,23	100,00
9,09	100,00	9,52	97,67
9,56	80,77	9,82	89,86
10,24	78,20	10,19	77,08
10,59	62,82	10,35	77,08
		10,60	64,70

Tabla 22: datos correspondientes a las figura 5.13.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

Temperatura (ºC)	*Nas (3,1 M NaCl)*	*Nas (2,2 M NaCl)*	*Nas (1,3 M NaCl)*	*Nas (0,9 M NaCl)*
30,0	0,00	0,000	0,068	5,00e-4
40,0	0,11	0,230	0,270	0,240
50,0	0,22	0,280	0,304	0,326
60,0	0,36	0,320	0,395	0,412
70,0	0,40	0,410	0,353	0,374
80,0	0,52	0,480	0,250	0,160
90,0	0,13	0,041	0,000	0,000

Tabla 23: datos correspondientes a las figura 5.14.

TIEMPO (h)	*% Ae Nas (2,7 M NaCl)*	*% Ae Nas (2,1 M NaCl)*	*% Ae Nas (1,2 M NaCl)*	*% Ae Nas (0,9 M NaCl)*
0,0	100,00	100,00	100,0	100,00
20,0	50,77	51,30	40,5	29,52
43,0	4,61	6,00	7,2	8,57
69,0	1,54	5,26	6,6	2,33

Tabla 24: datos correspondientes a las figura 5.15, 5.16 y 5.17.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

1/[MV] (mM^{-1})	*1/Ae Nas*	*1/[Fd] (μM^{-1})*	*1/Ae Nas*	*1/[NO_3^-] (mM^{-1})*	*1/Ae Nas*
0,33	0,2229	0,28	0,314	0,05	0,0211
0,50	0,2538	1,00	0,321	0,10	0,0222
1,00	0,3340	1,86	0,330	0,15	0,0238
2,00	0,5000	2,77	0,335	0,20	0,0250
5,00	1,0000	7,46	0,370	0,40	0,0286
10,00	1,8510				

Tabla 25: datos correspondientes a las figuras 5.21 y 5.22.

Enzima (μl) (5.22)	*ABS (540 nm) (5.22)*	*Tiempo (min) (5.23)*	*ABS (540 nm) (5.23)*
0,00	1,20	0,0	1,175
10,00	1,15	1,0	1,000
20,00	1,05	2,0	0,810
30,00	0,96	4,0	0,600
40,00	0,87	6,0	0,450
50,00	0,78	10,0	0,350
60,00	0,70	20,0	0,250

Tabla 26: datos correspondientes a las figura 5.23.

pH	*% ACTIVIDAD NiR (60 ºC)*	*pH*	*% ACTIVIDAD NiR (40 ºC)*
6,08	63,1600	6,05	52,8600
6,20	78,9500	6,27	67,8600
6,46	85,9600	6,46	100,0000
6,76	86,8400	7,04	68,5700
7,00	95,8300	7,14	68,2100
7,40	100,0000	7,50	72,8600
7,90	78,5000	7,70	72,1400
		7,94	77,5000

Tabla 27: datos correspondientes a las figura 5.24.
Actividades expresadas en mU/mg prot.

Temperatura (ºC)	*NiR (3,3 M NaCl)*	*NiR (2,7 M NaCl)*	*NiR (2,0 M NaCl)*	*NiR (0,9 M NaCl)*
30,0	0,1007	0,0813	0,0802	0,0675
40,0	0,1618	0,0814	0,0813	0,0970
50,0	0,1895	0,0906	0,1015	0,0813
60,0	0,2057	0,1183	0,1330	0,0640
70,0	0,0545	0,0860	0,0540	0,0345
80,0	0,0254	0,0430	0,0000	0,0000
90,0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tabla 28: datos correspondientes a las figura 5.25.

TIEMPO (h)	*% Ae NiR (3,6 M NaCl)*	*% Ae NiR (2,6 M NaCl)*	*% Ae NiR (1,8 M NaCl)*
0,0	100,0	100,00	100,00
24,0	101,3	94,66	99,11
72,0	104,4	88,83	51,20
168,0	100,9	18,93	0,00

Tabla 29: datos correspondientes a las figura 5.26, 5.27 y 5.28.
Actividades expresadas en U/mg prot.

1/[MV] (mM^{-1})	*1/Ae NiR*	*1/[Fd] (μM^{-1})*	*1/Ae NiR*	*1/[NO_3^-] (mM^{-1})*	*1/Ae NiR*
0,33	0,70	3,0000e-3	0,70	0,033	0,39
0,50	1,02	7,5000e-3	0,85	0,066	0,46
1,00	1,40	0,0185	1,15	0,200	0,76
2,00	2,20	0,0277	1,50	1,000	3,00
5,00	4,60	0,0750	2,60	2,000	5,70