

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

Transporte de sodio y potasio en la levadura halófila
Debaryomyces hansenii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS
B I O M E D I C A S

P R E S E N T A :

M. EN C. JUAN CARLOS GONZALEZ HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ANTONIO PEÑA DIAZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

JULIO DEL 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Debaryomyces hansenii



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JUAN CARLOS GONZALEZ HERNANDEZ

FECHA: 14/JUNIO/2004

FIRMA: [Handwritten Signature]

Presentación del manuscrito

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto central de doctorado que se describe en esta tesis (**parte I**), consistió en evaluar algunas propiedades del transporte de sodio y potasio en la levadura halófila *Debaryomyces hansenii*; este trabajo originó tres publicaciones que aparecieron en las siguientes revistas: Revista Latinoamericana de Microbiología, Ciencia Nicolaita y Yeast.

La **parte II** de esta tesis se desarrolló por la inquietud de ampliar el conocimiento sobre el, o los mecanismos con que *Debaryomyces hansenii* puede adaptarse a altas concentraciones de sal en el medio, y que pueden participar en el balance osmótico de las células, mediante pequeñas moléculas sintetizadas por ellas, o tomadas del medio donde se encuentran disponibles; este trabajo complementario ha dado lugar a dos trabajos sometidos a revisión en Ciencia Nicolaita, Extremophiles, que se incorporan a este manuscrito en formato PDF. Actualmente se están realizando experimentos para preparar un último artículo en el cual se evaluaron las actividades de algunas enzimas glucolíticas y algunos intermediarios de esta vía metabólica en condiciones de estrés salino, cuyos resultados se piensa enviar a la revista Yeast o Extremophiles (datos no mostrados).

Dedicatoria

- A mi esposa *Geanelly*
- A mis *papas, suegros y familia.*

Agradecimientos

- Al Dr. Antonio Peña por brindarme la oportunidad de incorporarme y trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas, consejos y apoyo incondicional.
- A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Edmundo Chávez Cossio y Dr. Salvador Uribe Carvajal, por sus consejos y comentarios.
- A los miembros del Jurado: Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Alicia Ortega Aguilar, Dra. Marina Gavilanes Ruiz, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Dr. Edmundo Chávez Cossio, Dr. Roberto Coria Ortega, Dr. Federico Martínez Montes, por la revisión crítica y sugerencias realizadas al trabajo de tesis.
- A Martha Calahorra y Norma Sánchez por su ayuda técnica brindada durante el transcurso de este trabajo.
- Al Dr. Roberto Coria por sus enseñanzas y a la Dra. Laura Kawashaki por su apoyo técnico brindado durante mi estancia de investigación en su laboratorio (2003).
- A la Dra. Maria C. Loureiro-Dias y Dra. Catarina Prista, por sus enseñanzas y apoyo brindado en su laboratorio durante la estancia de investigación en su laboratorio (2004).
- A mis amigos.
- A la UNAM.
- A mis compañeros de laboratorio.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por su apoyo otorgado, durante el transcurso de mi formación profesional (Maestría y Doctorado); registro No. 124521; Beca No. 127608.
- Al apoyo No. 223999 (PAPIIT) de la DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México y al CONACYT por su donativo No. 36070N.
- A la Dirección General de Estudios de Posgrado.
- Al apoyo No. 202337 otorgado en la convocatoria 2004 del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

ABREVIATURAS

YPD	(Medio de cultivo: extracto de levadura, peptona y dextrosa)
MES	(ácido 2-[N-Morfolino]etanosulfónico)
TEA	(Trietanolamina)
G	(Glucosa)
CTAB	(Cetiltrimetilamonio, bromuro)
CCCP	(Carbonilcianuro <i>m</i> -clorofenilhidrazona)
DiSC ₃ (3)	(3,3'-dipropiltiacarbocianina)

INDICE

PAGINA

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Crecimiento y contenido de iones en la levadura.....	3
Halofilia.....	4
El ión potasio, catión intracelular preferido, y la toxicidad del Na ⁺	5
El transporte del potasio en la levadura.....	5
El potencial transmembranal y el transporte del K ⁺	7
Los cambios del pH intracelular y el transporte de H ⁺ en <i>S. cerevisiae</i>	9
La regulación del pH interno de la levadura.....	9
Los sistemas de transporte del K ⁺	10
<i>Debaryomyces hansenii</i>	14
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Parte I.....	17
Materiales y Métodos.....	17
Resultados.....	20
Discusión de resultados.....	38
Conclusiones.....	42
Perspectivas.....	44
Bibliografía.....	45
Anexo I.....	51
Parte II.....	52
Anexo II.....	52

Resumen

Debaryomyces hansenii, una levadura halófila que se encuentra en el mar y algunos productos alimenticios con alto contenido de sal, tiene un crecimiento óptimo en presencia de 0.6 M de NaCl o de KCl, y acumula altas concentraciones de Na⁺ o de K⁺. Después de cultivarla en presencia de NaCl o KCl, al incubarla en presencia del catión “opuesto”, KCl o NaCl, respectivamente, muestra una salida rápida del catión acumulado acompañado por una acumulación más lenta del catión presente en el medio de la incubación. Sin embargo, se observó una salida rápida semejante del catión acumulado al incubar las células en una solución amortiguadora (pH 6 o 8), en ausencia de cationes externos. Esto indica la posible presencia de un canal iónico que permite la salida del catión acumulado. Para el transporte de iones *D. hansenii* mostró una cinética de saturación que se ajusta a un solo componente para la captación de cationes de ⁸⁶Rb⁺ y de ²²Na⁺, mostrando una afinidad mucho más alta para ⁸⁶Rb⁺ que para ²²Na⁺. La influencia del pH sobre las constantes cinéticas fue similar para ambos cationes y aunque los valores del Km eran más altos a pH 8, se presentó también un aumento en los valores de Vmax. Se evaluó la acumulación de ²²Na⁺ encontrando que ésta fue mayor para las células crecidas en la presencia de 0.6 M de NaCl. También se estudió la acumulación del ⁸⁶Rb⁺ y se encontró un comportamiento similar, pero a un grado ligeramente mayor. La cinética de la inhibición del transporte de ²²Na⁺ por el KCl y la de ⁸⁶Rb⁺ por NaCl mostraron un comportamiento de inhibición no competitivo. Puede concluirse que el mecanismo de adaptación de *D. hansenii* a la sal, principalmente al Na⁺, no consiste en la exclusión del catión, sino que probablemente sus sistemas metabólicos sean resistentes a las altas concentraciones de los cationes acumulados.

Abstract

Debaryomyces hansenii, a halophile yeast found in sea water and salty food products grows optimally in 0.6 M of either NaCl or KCl, accumulating high concentrations of Na⁺ or K⁺. After growth in NaCl or KCl, a rapid efflux of either accumulated cation was observed if the cells were incubated in the presence of the “opposite” cation, that is, KCl or NaCl, respectively, accompanied by a slower accumulation of the cation present in the incubation medium. However, a similar, rapid efflux was observed if cells were incubated in buffer, in the absence of external cations. This fact led us to postulate the existence of an ionic channel in charge of the rapid efflux of either cation. This yeast showed a cation uptake activity for both ⁸⁶Rb⁺ and ²²Na⁺ with saturation kinetics, with a much higher affinity for ⁸⁶Rb⁺ than for ²²Na⁺. The pH dependence of the kinetic constants was similar for both cations, and although Km values were higher at pH 8, there was also an increase in the Vmax values. The accumulation of ²²Na was found to be increased in cells grown in the presence of 0.6 M NaCl. ⁸⁶Rb⁺ was also accumulated more in these cells, but to a slightly greater extent. The inhibition kinetics of the uptake of ²²Na⁺ by K⁺, and that of ⁸⁶Rb⁺ by Na⁺ was found to be noncompetitive. It can be concluded that the mechanism of Na⁺ tolerance of *D. hansenii* is not excluding this cation, but instead, its metabolic systems must be resistant to high salt concentrations.

Introducción

La levadura es un hongo unicelular que se reproduce por gemación o por fisión. Esta definición comprende una amplia variedad de organismos, entre los que se encuentran los ascomicetos y los basidiomicetos (Rose y Harrison, 1987).

Se han descrito muy diversos hábitats naturales en donde las levaduras aparecen en una amplia densidad de población y con una gran adaptación, según su naturaleza (Rose y Harrison, 1987). *Debaryomyces hansenii* es uno de los ascomicetos más comunes en las aguas marinas, tiene una amplia tolerancia al estrés salino y es capaz de aprovechar muy diversas fuentes de carbono (Droop y Ferguson, 1968).

Como todos los microorganismos, las levaduras deben contar con una gran cantidad de condiciones internas específicas y balanceadas para el crecimiento celular y su función óptima, pero las fluctuaciones del medio pueden influir o perturbar sus funciones celulares. Esas perturbaciones pueden alterar las actividades enzimáticas, afectar el flujo metabólico, desestabilizar la estructura celular, o perturbar los gradientes químicos o electroquímicos. Por esto, las células deben ser capaces de proteger y mantener rasgos críticos de la homeostasis interna en contra de las condiciones externas variables. En ambientes más diluidos que el medio interno de una célula, la entrada de agua es prevenida por el desarrollo de una presión de turgencia. Durante la exposición a altas concentraciones de sal, los organismos enfrentan efectos combinados de estrés debido al aumento de la concentración de electrolitos y el bajo potencial de agua. El estrés salino causa cambios en la célula y una pérdida de la turgencia, que pueden llevarla a la disminución e inclusive al cese del crecimiento celular. Por otra parte, las levaduras en general, suelen adaptarse a esta situación, primeramente por la exclusión de estos iones del citoplasma, o bien mediante la restauración osmótica, produciendo solutos que ayudan a restaurar la turgencia y el volumen celular (Hohmann, 2002).

Crecimiento y contenido intracelular de iones

Un análisis comparativo de 42 especies de levadura realizado para evaluar la tolerancia al NaCl, llevó a la clasificación de cuatro grupos (Lages y cols., 1999). Entre las levaduras más sensibles, las cuáles tienen un máximo de tolerancia de 0 a 1 M NaCl, se encontró *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia stipitis*; mientras que *Saccharomyces cerevisiae* y

Zygosaccharomyces rouxii fueron clasificadas como levaduras con un máximo de tolerancia entre 1 y 2 M de NaCl. *Pichia farinosa* muestra un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2 a 3 M de NaCl. Entre las células que tienen una máxima tolerancia al NaCl y la capacidad de crecer dentro de concentraciones de 3 a 4 M de NaCl, se encuentran diferentes especies de *Candida* y *D. hansenii*.

Los microorganismos halófilos son aquellos que se encuentran en los ambientes hipersalinos, pero se diferencian de los halotolerantes porque son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en su ausencia. Hay dos diferentes estrategias fundamentales en el mundo microbiano que permiten a ciertos microorganismos sobrellevar un estrés osmótico debido a la presencia de una alta concentración de sal. a) Las células mantienen altas concentraciones intracelulares de sal, osmóticamente o al menos equivalentes a la concentración externa de sal (“salt-in” strategy); algunos sistemas intracelulares deben adaptarse a la presencia de altas concentraciones de sal. b) Las células mantienen bajas concentraciones de sales en su citoplasma (“compatible-solute” strategy). La presión osmótica del medio es balanceada por solutos compatibles y no se requiere de una adaptación especial de los sistemas intracelulares (Bayley y Morton, 1978; González-Hernández y Peña, 2002).

Halofilia

Aunque las sales se requieren para todas las formas de vida, los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento: los halófilos ligeros muestran crecimiento óptimo dentro de una concentración de NaCl que oscila entre 0.2 y 0.85 M (2-5%); los halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20 %) de NaCl, y por último, los halófilos extremos, crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl. En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (DasSarma y Arora, 2001).

El ión potasio, catión intracelular preferido, y la toxicidad del Na⁺

En la naturaleza es un hecho intrigante que el potasio (K⁺), sea uno de los cationes que preferentemente acumulan las células, como catión intracelular más que el sodio (Na⁺), a pesar de la similitud entre los dos cationes. Sólo existe una pequeña diferencia en el radio iónico de estos dos iones; el efecto sobre la estructura de las proteínas es similar (Yancey y cols., 1992). Sin embargo, el K⁺ ha sido seleccionado y mantenido como el catión regular dentro del medio intracelular de muchos organismos, por lo que tiene una mayor compatibilidad con las funciones celulares en comparación con el Na⁺. Esto se apoya en las diferencias de las propiedades de hidratación de los dos iones, argumentando que las células han seleccionado el K⁺ para promover la formación del agua menos limitada, y por lo tanto más reactiva.

El transporte del potasio en la levadura

El K⁺ es un componente indispensable para todas las formas celulares, y todas dependen de la captación, y eventualmente de la liberación de K⁺ para crecer y mantenerse. Es también conocido que las células en la mayoría de los medios naturales contienen altas concentraciones de K⁺ en su interior, usando diferentes tipos de transporte del catión. Los primeros experimentos enfocados para explicar el mecanismo de la captación del K⁺ en células eucarióticas (diferentes a las de mamífero), mostraron que en las levaduras el K⁺ parecía ser intercambiado por protones (H⁺) (Rothstein y Bruce, 1958; Conway y Downey, 1950).

Probablemente fue *S. cerevisiae* el organismo en el cual se realizaron los primeros estudios formales sobre el transporte de iones, en especial del K⁺. El grupo de Conway observó primero la producción de una gran cantidad de ácido (H⁺) por la levadura (Conway y O'Malley, 1946), y realizó estudios orientados a definir el mecanismo del transporte del K⁺, en los cuales observó una relación prácticamente estequiométrica de 1:1 entre la entrada de K⁺ y la salida de H⁺ al medio durante la fermentación (Conway y O'Malley, 1946). Esto lo llevó a postular que la entrada de K⁺ y de otros iones a la célula se lleva a cabo preferentemente por un sistema de transporte o acarreador fisiológico de K⁺, y se propuso una "bomba" que podía funcionar como una bomba de protones que simultáneamente introducía al K⁺ a la célula, mediante un mecanismo eléctricamente neutro, impulsado por el potencial redox de la célula (Conway y Brady, 1950; Conway y cols., 1950). Este es un proceso importante, no sólo para la célula, sino también desde

el punto de vista industrial; *S. cerevisiae*, al entrar en contacto con el medio, tiene la capacidad de acidificarlo, expulsando H^+ en intercambio con K^+ , y dado que las fermentaciones industriales suelen llevarse a cabo en anaerobiosis, ello le permite estar mejor adaptado más que otros organismos que no tienen la capacidad de sobrevivir en medio ligeramente ácido.

La solución del problema se abrió a partir de los experimentos de Rothstein y Demis (1953), quienes encontraron que la fermentación se estimula en presencia de K^+ extracelular, y en otro estudio, se encontró que la adición de K^+ también estimula la respiración (Peña y cols., 1969). Mediante experimentos de transporte y aplicaciones cinéticas, también fue la levadura en la que por primera vez se demostró la presencia de un acarreador de K^+ (Conway y Duggan, 1958; Rothstein y Bruce, 1958), pero manteniendo la hipótesis de la existencia de un intercambiador que transporta simultáneamente los H^+ al exterior y el K^+ al interior, ambos en contra de un gradiente de concentración inducido por la energía libre de las reacciones de óxido-reducción del metabolismo celular (Conway y cols., 1950).

Algunos años después, Peña y cols. (1972), propusieron la existencia de una bomba de protones en la forma de una ATPasa, capaz de bombear protones y generar un potencial electroquímico, negativo y alcalino en el interior de la célula, cuyo componente eléctrico representaba el impulso para la entrada del K^+ a la célula por un transportador diferente de la ATPasa. Poco después, el grupo de Slayman propuso un mecanismo semejante para la membrana plasmática de *Neurospora crassa* utilizando la energía libre de hidrólisis del ATP para bombear H^+ fuera de la célula (Slayman y cols., 1973). La propuesta fue apoyada luego en forma definitiva mediante diversos enfoques experimentales (Peña, 1975).

Los principales datos que apoyan la idea son las observaciones (Peña y cols., 1972) de que el pH alcalino del medio de incubación sin K^+ estimula ambos procesos celulares (fermentación y respiración), y que esto se acompaña de una salida rápida de H^+ ; además de que la salida de H^+ se acelera al agregar K^+ , pero sólo cuando el pH del medio es ácido (4). Se encontró que tanto la adición de K^+ como el aumento del pH del medio producen una rápida disminución de los niveles de ATP y un aumento de ADP y fosfato inorgánico (Rothstein y Demis, 1953; Peña, 1975). Dado que el elemento común es un aumento del bombeo de protones al exterior, de acuerdo con la teoría quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1961; Mitchell y Moyle, 1969), se propuso que en ambos casos se estimula la actividad de una ATPasa que bombeaba protones al exterior y que,

ante la adición del K^+ , el potencial transmembranal, que impulsa al K^+ al interior, se abatió, aumentando la actividad de la ATPasa y el bombeo de protones. En vista de que esta ATPasa se estimula en medio alcalino, en el cual no hay transporte de potasio sino sólo el bombeo de protones, se propuso su existencia como una entidad separada, pero acoplada al transporte del K^+ a través del potencial electroquímico.

También para demostrar que el transporte del K^+ implicaba dos sistemas diferentes, una ATPasa de protones y un acarreador del catión, se utilizaron diversos inhibidores, entre los cuales se encuentran las alquilguanidinas y algunos colorantes catiónicos, como la safranina, azul de metileno, bromuro de etidio, entre otros (Peña y Ramírez, 1975; Peña, 1973; Peña y cols., 1979), que inhiben el transporte del potasio, pero no el bombeo de protones.

En *N. crassa* el efecto del pH extracelular sobre el transporte de cationes sugirió que la entrada de K^+ y la salida de H^+ se podían explicar en términos de la existencia de una bomba de protones (Slayman y cols., 1973).

El potencial transmembranal y el transporte del K^+

Mitchell postuló que el intermediario en la fosforilación oxidativa era un gradiente de protones creado a través de la membrana (Mitchell, 1961; Mitchell y Moyle, 1969). La idea central de su hipótesis establece que la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias o de las bacterias aeróbicas está acoplada a la síntesis de ATP mediante un potencial electroquímico de protones $\Delta\mu H^+$, que se crea a través de las membranas transductoras de energía y es necesario también para mover los iones al interior de las mitocondrias (o las bacterias) en contra del gradiente de concentración química mediante sistemas de transporte específicos.

Otra de las contribuciones importantes de Mitchell consistió en postular que la ATPasa mitocondrial, al hidrolizar al ATP, puede bombear protones al exterior de la membrana, pero que es una enzima reversible, que en presencia del gradiente electroquímico de H^+ lo utiliza para sintetizar el ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico; propuso inclusive cambiar el nombre de ATPasa por ATPsintetasa o sintasa (Mitchell, 1961; Mitchell y Moyle, 1969).

En experimentos con desacoplantes se observó que, con glucosa como sustrato, se inhibe el transporte del K^+ sin disminuir los niveles de ATP, y que su efecto depende de la dirección de los

gradientes combinados de H^+ y K^+ o del potencial electroquímico de la célula, de acuerdo con la capacidad reportada para conducir H^+ a través de la membrana. Esto demostró la existencia de una bomba de H^+ (H^+ -ATPasa), responsable de crear el potencial electroquímico que involucra el transporte de potasio de una forma acoplada pero independiente (Peña, 1975), de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica (Mitchell y Moyle, 1969).

Hay varios mecanismos para la formación de los potenciales electroquímicos a través de las membranas biológicas. Desde luego que en la levadura el más importante es el generado por el bombeo de H^+ por la ATPasa de la membrana plasmática, y se pueden cuantificar, según el mecanismo, por la teoría de Nernst o la de Donnan que permiten calcular la magnitud del potencial o describir la relación de concentración de los iones.

Al acumularse el K^+ , éste utiliza y por tanto disminuye el potencial de membrana formado por el bombeo de H^+ , permitiendo aumentar el gradiente de protones (ΔpH) y disminuyendo en parte el gradiente eléctrico ($\Delta\psi$), cuyo valor aún se discute, pero que se estima en cerca de -200 mV en *S. cerevisiae* (Eddy y cols., 1970).

La confirmación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática como componente responsable del bombeo de H^+ capaz de generar un gradiente electroquímico, provino de estudios con mutantes de la levadura deficientes en la respiración y con inhibidores de la ATPasa de membrana plasmática. Con estas mutantes de *S. cerevisiae*, Serrano (1980) observó que el dietilestilbestrol y la dicitclohexilcarbodimida (DCCD) inhibía la actividad de la ATPasa y el bombeo de H^+ de una manera específica, sin afectar los niveles de ATP celular ni la permeabilidad de los protones; con lo que concluyó que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática está implicada en el bombeo de protones en la levadura.

Posteriormente, se obtuvo una evidencia más directa de la actividad del bombeo de H^+ por la ATPasa de membrana plasmática y la electrogenicidad del proceso, al ser purificada la enzima y reconstituirla en liposomas, tanto a partir de *S. cerevisiae* (Malpartida y Serrano, 1981), como de *Schizosaccharomyces pombe* (Dufour y cols., 1982). En estos sistemas, el ATP se hidroliza del lado externo de la membrana y la entrada de H^+ genera un potencial de membrana positivo en el interior durante la hidrólisis. La naturaleza electrogénica del bombeo de H^+ , se demostró por la transposición de H^+ que sólo tiene lugar en presencia del K^+ y el ionóforo valinomicina para compensar las cargas.

Finalmente, Serrano y cols. (1986), clonaron y obtuvieron la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la enzima H^+ -ATPasa de *S. cerevisiae*, y otros investigadores las de otras levaduras y hongos (Goffeau y Slayman, 1981).

Los cambios del pH intracelular y el transporte de H^+ en *S. cerevisiae*

Durante la actividad metabólica celular se genera una diversidad de compuestos que tienden a producir una acidificación interna; por esta razón, la medida del pH interno es un tema de importancia en el área, ya que el pH determina distintas características importantes de la estructura y actividad de varias moléculas y procesos biológicos (incluyendo los de transporte) y, por lo tanto, del comportamiento general de las células. Si además, una buena parte de los fenómenos de transporte de la levadura dependen de la actividad de una ATPasa que bombea H^+ al exterior, es necesario tener información sobre los cambios del pH intracelular, pues esta H^+ -ATPasa aumenta su actividad cuando la célula transporta K^+ , o al aumentar el pH del medio. Ya sea por un método o por otro, los diferentes grupos de investigación han tratado de determinar los valores y la respuesta del pH interno ante diferentes condiciones de incubación. Así, Peña y cols. (1972), reportaron que el pH externo influye de una manera directa en el pH interno, y si se añade glucosa como sustrato, el pH aumenta, gracias al bombeo de protones. Este dato fue confirmado posteriormente mediante una técnica más precisa (Peña y cols., 1995).

Por otro lado, el pH interno también depende del estado metabólico de la célula y de las diferentes condiciones de cultivo; pero a pesar de que existe una tendencia de la célula a mantener la concentración interna de H^+ dentro del intervalo de operación óptima de varias enzimas citoplásmicas (Roos y Boron, 1981), es claro que la constancia del pH intracelular representa un estado estacionario y no de equilibrio real, en el que participan, inclusive, como en el caso de *S. cerevisiae*, la producción de ácido carbónico y otros ácidos orgánicos débiles por parte de la célula (López y cols., 1999).

La regulación del pH interno de la levadura

El principal mecanismo por el cual la levadura elimina los protones consiste en su transposición a través de la membrana por medio de la H^+ -ATPasa, con lo cual retiene una

cantidad considerable de aniones de ácidos débiles producto de su metabolismo. Esto lleva a la discusión sobre el papel regulador de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en el pH interno de la célula. Considerando que es esta enzima la que se deshace de una gran parte de los H^+ derivados del metabolismo, podría decirse que sí regula el pH interno; sin embargo, parece tratarse más bien de una capacidad de la enzima simplemente para bombear H^+ , pero no a un papel regulador propiamente dicho (Roos y Boron, 1981). El bombeo de H^+ por parte de la H^+ -ATPasa da lugar a que el medio externo se acidifique; pero en presencia de glucosa, que se esperaba produjera valores más bajos de pH que en presencia de etanol, por la producción de CO_2 y el ácido carbónico derivado de su hidratación, en realidad es más alto (Conway y cols., 1950., López y cols., 1999). De esta manera, el bombeo de H^+ por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, en especial a valores altos de pH externo, o aún a pH bajos en presencia de K^+ , da lugar a una alcalinización del citoplasma, como resultado neto de la acumulación de bicarbonato (Peña y cols., 1969, 1972). Resulta entonces que la ATPasa es más bien la responsable de los cambios, más que la reguladora del pH interno.

La regulación del pH interno requiere de un mecanismo que evite una exagerada alcalinización en presencia de glucosa, tanto a un pH alto del medio, como en presencia de K^+ .

Al respecto, se ha propuesto que hay un intercambiador H^+/K^+ que tiene la función de expulsar al catión monovalente a cambio de H^+ y así evitar la alcalinización exagerada del citoplasma (Ramírez y cols., 1998). Otros grupos han propuesto intercambiadores con función semejante como el considerado originalmente Na^+/H^+ , codificado por el gen *Nah1* (Bañuelos y cols., 1998). Se ha identificado otro intercambiador semejante en el interior celular (Nass y Rao, 1998). No obstante, el problema está todavía lejos de resolverse.

Los sistemas de transporte del K^+

Los estudios cinéticos que se han realizado sobre el transporte de K^+ indican que se trata de un sistema complejo, porque varios factores importantes como el potencial de membrana y el pH del medio, entre otros, influyen directamente. Rothstein y Bruce (1958), Conway y Duggan (1958); demostraron que el transporte de K^+ obedece a una cinética de saturación del tipo Michaelis-Menten, lo cual indica la participación de un sistema de transporte. También Armstrong y Rothstein (1967) encontraron una cinética de competencia entre los distintos

cationes monovalentes, lo cual indica que aún el Na^+ entra a la célula por el mismo transportador que el K^+ .

El grupo de Borst-Pauwels (1973), encontró también una estimulación del transporte de cationes monovalentes por influencia de otros iones en el medio de incubación, pero a concentraciones muy pequeñas. A partir de estos estudios, Haro y Rodríguez-Navarro (2002), propusieron un modelo para el transportador del potasio, en el que el transportador introduce los iones de dos en dos. En 1984, Rodríguez-Navarro y Ramos observaron que la cinética del transporte varía significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento y ensayo. En un sistema con células en crecimiento, la situación es más compleja, porque se manifiestan dos sitios de interacción o dos sistemas de transporte diferentes (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986), uno de baja afinidad que se expresa en levaduras cultivadas a concentraciones relativamente altas de K^+ , con una K_m de 2 mM, y otro de alta afinidad con una K_m de 20 μM , que se presenta cuando la concentración de K^+ en el medio de crecimiento se reduce a 5 mM.

Estos sistemas de transporte no sólo difieren en su cinética, sino también en su dependencia del pH y de la temperatura, sensibilidad a desacoplantes y respuesta a cambios del ATP. La existencia de estos dos sistemas de transporte se confirmó al clonar y secuenciar los genes correspondientes, *TRK1* y *TRK2* y obtener las mutantes respectivas (Ko y cols., 1990; Ko y Gaber, 1991).

Serrano y Rodríguez-Navarro (2001), clonaron y secuenciaron el gen de la ATPasa de H^+ , tipo P, codificada por *PMA1* (Fig. 1, No. 1) que energiza la membrana plasmática, creando un potencial transmembranal que probablemente varía entre -100 y -250 mV y un gradiente de pH hasta de 2-4 unidades. El potencial de membrana impulsa la captación de K^+ vía los transportadores *Trk1p* y *Trk2p* (Fig. 1, No. 2) y por canales no selectivos de cationes de Na^+ y K^+ , lo cual se confirmó en plantas, pero no en las levaduras (Fig. 1, No 3). El Na^+ es expulsado por otra ATPasa tipo P codificada por el gen *ENA1* (Fig. 1, No. 4) y por los antiportadores electroneutros codificados por *Nha1* (Fig. 1, No. 5). La compartimentalización vacuolar del Na^+ parece estar mediada por un antiportador Na^+/H^+ , codificado por el gen *NHX1* (Fig. 1, No. 6), energizado por el gradiente de pH desarrollado por la H^+ -ATPasa vacuolar de tipo V, codificada por el gen *VMA1* (Fig. 1, No. 7). Además se ha caracterizado un canal rectificador de K^+ (*Tok1p*) que promueve la salida del mismo catión (Fig. 1, No. 8) (Bertl y cols., 1993).

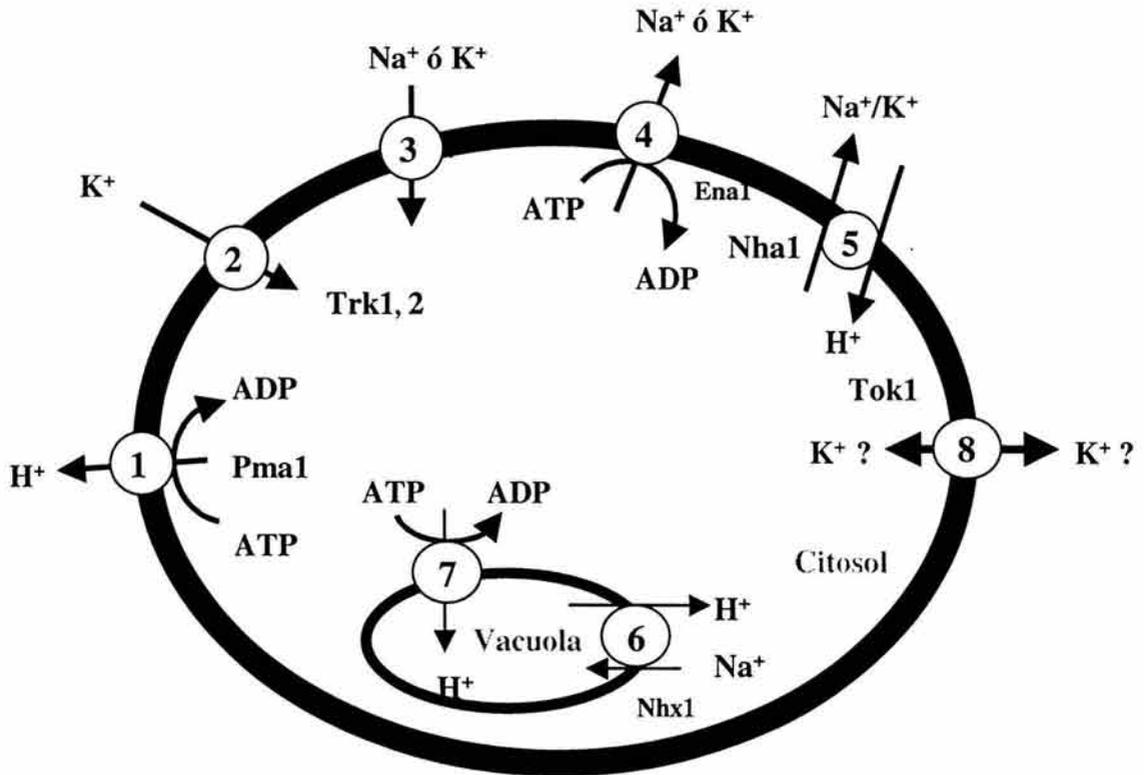


Figura 1.- Sistemas de transporte involucrados en el transporte de K⁺ en la levadura (tomado y modificado de Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001).

Armstrong y Rothstein (1964), Haro y Rodríguez-Navarro (2001) han propuesto que el transporte de Na⁺ en levaduras se puede llevar a cabo por los sistemas de transporte que utiliza el K⁺; Niu *et. al*; (1995) (Fig. 2, No. 1), además, describen la posible existencia de mecanismos que actúan cooperativamente para eliminar la acumulación de este catión en el citoplasma, el primero es la restricción total del transporte de Na⁺ (Fig. 2, No. 2), el segundo es la presencia de dos

sistemas de transporte que regulan la salida activa de este catión por medio de la ATPasa de Na^+ ó K^+ (Fig. 2, No. 3) o el antiportador Na^+/H^+ ó K^+/H^+ (Fig. 2, No. 4), finalmente, la compartimentalización del Na^+ en la vacuola es catalizada por el antiportador Na^+/H^+ (Fig. 2, No. 5).

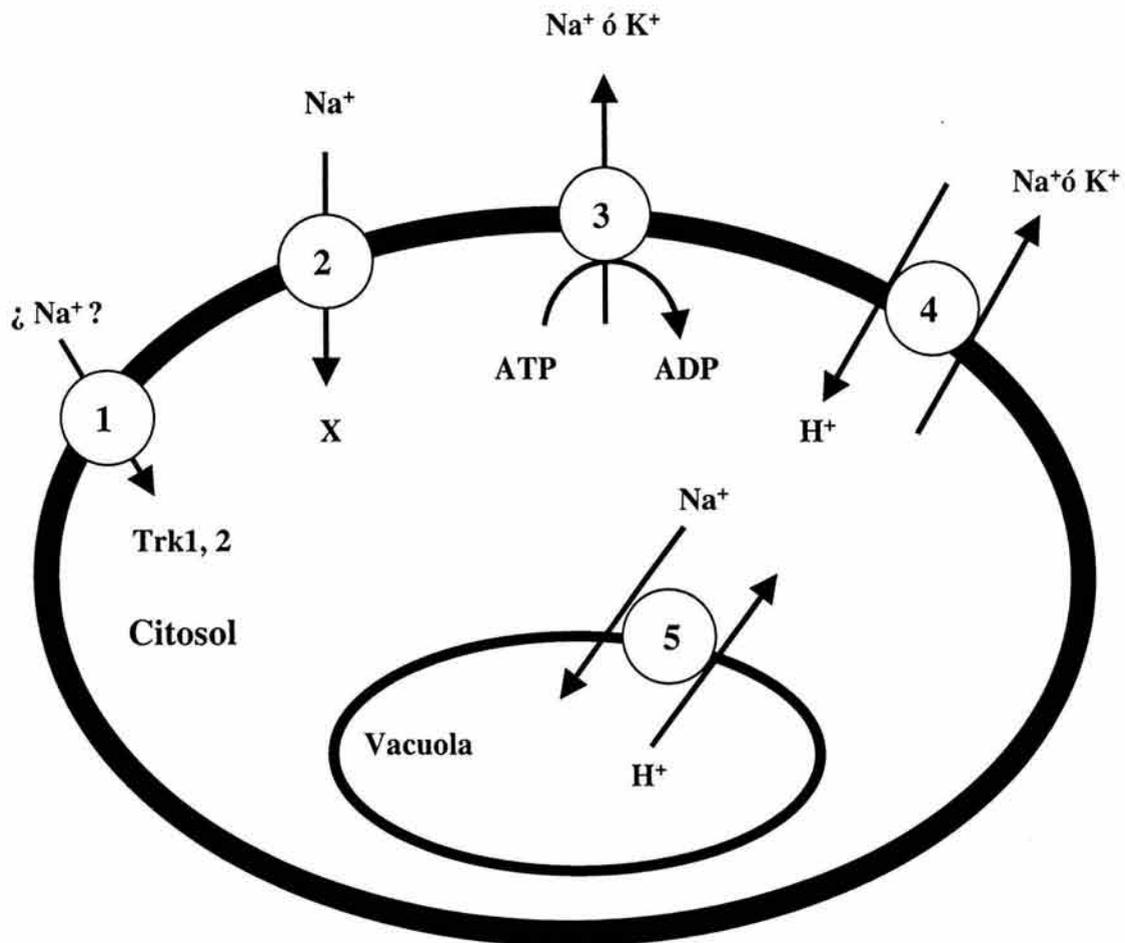


Figura 2.- Sistemas de transporte involucrados en el transporte de Na^+ en las levaduras (Niu y cols., 1995).

Debaryomyces hansenii

D. hansenii es una levadura halofílica que además de concentraciones elevadas de sal en el medio, resiste el pH alcalino en el medio de crecimiento o de incubación (Norkrans, 1968) sin alteración de sus principales funciones, la respiración y la fermentación (Neves y cols., 1997). Norkrans y Kylin (1969) la estudiaron y encontraron que puede acumular concentraciones elevadas de Na^+ . Además, puede realizar intercambios rápidos de Na^+ por K^+ . Aunque sus propiedades fueron estudiadas con la metodología de hace muchos años, y sólo por algunos grupos, existe cada día mayor interés en ella, con miras a eventualmente producir halotolerancia en otros organismos, incluyendo las plantas.

Para estudiar los mecanismos de adaptación de un organismo halofílico, se deben definir los que utiliza para contender con la alta osmolaridad de su habitat. En *D. hansenii*, uno de ellos, consiste en la síntesis y acumulación de moléculas orgánicas pequeñas, denominados solutos compatibles como glicerol, arabinitol (Norkrans y Kylin, 1969), cuya función consiste en restaurar la turgencia intracelular, proteger a las enzimas y estabilizar las membranas. Sin embargo, esta levadura, también tiene la capacidad de acumular grandes concentraciones de cationes monovalentes, tanto K^+ , como Na^+ .

Hobot y Jennings (1981) reportaron que *D. hansenii* es capaz de crecer más rápido que *S. cerevisiae* en presencia de altas concentraciones de Na^+ o en un medio alcalino. Sin embargo, el pH bajo (5.2) disminuye el crecimiento celular de ambas levaduras (Hobot y Jennings, 1981).

Prista y cols. (1997), encontraron que *D. hansenii* crece mejor en presencia de cantidades moderadas de Na^+ , y también que el transporte de $^{86}\text{Rb}^+$, en forma un tanto paradójica, aumenta con concentraciones moderadas de Na^+ en el medio. Estas levaduras, además, tienen interesantes sistemas de transporte e intercambio de iones (Thomé-Ortiz y cols., 1998).

Thomé-Ortiz y cols. (1998) reportaron que el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en *D. hansenii* ocurre por un mecanismo de difusión, pero esos resultados fueron obtenidos usando bajas concentraciones de ese catión, lo cual representa la parte lineal del fenómeno de transporte debido a la baja afinidad del sistema de transporte para este catión.

No obstante, existe poca información sobre la razón o razones por las cuales esta levadura puede crecer en medios con un valor elevado del pH y altas concentraciones de sales de NaCl y KCl; se presumen sus fuentes de energía, dado que se trata de una levadura con poca capacidad

de fermentación y mayor respiración que *S. cerevisiae*. Es por esta razón que hemos planteado la posibilidad de estudiar los sistemas de transporte de sodio y potasio. Esta levadura puede ser de extraordinaria importancia en el estudio de los mecanismos de la halotolerancia de los organismos vivos. La tendencia actual en los estudios busca llegar a una estrategia en el largo plazo a producir plantas resistentes a concentraciones elevadas de sal, y ha consistido en buscar mutantes de *S. cerevisiae* con este fenotipo (Adler y cols., 1985), con miras, tanto a identificar los genes implicados, como eventualmente y a partir de ellas, obtener transformantes halotolerantes de plantas. Sin embargo, se cree que sería posible obtener, a partir de una genoteca de una levadura normalmente resistente a sal, mutantes para otras levaduras, como *S. cerevisiae*, con las cuales, a su vez fuera posible transformar plantas y obtener cepas halotolerantes de ellas. Este sistema pudiera llegar a tener aplicaciones importantes en la agricultura, para producir plantas de valor comercial que resistan altas concentraciones de sales y que estas mismas se puedan cultivar en suelos con estas características.

Tomando en cuenta todos estos antecedentes, nuestro trabajo principal de investigación durante el doctorado se centró en evaluar las características del transporte del sodio y potasio en *D. hansenii*., de acuerdo con lo siguiente:

Hipótesis

- *D. hansenii* cuenta con sistemas particulares de transporte de H^+ o cationes que le permiten mantener las concentraciones de iones de forma dinámica, como base de la halotolerancia.

Objetivo general

- Caracterizar y definir la posible participación de distintos transportadores en la halotolerancia de *D. hansenii*.

Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones internas de Na^+ y K^+ de *D. hansenii* en diferentes condiciones de crecimiento y de incubación.
- Evaluar la capacidad de expulsión e intercambio de iones en *D. hansenii* cultivada en diferentes condiciones.
- Definir las constantes cinéticas del transporte de $^{86}Rb^+$ y $^{22}Na^+$ en distintas condiciones de cultivo y de incubación después del cultivo.

PARTE I

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa Y7426 de *D. hansenii* se obtuvo del Departamento de Agricultura de Peoria, IL; *D. hansenii*, cepa J26 y *D. hansenii*, cepa CBS1793 nos fueron proporcionadas amablemente por L. Adler y H. Sychrová, respectivamente. *S. cerevisiae* levadura para panadería se obtuvo localmente (La Azteca S. A.); *S. cerevisiae* Active dry yeast (ADY) se obtuvo de SIGMA (St. Louis Mo., USA, Cat. No. YSC-2); el procedimiento de rehidratación se realizó según Peña y cols. (1992). Las levaduras se mantuvieron en cajas que contenían medio YPD (1% extracto de levadura, 1% bacto-peptona y 2% de glucosa como fuente de carbono y 2% agarosa). Los medios de cultivo se sembraron con preinóculos de 100 ml en medio YPD sin sal (C) y con 0.6 M (Na06 o K06); 1 M (Na1 o K1); 2 M (Na2 o K2); y 3 M (Na3 o K3) de NaCl o KCl, respectivamente. Los inóculos fueron cultivados a 30 °C durante 24 hrs. en un agitador magnético a 250 r. p. m. Las células se cultivaron en condiciones similares pero durante 36 h y en un volumen de 500 ml y se colectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada, para ser resuspendidas en agua a una concentración final de 0.5 g/ml y mantenerlas en hielo durante el curso del mismo día para realizar los experimentos correspondientes. Algunos experimentos se realizaron ayunando las células toda la noche durante 14 h en agitación en un volumen de 250 ml de agua estéril y en agitación. Al término de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces, para ser resuspendidas en agua a una concentración final de 0.5 g/ml.

Crecimiento celular

El crecimiento se determinó registrando los cambios de absorbencia a 600 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu modelo UV-160A.

Determinación del contenido intracelular de potasio y sodio

Las células se centrifugaron y se resuspendieron en agua destilada y desionizada y se pusieron en un baño a ebullición (92°C) durante 15 min. Después de enfriar, la suspensión se

centrifugó y se utilizaron diluciones apropiadas del sobrenadante para medir el K^+ en un fotómetro de flama. También se midió el K^+ incubando 50 mg de células con 1 ml de 2 mM de CTAB durante 15 minutos y centrifugando 30 segundos. Las muestras para los dos métodos empleados se diluyeron 1:10 con agua desionizada y se determinó el contenido de potasio y sodio en un fotómetro de flama Carl Zeiss PF5 37177, calibrado a 0 con agua desionizada y a 100 con una solución 1 mM de KCl ó NaCl.

Las concentraciones internas de los iones se cuantificaron después de medir los valores del agua interna, que se determinaron midiendo la distribución de los isótopos radioactivos (^{14}C -Sacarosa y 3H_2O). Esta distribución se determinó en el sobrenadante obtenido de 500 μ l de células (0.5 g/ml), suponiendo la distribución uniforme de 3H_2O en la célula. Los valores internos de agua obtenidos para *D. hansenii* son los siguientes: células cultivadas en YPD = 44 %, Na06 y Na1 = 35 %, K06 = 44 %, K1 = 39 %. El contenido interno de agua de *S. cerevisiae* es de 47% (Peña y cols., 1967).

Sodio y potasio extracelulares

La salida de los cationes se midió en el medio de incubación, después de incubar las células (250 mg) en medio MES-TEA, 20 mM (pH 6) ó BICINA-TEA, 20 mM (pH 8), glucosa 50 mM, en un volumen final de 5.0 ml, a 30° C. La suspensión fue centrifugada y se obtuvo el sobrenadante para determinar el Na^+ y el K^+ en un fotómetro de flama Carl Zeiss PF5 37177, calibrado a 0 con agua desionizada y a 100 con una solución 1 mM de KCl o NaCl.

Intercambio de cationes radioactivos

Las células de *D. hansenii* (Y7426) (1 gramo) se incubaron toda la noche (14 hrs), en 12 ml de agua estéril, que contenía 50 mM $^{22}NaCl$ o 50 mM $^{86}RbCl$; a la mañana siguiente se centrifugaron y lavaron dos veces con agua, resuspendiéndose en un volumen de 0.5 g/ml. Después, las células se incubaron a pH 6 (MES-TEA) o pH 8 (BICINA-TEA) en presencia de 50 mM de glucosa. La salida de $^{22}Na^+$ y $^{86}Rb^+$ se determinó en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de KCl ó NaCl (0, 1, 10 y 100 mM), respectivamente. Se tomaron alícuotas de 200 μ l a intervalos de 30 seg; las muestras se filtraron en papel filtro de

nitrocelulosa de un diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$, lavando dos veces con 5 ml de una solución 10 mM KCl. Los filtros fueron secados y colocados en viales de centelleo, se agregó el cocktail de centelleo y la radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS6500.

Transporte de $^{22}\text{Na}^+$ y $^{86}\text{Rb}^+$

Las células (50 mg) fueron incubadas en un amortiguador 20 mM de MES-TEA (pH 6.0) ó 20 mM de BICINA-TEA (pH 8) y 50 mM glucosa. En los experimentos de acumulación de los isótopos, las concentraciones de $^{86}\text{Rb}^+$ o $^{22}\text{Na}^+$ fueron de 20 mM y 40 mM, respectivamente. Para los experimentos de la cinética del transporte de estos iones, se agregaron concentraciones variables de $^{86}\text{Rb}^+$ y $^{22}\text{Na}^+$. Se tomaron alícuotas de $200 \mu\text{l}$ a intervalos de 2 minutos y se filtraron a través de un filtro de celulosa de $0.45 \mu\text{m}$; se lavó dos veces con 5 ml de KCl 10 mM. Los filtros fueron secados y colocados en viales de centelleo, se agregó el cocktail de centelleo y la radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS6500. Para determinar los parámetros cinéticos utilizamos la parte lineal de las curvas de cada condición experimental.

Resultados

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de *D. hansenii* en diferentes condiciones, creciéndolas en YPD (C) y comparándolas con el mismo medio, al cual se le agregó 0.6 y 1 M de NaCl (Na06 y Na1) o KCl (K06 y K1), respectivamente, que se puede considerar como un estrés salino moderado, que se utilizó en todos los experimentos descritos a lo largo de este manuscrito. Con el fin de definir el efecto del estrés salino sobre el crecimiento, se obtuvieron también curvas de crecimiento en presencia de 2 y 3 M de NaCl (Na2 y Na3) o KCl (K2 y K3), respectivamente (**Figura 3**). Los resultados que obtuvimos de estas curvas son los siguientes: la fase logarítmica en YPD persiste hasta las 20 h y en presencia de 0.6 y 1 M de NaCl y KCl tiene una duración aproximada de 15 h; en presencia de 2 y 3 M de las sales, la misma fase tiene una duración de 30 y 70 h, respectivamente. En la **Tabla 1** se muestra que el tiempo de duplicación disminuyó en las concentraciones de 0.6 y 1 M, tanto de KCl como de NaCl, pero se observa más claramente que el tiempo de duplicación disminuye en presencia de 0.6 M de las sales presentes en el medio de cultivo; al aumentar la sal en el medio, se observó que aumentó el tiempo de duplicación.

Se determinó la concentración interna de Na^+ y K^+ en las diferentes condiciones (**Tabla 2**). Se observó la capacidad de *D. hansenii* cultivada en 0.6 y 1 M de NaCl, de acumular concentraciones elevadas de Na^+ y K^+ , mientras que cuando se le cultivó en K^+ sólo mostró altas concentraciones de K^+ .

Para evaluar la existencia de un antiportador de catión/catión (Norkrans y Kylin, 1969), se decidió determinar los cambios de las concentraciones internas de Na^+ y de K^+ durante la incubación de las células cultivadas en medio YPD sin sal y medios que contenían 0.6 y 1 M de KCl o NaCl, respectivamente. Las células crecidas con diversas concentraciones de sal de NaCl o KCl se incubaron en presencia de 1 M de KCl o NaCl, respectivamente, con el catión opuesto y se tomaron muestras cada 4 minutos. Se observó una salida inmediata del catión más abundante acumulado, acompañada por una captación más lenta del catión opuesto; en la **Figura 4 y 5**, el tiempo -4 corresponde a la concentración de Na^+ o de K^+ presente antes de la incubación (**Tabla 2**).

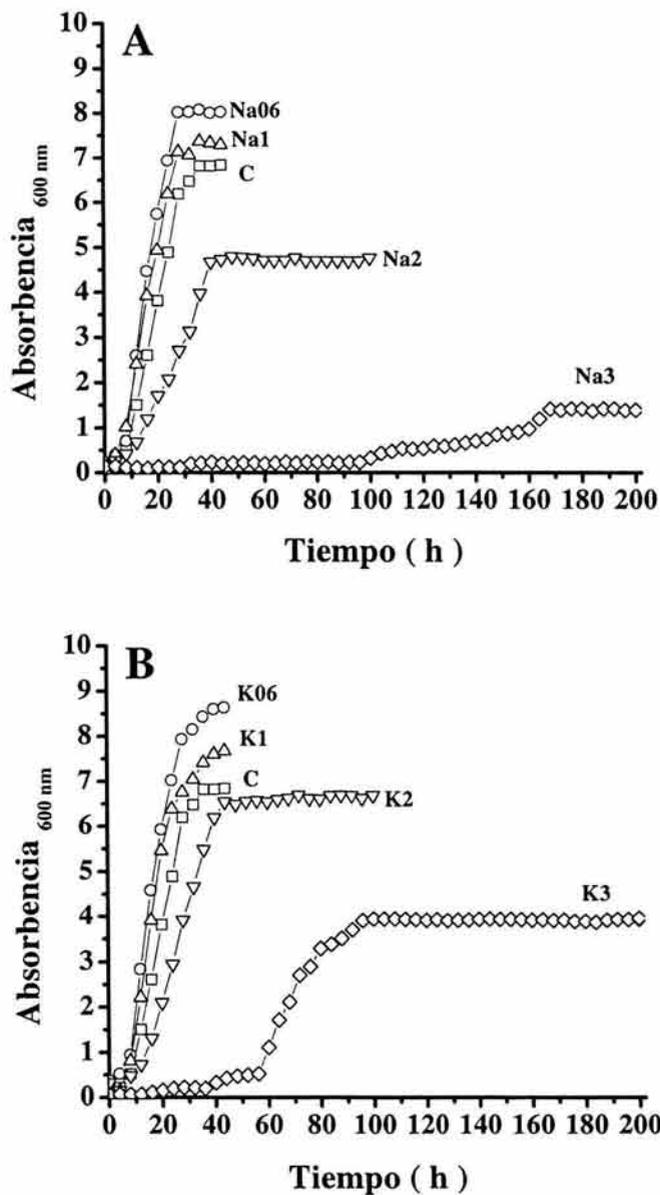


Figura 3.- Curvas de crecimiento de *D. hansenii* cultivada en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de NaCl (A) y KCl (B). Trazos representativos de tres experimentos.

	Tiempo de Duplicación (h)
C	3.46 ± 0.148
Na06	2.77 ± 0.054
Na1	3.10 ± 0.187
Na2	7.04 ± 0.047
Na3	99 ± 0.182
K06	2.51 ± 0.057
K1	2.67 ± 0.076
K2	4.99 ± 0.039
K3	10.22 ± 0.102

Tabla 1.- Tiempos de duplicación de *D. hansenii* cultivada en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de sales, determinados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media ± el error estándar de n = 3.

	C	Na06	Na1	K06	K1
Na ⁺ [mM]	6.77 ± 1.23	143.79 ± 2.61	236.70 ± 7.34	5.93 ± 0.32	4.67 ± 3.23
K ⁺ [mM]	153.08 ± 3.44	108.59 ± 4.78	58.56 ± 7.50	175.84 ± 4.08	186.37 ± 8.66

Tabla 2. Concentración intracelular de Na⁺ y K⁺ en *D. hansenii* cultivada en diferentes condiciones. Después del crecimiento de las células en las concentraciones de sales indicados en las cabezas de cada columna, las células (250 mg), se lavaron dos veces con agua, se resuspendieron en agua e hirvieron en un baño de agua durante 15 minutos; la suspensión se centrifugó y se utilizó el sobrenadante para medir Na⁺ y K⁺ en el fotómetro de flama. Los resultados representan la media ± el error estándar de n = 3.

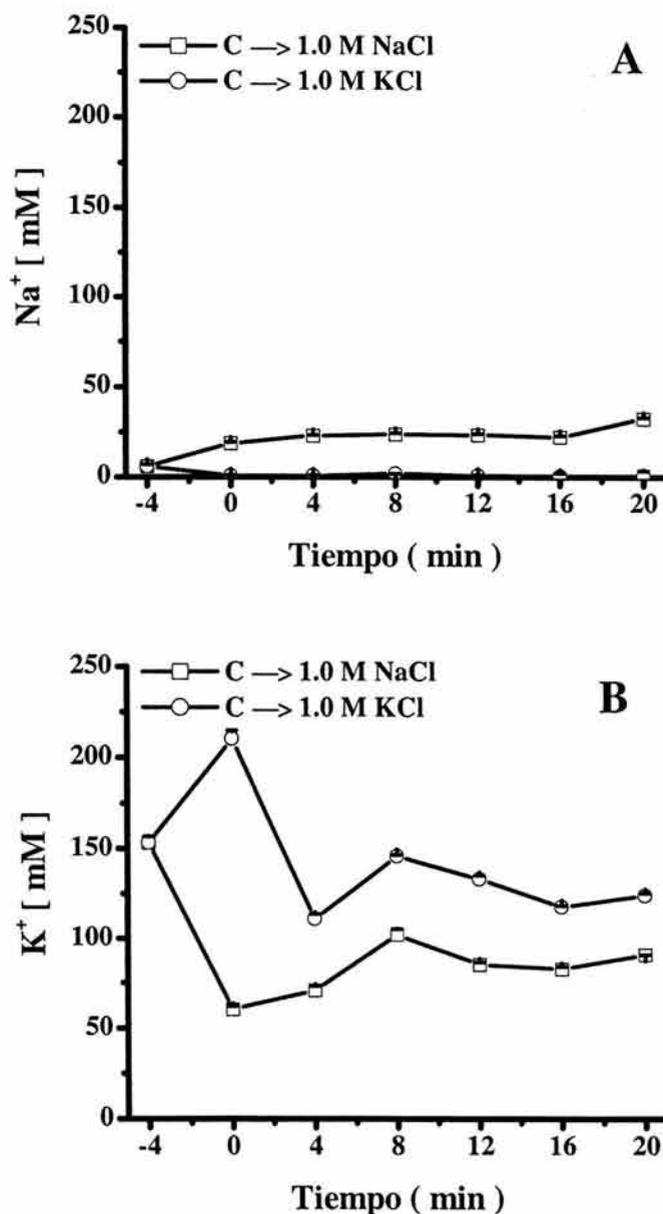


Figura 4.- Cambios en las concentraciones intracelulares de Na^+ y de K^+ de las células crecidas en YPD e incubadas con 1 M de KCl o de NaCl. Se incubaron 0.5 ml de células (2.5 g) crecidas en YPD en 100 ml de una solución de 1 M del KCl o NaCl y 50 mM de glucosa. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 10 ml, que se centrifugaron. Las células se suspendieron en agua e hirvieron 15 minutos en un baño de agua. Las concentraciones de Na^+ (A) y de K^+ (B) se midieron por fotometría de flama en los sobrenadantes después de centrifugar las células. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 3$.

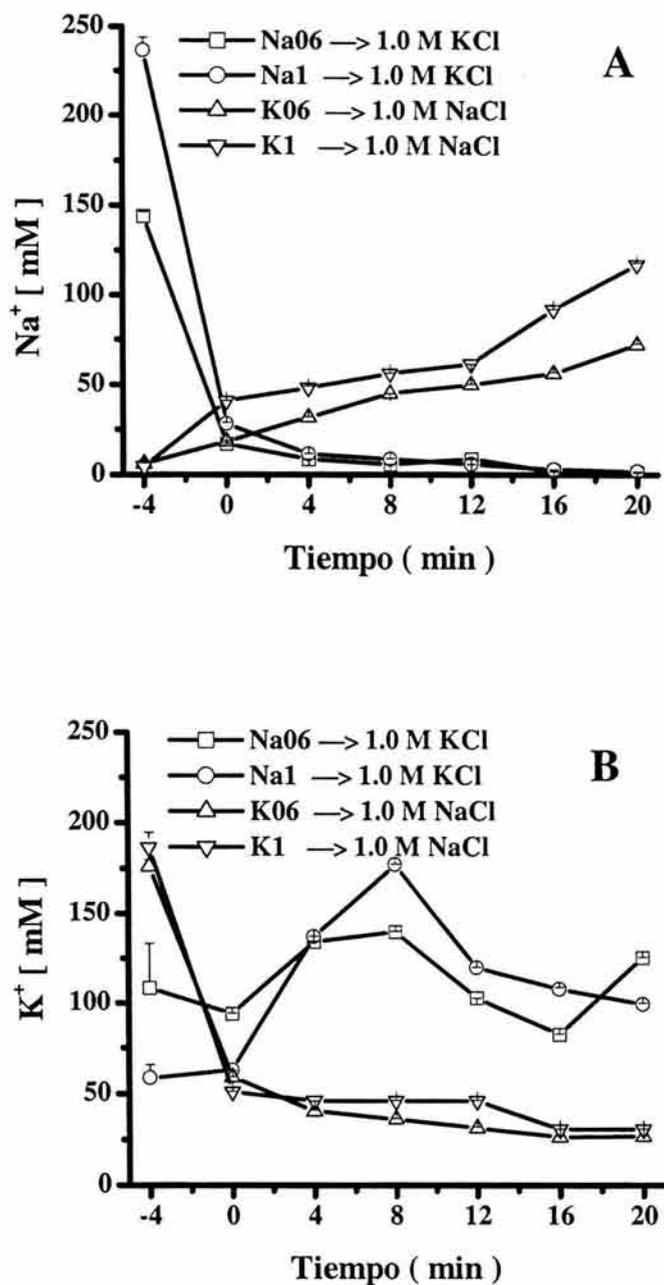


Figura 5.- Cambios en las concentraciones intracelulares de Na⁺ y de K⁺ de las células crecidas en NaCl o KCl y después incubadas en la presencia de 1 M de KCl ó de NaCl, respectivamente. El procedimiento experimental es similar al de la Fig. 4. Los resultados representan la media ± el error estándar de n = 3.

Cuando se incubaron las células cultivadas en medio YPD (**Figura 4A y 4B**) en presencia de 1 M de KCl, mostraron al principio un aumento leve de K^+ , que pronto se estabilizó alrededor de 125 mM, mientras que el Na^+ fue expulsado casi totalmente. Al incubar en presencia de 1 M de NaCl, se observó una salida inmediata de K^+ , alcanzando aproximadamente una concentración de 50 mM, que luego permaneció estable; llegó a acumular hasta 25 mM de Na^+ , que permaneció casi constante. Cuando las células crecidas en NaCl o KCl se incubaron en presencia del catión opuesto (**Figura 5A y 5B**), se observó una salida rápida del Na^+ o el K^+ acumulados, respectivamente. Sin embargo, esta salida del catión predominante no fue compensada por un aumento inmediato equivalente del catión opuesto, que se incorporó a las células lenta y constantemente en el caso de Na^+ , y más rápido en el caso de K^+ .

Esta pérdida rápida de los cationes acumulados también se observó al incubar las células simplemente en solución amortiguadora (pH 6 y pH 8), sin la adición de cationes; en la **Tabla 3** se muestran las concentraciones internas de Na^+ y de K^+ a un pH externo de 6 u 8. En ambos casos las células perdieron muy rápidamente el catión acumulado, ya fuera Na^+ o K^+ . A un pH externo de 8, la salida de ambos cationes fue más pequeña, comparada con pH 6; esta diferencia fue más clara y significativa en la salida de K^+ que en la salida de Na^+ .

Debido a los resultados anteriores sobre la salida rápida del catión predominante dentro de las células, y la entrada lenta del catión opuesto, más rápida para K^+ , estudiamos las características cinéticas de los sistemas del transporte, midiendo las velocidades iniciales del transporte de $^{22}Na^+$ y $^{86}Rb^+$ (como análogo de K^+). Las constantes cinéticas se obtuvieron sólo para las células C, Na06, y K06. Se observó que el transporte de ambos cationes es saturable y ajustable a un solo componente en pH 6 y 8. Los resultados se muestran en las **Figuras 6 y 7**, y pueden resumirse como sigue (**Tabla 4**): a) Los valores de K_m para $^{22}Na^+$ o $^{86}Rb^+$ son similares tanto para las células crecidas en medio con o sin la sal a un pH de 6 o 8, respectivamente; b) Los valores de K_m para el $^{22}Na^+$ fueron alrededor de diez veces mayores que los valores de K_m para el $^{86}Rb^+$ a pH 6, y tres veces mayores a un pH 8; c) Los valores de K_m para ambos cationes fueron mayores a pH 8 que a pH 6; d) es importante que el transporte de $^{86}Rb^+$ ocurrió con una afinidad casi tres veces más a pH 6.0, comparada con pH 8. Para el $^{22}Na^+$, esta diferencia es alrededor del 50%; e) Los valores de V_{max} fueron dos veces y tres veces mayores para las células en los experimentos a pH 8, comparadas con pH 6; f) Es interesante que a pH 6 y 8, los valores de V_{max} no fueron

muy diferentes entre el $^{22}\text{Na}^+$ y $^{86}\text{Rb}^+$; g) Además, con las células crecidas en presencia de 0.6 M de NaCl a un de pH 6 y 8, se observó un aumento de los valores de V_{max} .

	<i>pH Externo (6)</i>			
	EXTERNO [mM]		INTERNO [mM]	
	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺
C	1.46 ± 0.11	0.81 ± 0.05	5.01 ± 0.11	152.19 ± 0.05
Na06	88.53 ± 2.84	0.48 ± 0.03	55.17 ± 2.84	108.02 ± 0.03
Na1	84.32 ± 1.44	0.58 ± 0.02	152.38 ± 1.44	57.92 ± 0.02
K06	4.19 ± 0.31	70.40 ± 1.29	1.78 ± 0.31	105.4 ± 1.29
K1	3.68 ± 0.10	73.33 ± 1.10	0.99 ± 0.10	112.97 ± 1.10
	<i>pH Externo (8)</i>			
	EXTERNO [mM]		INTERNO [mM]	
	Na ⁺	K ⁺	Na ⁺	K ⁺
C	2.7 ± 0.02	14.95 ± 0.02	3.77 ± 0.02	138 ± 0.02
Na06	79.98 ± 1.17	0.48 ± 0.05	63.72 ± 1.17	108.02 ± 0.05
Na1	79.40 ± 0.06	0.41 ± 0.02	157.3 ± 0.06	58.09 ± 0.02
K06	4.8 ± 0.02	50.26 ± 0.05	1.17 ± 0.02	125.54 ± 0.05
K1	4.96 ± 0.05	66.43 ± 0.07	1.01 ± 0.05	119.87 ± 0.07

Tabla 3. Concentración interna y externa de Na⁺ y K⁺ en *D. hansenii* en diferentes condiciones de cultivo. Después del crecimiento, las células (250 mg) se resuspendieron en 20 mM de MES-TEA (pH 6) y BICINA-TEA (pH 8), 50 mM de glucosa (volumen final 5 ml), a 30°C. La suspensión se centrifugó, y se utilizó el sobrenadante para determinar el Na⁺ y el K⁺ en el fotómetro de flama. Los resultados representan la media ± el error estándar de n = 3.

Thomé-Ortíz y cols. (1998), reportaron que el transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en *D. hansenii* ocurre mediante un mecanismo de difusión, pero esos resultados fueron obtenidos usando bajas concentraciones del catión, lo cual representa la parte lineal del fenómeno de transporte debido a la baja afinidad del sistema. Los resultados actuales se obtuvieron usando una mayor escala de la concentración de sustrato, dando una saturación más clara del fenómeno de transporte.

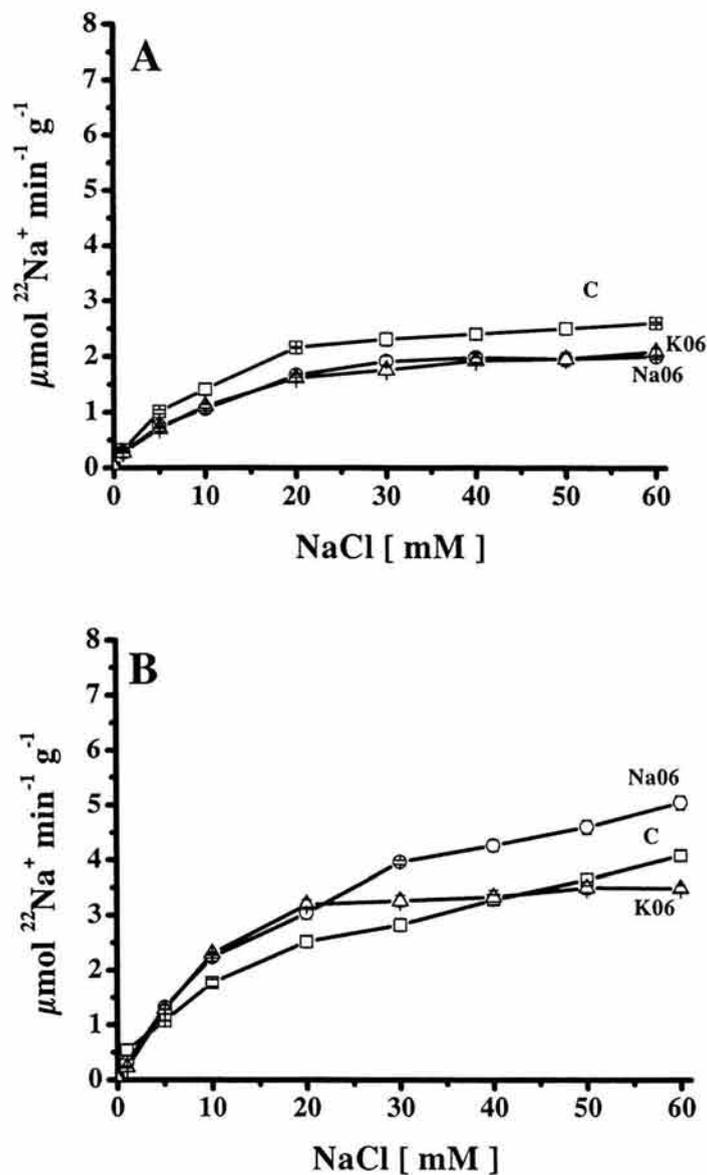


Figura 6.- Cinéticas del transporte de $^{22}\text{Na}^+$ en *D. hansenii* cultivada en YPD, 0.6 M de NaCl o KCl, incubada a pH 6 (A) ó pH 8 (B). Se incubaron 50 mg/ml de las células en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), 50 mM de glucosa (volumen final 2 ml), a 30°C. Después de la incubación se agregaron concentraciones variables de $^{22}\text{NaCl}$; se tomaron alícuotas de 200 μl de la suspensión de células cada 2 min, como se describe en materiales y métodos. Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) se obtuvieron por un método de regresión no lineal. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

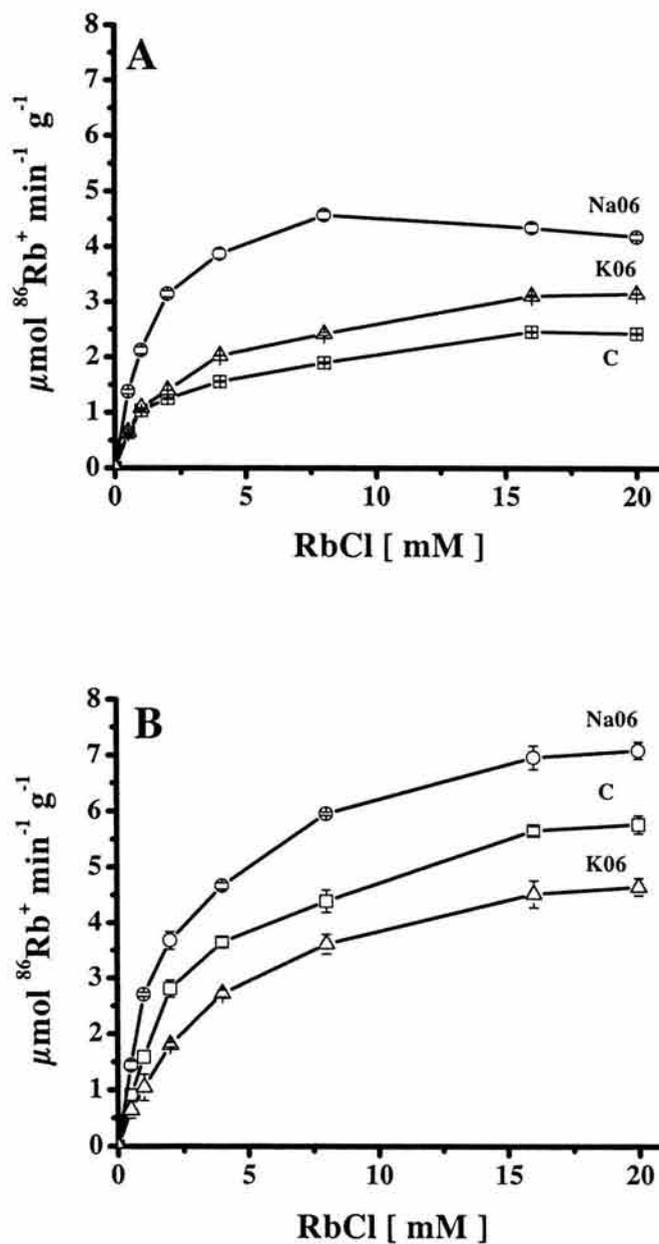


Figura 7.- Cinéticas del transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ en *D. hansenii* cultivada en YPD, 0.6 M de NaCl o KCl, incubada a pH 6 (A) o pH 8 (B). Se incubaron 50 mg/ml de las células en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), 50 mM de glucosa (volumen final 2 ml), a 30°C. Después de la incubación se agregaron concentraciones variables de $^{86}\text{RbCl}$; se tomaron alícuotas de 200 μl de la suspensión de células cada 2 min, como se describe en Materiales y Métodos. Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) fueron obtenidos por un método de regresión no lineal. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

$^{86}\text{Rb}^+$	pH 6		pH 8	
	Vmax	Km	Vmax	Km
C	2.3	1.3	7.5	5.3
Na06	5.0	1.3	9.4	4.0
K06	3.0	1.6	5.9	5.3

$^{22}\text{Na}^+$	pH 6		pH 8	
	Vmax	Km	Vmax	Km
C	3.0	10.6	4.9	15.8
Na06	2.5	12.0	7.4	20.0
K06	2.5	12.0	4.2	12.3

Tabla 4. Parámetros cinéticos del transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ y de $^{22}\text{Na}^+$ a pH 6 y 8 en *D. hansenii*, cultivada en ausencia o la presencia de 0.6 M de NaCl o de KCl. El transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ y de $^{22}\text{Na}^+$ se realizó como se describió en Materiales y Métodos. (Vmax = $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$; Km = mM). Los resultados representan la media \pm el error estándar de n = 6.

Puesto que no se observaron grandes diferencias en los parámetros cinéticos, a excepción de las células crecidas en KCl, se midió luego la capacidad de la acumulación de $^{22}\text{Na}^+$ bajo las distintas condiciones (**Figura 8**). Las células Na06 acumularon concentraciones mayores de este catión, comparadas con C y K06. Este comportamiento fue similar a pH 6 y 8. También se determinó la capacidad de acumulación de $^{86}\text{Rb}^+$ (**Figura 9**); las células Na06 acumularon más $^{86}\text{Rb}^+$ que las células C, y estas más que las células K06, pero este aumento era ligeramente mayor, comparado con el del $^{22}\text{Na}^+$. También se observó que la acumulación de $^{86}\text{Rb}^+$ fue más rápida y mayor a pH 8, comparado con pH 6, en todas las condiciones de cultivo.

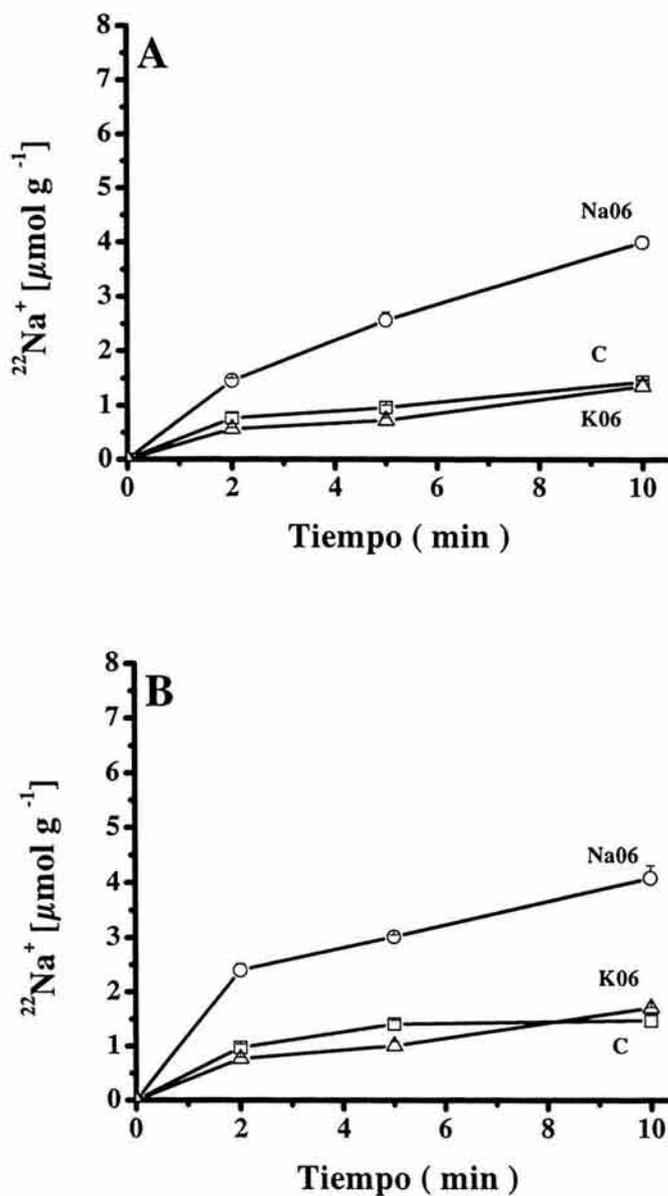


Figura 8.- Acumulación de $^{22}\text{Na}^+$ en *D. hansenii* cultivada en YPD, con 0.6 M de NaCl o KCl incubada a pH 6 (A) ó pH 8 (B). Se incubaron 50 mg/ml de las células en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), 50 mM de glucosa (volumen final 2 ml), a 30°C. Se agregó $^{22}\text{NaCl}$ 40 mM. Se tomaron alícuotas de 200 μl de la suspensión de células en los tiempos indicados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

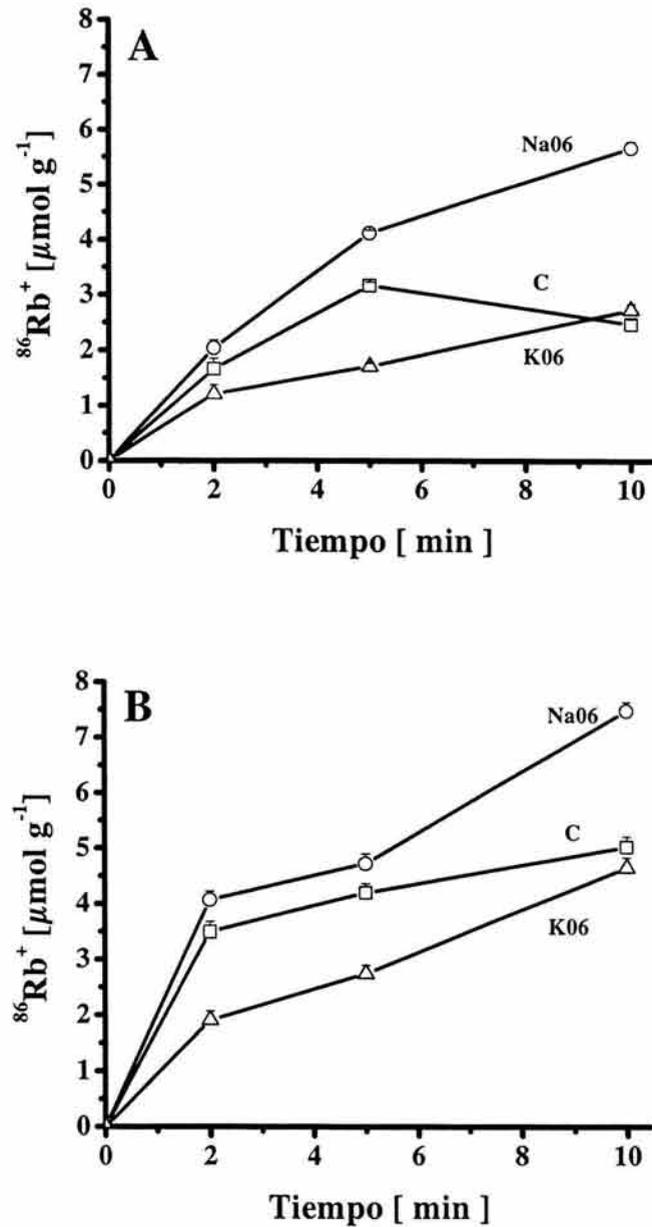


Figura 9.- Acumulación de $^{86}\text{Rb}^+$ en *D. hansenii* cultivada en YPD, con 0.6 M de NaCl o KCl incubada a pH 6 (A) ó pH 8 (B). Se incubaron 50 mg/ml de las células en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), 50 mM de glucosa (volumen final 2 ml), a 30°C. Se agregó 20 mM $^{22}\text{NaCl}$. Se tomaron alícuotas de 200 μl de la suspensión de células en los tiempos indicados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

Se realizaron también experimentos cinéticos para evaluar la competencia de 0 a 48 mM de K^+ contra el transporte de 0.5 a 60 mM de $^{22}Na^+$. Las gráficas mostraron el comportamiento hiperbólico característico de una inhibición no competitiva (datos no mostrados). Las **Figuras 10A y 10B** muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de las células cultivadas en medio YPD (C), respectivamente. Las células crecidas en YPD (C) a pH 6 y 8, y también las crecidas en presencia de las sales (Na06 y K06) mostraron la misma inhibición no competitiva. La **Tabla 5A** presenta las constantes de la inhibición obtenidas. Las células crecidas en YPD (C) mostraron una disminución de la constante de inhibición a partir de 56.5 mM a pH 6, a 41.4 mM a pH 8, y las células Na06 a partir de 71.3 mM a pH 6, a 36.4 mM a pH 8, las células K06 no mostraron a ningún pH cambios significativos en la constante de inhibición (Tabla 5A).

También se realizaron estudios cinéticos para medir la competencia del Na^+ contra el transporte de $^{86}Rb^+$ (**Figura 11A y 11B**). La Figura 11 muestra las gráficas de los dobles recíprocos de las células cultivadas en medio YPD (C) a pH 6 y 8. En los experimentos se midió el transporte de 0.5 a 20 mM $^{86}Rb^+$ en presencia de 0 a 48 mM de NaCl. La inhibición del Na^+ fue también no competitiva en las células C, Se observó una disminución de la constante de inhibición a pH 8, con respecto a pH 6 (72.3 a 27.3 mM). Con las células Na06, no se observó ningún cambio para la constante de la inhibición, y para las células K06 sólo una ligera disminución de la K_i para Na^+ de 42.7 a 33.8 mM (**Tabla 5B**).

Para investigar la posible existencia de un intercambiador K^+/Na^+ (Norkrans, 1968; Norkrans y Kylin, 1969; Thomé y cols., 1998); se determinó la salida de $^{22}Na^+$ y de $^{86}Rb^+$ (pH 6 y pH 8) en presencia de KCl y de NaCl, respectivamente (0, 1, 10, 100 mM). En las **Figuras 12 y 13** sólo se muestra la salida de $^{22}Na^+$ y de $^{86}Rb^+$ a pH 6, pero a pH 8 se observó un comportamiento de captación y expulsión de iones similar a pH 6, respectivamente. Las células cultivadas en presencia de las sales (Na06 y K06), durante la incubación (14 h) acumularon más $^{86}Rb^+$, en comparación con $^{22}Na^+$, las células incubadas con $^{22}Na^+$ después de las diversas condiciones de crecimiento de las células (C, Na06 y K06), no mostraron diferencias. Las células crecidas en la presencia de sales (Na06 y K06), acumularon aproximadamente el doble de $^{86}Rb^+$, en comparación con las células cultivadas en YPD (C). Después de cargar las células durante una noche, se evaluó la salida del isótopo radioactivo acumulado, en ausencia o en la presencia de diversas concentraciones del KCl y del NaCl (0, 1, 10, 100 mM); la salida fue rápida y similar en todas las condiciones experimentales (**Figuras 12 y 13**).

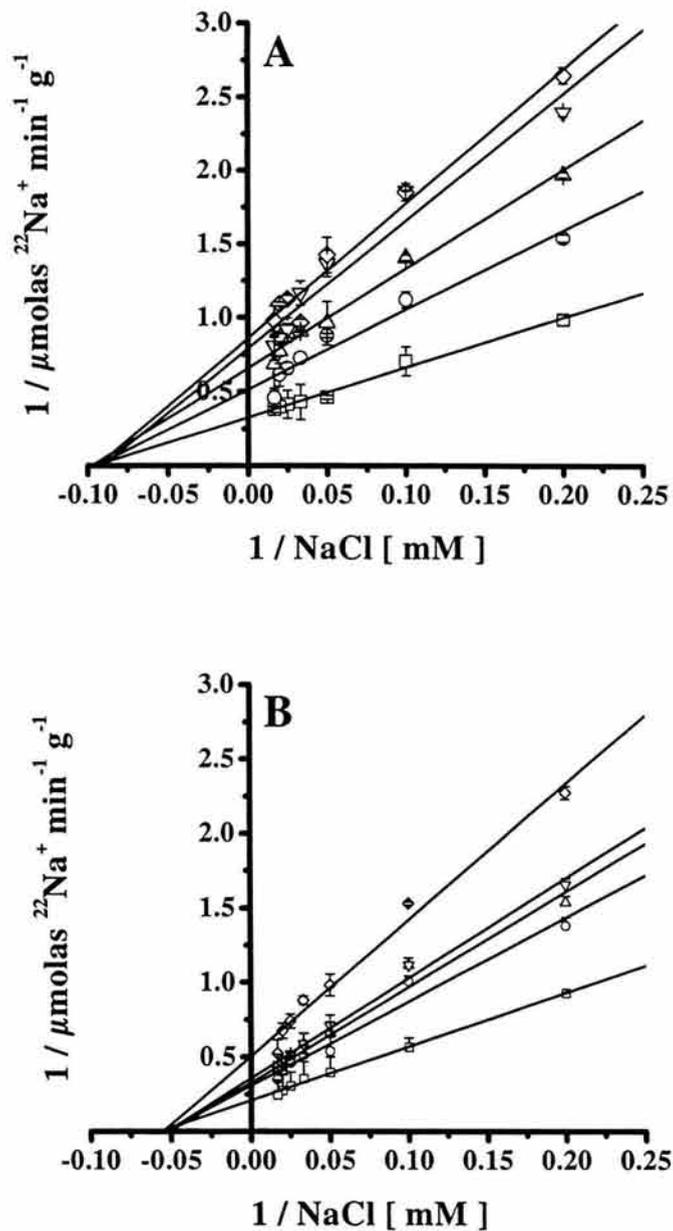


Figura 10.- Cinéticas de la inhibición del transporte $^{22}\text{Na}^+$ por K^+ a pH 6 (A) o pH 8 (B) en *D. hansenii* cultivada en YPD. Se incubaron 50 mg/ml de las células cultivadas en YPD en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), a 30°C (volumen final 2 ml). Se agregaron concentraciones variables de KCl: \square = control; \circ = 1 mM; \triangle = 12 mM; ∇ = 24 mM; \diamond = 48 mM of KCl. Se tomaron alícuotas de 200 μl , que se filtraron y lavaron con 10 ml de KCl, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

A	pH 6	pH 8
	Ki [mM]	Ki [mM]
C	56.5	41.4
Na06	71.3	36.4
K06	56.3	52.5

B	pH 6	pH 8
	Ki [mM]	Ki [mM]
C	72.3	27.3
Na06	35.6	35.6
K06	42.7	33.8

Tabla 5. Parámetros cinéticos de inhibición del transporte de $^{22}\text{Na}^+$ (A) y $^{86}\text{Rb}^+$ (B) en *D. hansenii* cultivada en diferentes condiciones experimentales e incubada a pH 6 y 8. Se analizó la competencia de 0 a 48 mM de KCl, contra el transporte de 0.5 a 60 mM de $^{22}\text{Na}^+$. También se estudió la competencia del NaCl para el transporte de 0.5 a 20 mM de $^{86}\text{Rb}^+$ en la presencia de 0 a 48 mM de NaCl. Los experimentos se realizaron a pH 6 (20 mM MES-TEA) o pH 8 (20 mM BICINA-TEA), 50 mM de glucosa. Se tomaron alícuotas de 200 μl , que se filtraron y lavaron tres veces con 10 ml de KCl, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

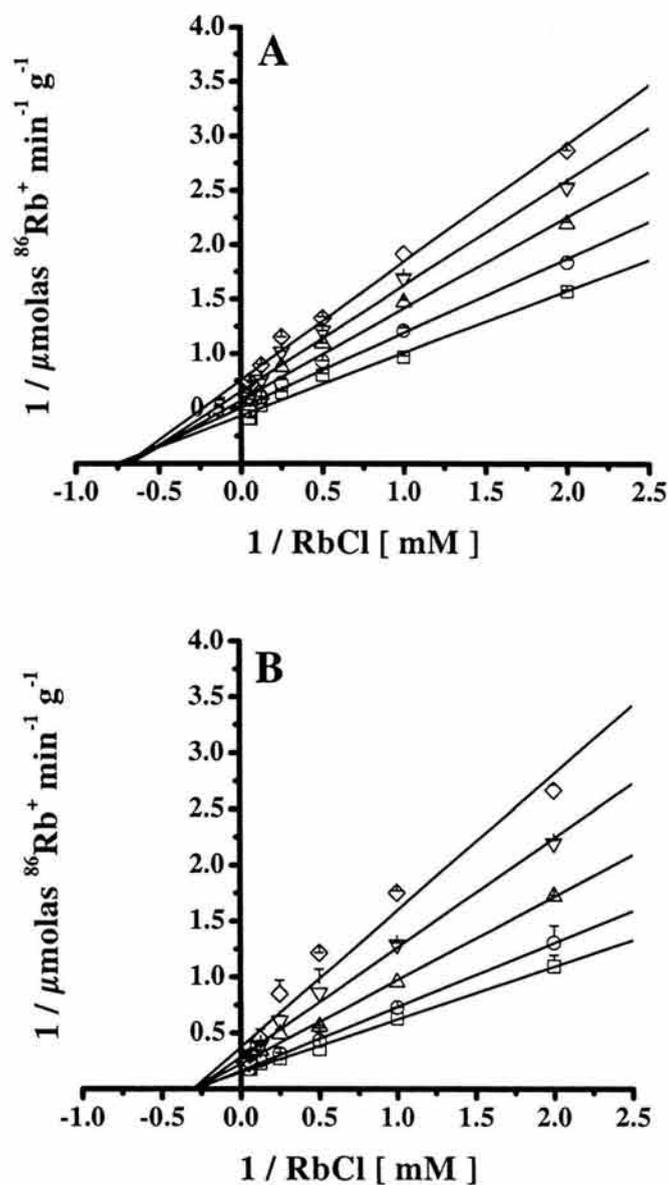


Figura 11.- Cinéticas de la inhibición del transporte $^{22}\text{Na}^+$ por K^+ a pH 6 (A) ó pH 8 (B) en *D. hansenii* cultivada en YPD. Se incubaron 50 mg/ml de las células en 20 mM de MES-TEA (pH 6) ó BICINA-TEA (pH 8), a 30°C (volumen final 2 ml). Se agregaron concentraciones variables de KCl : \square = control; \circ = 1 mM; \triangle = 12 mM; ∇ = 24 mM; \diamond = 48 mM of KCl . Se tomaron alícuotas de 200 μl , que se filtraron y lavaron tres veces con 10 ml de KCl , tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

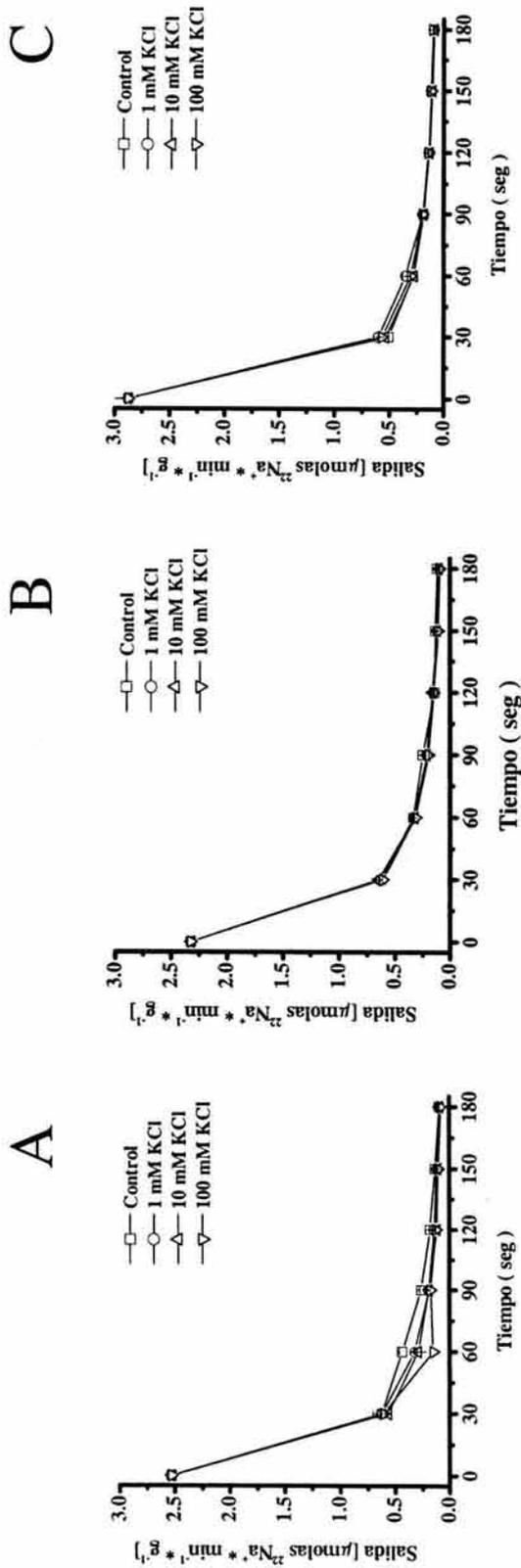


Figura 12.- Salida de $^{22}\text{Na}^+$ en *D. hansenii* cultivada en diferentes condiciones de crecimiento (A = YPD, B = Na06 y C = K06); incubada en presencia de diferentes concentraciones de KCl, a pH 6. Se incubaron 50 mg/ml de las células cultivadas en las diferentes condiciones de crecimiento en 20 mM de MES-TEA (pH 6), a 30°C (volumen final 2 ml). Concentraciones variables de KCl fueron agregadas: \square = control; \circ = 1 mM; \triangle = 10 mM; ∇ = 100 mM. Alícuotas de 200 μl fueron tomadas y filtradas con 10 ml de KCl, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

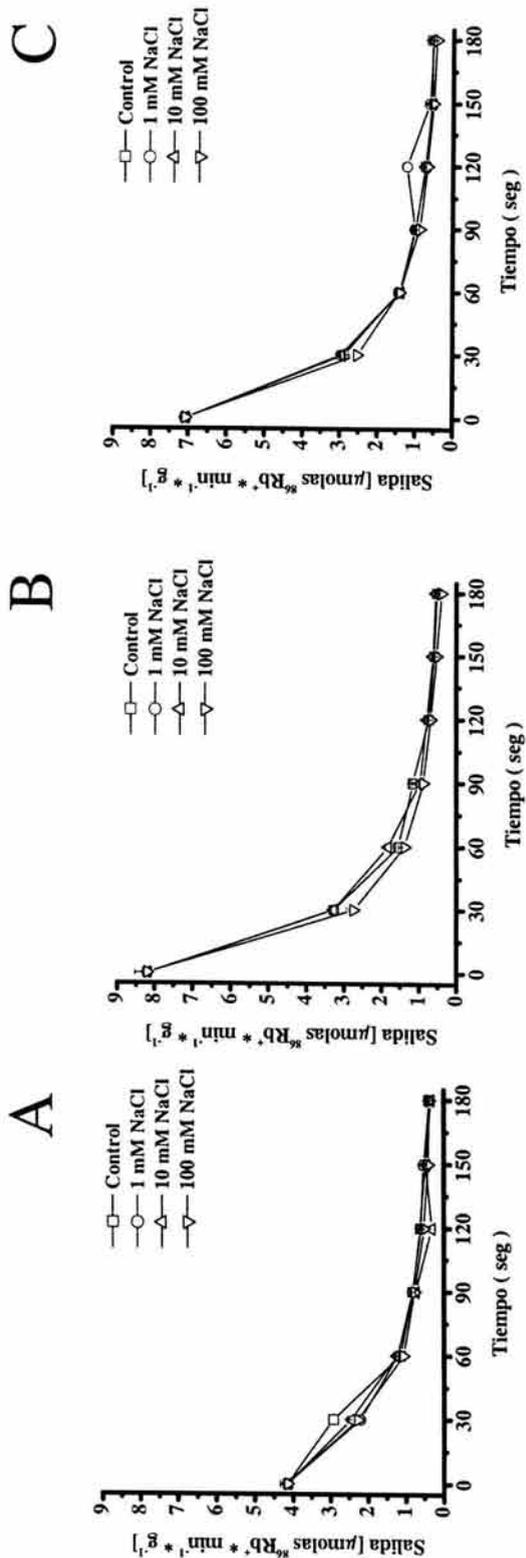


Figura 13.- Salida de $^{86}\text{Rb}^+$ en *D. hansenii* cultivada en diferentes condiciones de crecimiento (A = YPD, B = Na06 y C = K06); incubada en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, a pH 6. Se incubaron 50 mg/ml de las células cultivadas en las diferentes condiciones de crecimiento en 20 mM de MES-TEA (pH 6), a 30°C (volumen final 2 ml). Concentraciones variables de KCl fueron agregadas: \square = control; \circ = 1 mM; \triangle = 10 mM; ∇ = 100 mM. Alícuotas de 200 μl fueron tomadas y filtradas con 10 ml de KCl, tal como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan la media \pm el error estándar de $n = 6$.

Discusión de resultados

Nuestros resultados confirman datos reportados anteriormente (Thomé et al., 1998) en el sentido que *D. hansenii* crece mejor en la presencia de un estrés salino moderado 0.6 M de NaCl ó de KCl que en ausencia o en una concentración más alta de la sal, conviniendo que *D. hansenii* se puede considerar como una levadura halófila moderada (Prista et al., 1997). Este crecimiento se acompañó de la acumulación de altas concentraciones de K^+ y de Na^+ en las células cultivadas en presencia de esta sal, indicando que el mecanismo de la adaptación no implica una capacidad particular de expulsar el Na^+ ; muy probablemente existe una resistencia intrínseca a los efectos tóxicos de este catión, no observados en otras levaduras, particularmente *S. cerevisiae*. Es también posible que esta levadura acumule el Na^+ y lo compartimentalice en la vacuola.

También es interesante que las células no pueden mantener en el citoplasma las altas concentraciones de los cationes acumulados durante el crecimiento. Al incubarlas con o sin el catión opuesto, perdieron rápidamente una buena parte del catión acumulado durante el crecimiento, y la acumulación simultánea del catión opuesto fue mucho menor, y más lenta. Norkrans y Kylin (1969) propusieron que para eliminar, particularmente al Na^+ , existe un posible intercambiador para K^+ como mecanismo. Este no parece ser el caso, puesto que la salida de Na^+ ó K^+ acumulado durante el crecimiento fue mucho mayor y más rápida para ambos cationes, que la entrada del catión opuesto. Estos resultados permiten sugerir que esta levadura puede tener un canal iónico que permite la salida rápida de cualquier catión acumulado durante el crecimiento en la presencia de altas concentraciones de cationes monovalentes. También, aunque no se puede eliminar la existencia de un intercambiador de K^+/Na^+ , éste parece no ser el mecanismo principal de la salida, porque la salida se observó también en ausencia del catión opuesto. Este canal propuesto de cationes, también parece ser no específico, puesto que promueve una salida similar de ambos cationes. Aunque no puede eliminarse la existencia de un intercambiador H^+ /catión, la magnitud de los cambios parece favorecer la existencia de un canal iónico.

También los experimentos realizados con las células cargadas con $^{22}Na^+$ o $^{86}Rb^+$ demostraron que, al incubar con concentraciones variables de Rb^+ o Na^+ (el catión opuesto), no se observó el aumento esperado de la salida del catión radiactivo por la presencia del opuesto, y la salida fue rápida, y prácticamente similar en ausencia o presencia de concentraciones variables del catión opuesto.

Debe precisarse que al mismo tiempo que ocurre la salida, los sistemas de la captación funcionan para capturar el o los cationes presentes en el medio. Dado que el sistema para el transporte del catión tiene una afinidad mucho más alta para K^+ , este catión se incorpora a las células más rápido que el Na^+ . Es por ello que las células crecidas en la presencia del KCl e incubadas en la presencia del NaCl continuaron lentamente perdiendo K^+ y acumulando menos sodio que el K^+ perdido, probablemente porque el Na^+ se incorporaba lentamente en las células a través del uniportador. En las células crecidas en NaCl e incubadas en la presencia de K^+ , el fenómeno era similar, pero en este caso la entrada de K^+ fue más rápida y mayor, debido a la mayor afinidad del uniportador monovalente del transporte hacia el K^+ . Esto se apoya en los parámetros cinéticos obtenidos para el transporte de $^{22}Na^+$ o de $^{86}Rb^+$, que mostraron una afinidad mucho mayor para este último; debe considerarse que aunque el Rb^+ suele utilizarse como análogo del K^+ , su afinidad para muchos sistemas biológicos, incluyendo el sistema del transporte del catión del *S. cerevisiae* es alrededor de la mitad de la del K^+ (Armstrong y Rothstein, 1964).

Es importante mencionar que en este trabajo, se encontró que el transporte de $^{22}Na^+$ es saturable, y no tiene lugar por difusión, según lo reportado antes (Thomé-Ortíz y cols., 1998); la razón radica en que en los experimentos reportados por Thomé-Ortíz y cols. (1998), se utilizaron concentraciones bajas del catión, dentro de la parte lineal del fenómeno de transporte debido a la baja afinidad del sistema de transporte para este catión, y ello proporcionó la idea falsa que el transporte de este catión ocurre por una difusión simple.

Los valores respectivos de la K_m para el transporte de $^{22}Na^+$ o de $^{86}Rb^+$ no mostraron cambios grandes dependientes de las condiciones del crecimiento de las células, indicando que en todos los casos el sistema del captación seguía siendo igual, los cambios observados en la captación de Na^+ o de K^+ se debe probablemente al número de los uniportadores presentes en la membrana plasmática de la célula. Otro aspecto importante es que, en *S. cerevisiae*, los valores de K_m para la captación de K^+ no mostraron cambio de pH 5 a 8 (Armstrong y Rothstein, 1964), mientras que en nuestros experimentos los valores de K_m para $^{86}Rb^+$ mostraron un aumento casi tres veces de pH 6 a 8. Este cambio fue menor, pero aún reproducible para la captación del $^{22}Na^+$. Debe también precisarse que el valor de V_{max} para el transporte de $^{86}Rb^+$ aumentó perceptiblemente para las células crecidas en la presencia del NaCl de 0.6 M, y esto se observó en ambos valores de pH, indicando la posibilidad que durante el crecimiento bajo estas condiciones, *D. hansenii* puede aumentar la síntesis del transportador.

Los valores respectivos de K_m y de V_{max} para el Na^+ y el Rb^+ , y aún más, para el K^+ , son sin duda la razón por la cual los cationes se acumulan con diferente velocidad y magnitud en las células crecidas en la presencia del NaCl o del KCl al incubarlas en la presencia del catión opuesto (K^+ o Na^+ , respectivamente (Figs. 4 y 5). Sin embargo, a las concentraciones más altas de los cationes usados en estos experimentos, sigue siendo posible que otro de los sistemas de transporte o factores menos específicos, puedan funcionar, como se ha propuesto para *S. cerevisiae* (Madrid y cols., 1998). Además, al medir la acumulación de $^{22}Na^+$ y de $^{86}Rb^+$, los resultados concuerdan con los esperados, según los valores de K_m y de V_{max} . Otro tanto se observó en cuanto a las concentraciones de $^{22}Na^+$ y de $^{86}Rb^+$ acumuladas al cargar las células con ambos cationes.

Debe también considerarse que se ha propuesto otro intercambiador en *D. hansenii*; es decir, un intercambiador H^+ /cation (Thomé-Ortiz y cols., 1998); sin embargo, aunque puede ser importante para la regulación del pH interno de la célula, es difícil imaginar cómo puede estar implicado en la captación de cantidades considerables de K^+ o de Na^+ , puesto que las cantidades de estos cationes que se importarán en la célula por este mecanismo, estarían limitadas por los protones disponibles dentro de la célula. También, Almagro y cols. (2001), reportaron que un intercambiador de cation/ H^+ no es el mecanismo principal implicado, apoyándose en el hecho de que *D. hansenii* crece a un elevado valor de pH (cerca de 8) y alta concentración de Na^+ (Almagro y cols., 2001).

Un mecanismo propuesto para explicar la toxicidad de Na^+ en *S. cerevisiae* es la captación de este catión con su inhibición competitiva de la captación de K^+ , conduciendo al agotamiento de K^+ en la célula y a un nivel creciente del sodio (Gómez y cols., 1996). Bajo nuestras condiciones experimentales encontramos una inhibición no competitiva del transporte de K^+ por el Na^+ y viceversa. También, las constantes de la inhibición para ambos cationes fueron significativamente mayores que sus valores de K_m ; esto podría ser debido a la implicación de dos diversos sitios de unión para el catión, a los cuales el inhibidor del catión y el sustrato se unen en forma reversible. Otra posibilidad de la competencia es que ambos cationes, particularmente en las altas concentraciones utilizadas, compiten por el potencial de la membrana de la célula, que disminuye ante la adición de Na^+ o de K^+ , y de una manera similar para ambos cationes (Thomé-Ortiz y cols., 1998).

No pudimos confirmar los datos divulgados por Prista y cols. (1997), que encontró que el transporte de K^+ ($^{86}Rb^+$) se favorece ante la presencia de 50 mM de NaCl; se realizaron experimentos en los cuales la acumulación $^{22}Na^+$ se evaluó un amplio margen de concentraciones de KCl (1-160 mM), y también se cuantificó el transporte de $^{86}Rb^+$ en presencia de diferentes concentraciones de NaCl que variaron de 1 a 160 mM. Siempre la acumulación de $^{22}Na^+$ y de $^{86}Rb^+$ fue inhibida en la presencia de cada concentración del catión opuesto.

Podemos concluir, sin eliminar absolutamente la presencia de un intercambiador catión/ H^+ , que estos experimentos permiten proponer que el mecanismo más probable para la salida rápida de K^+ o de Na^+ es un canal iónico. Los cambios subsecuentes en el contenido de los iones de *D. hansenii* incubada con el catión opuesto se pueden explicar por medio de la existencia de un uniportador responsable del transporte de cationes al interior de la célula, con una afinidad más alta para K^+ que para el Na^+ , similar a lo descrito en *S. cerevisiae* por Armstrong y Rothstein (1964).

Conclusiones

D. hansenii es una levadura halófila, dado que crece mejor en presencia de NaCl o KCl 0.6 M que en un medio sin sales agregadas. Acumula altas concentraciones del catión que se agrega al medio. Muestra una alta capacidad para expulsar los cationes acumulados, probablemente por la existencia de un canal iónico, aunque no se puede descartar la participación menor de un intercambiador catión/H⁺. El sistema de transporte de los cationes monovalentes al interior es más selectivo para el K⁺, pero no en el mismo grado que en *S. cerevisiae*, lo cual explica los movimientos de iones de las células, y que en particular las levaduras cultivadas en presencia de NaCl, pueden acumular cantidades de ²²Na⁺ que casi igualan la acumulación del ⁸⁶Rb⁺. El sistema de transporte parece ser impulsado por el componente eléctrico del gradiente electroquímico. Las condiciones del cultivo tienen una influencia importante sobre el pH interno de las células. La adición de concentraciones cada vez mayores de sales, produce una disminución del pH interno de las células.

Con nuestros datos proponemos un modelo para los mecanismos del transporte de Na⁺ y de K⁺ en *D. hansenii* (Figura 14). Una ATPasa de H⁺, tipo P, similar al gen *PMA1* de *S. cerevisiae*, que energiza la membrana plasmática y genera un potencial transmembranal y un gradiente de pH (Serrano, 1980); el potencial de la membrana conduce a la captación de Na⁺ o de K⁺ vía uno o más uniportadores con selectividad diferente en *D. hansenii*. También se propone la presencia de un canal no selectivo de Na⁺ y de K⁺, como el descrito en plantas (Bihler y cols., 1998; Roberts y cols., 1999). El Na⁺ puede ser expulsado por otra ATPasa tipo P codificada por el gen *ENA1* (Almagro y cols., 2001) y por un intercambiador electroneutro similar al reportado en *S. cerevisiae* codificado por *NHA1* (Bañuelos y cols., 2001) y cuya existencia parece ser real en *D. hansenii* (Rodríguez-Navarro, 2000; Thomé-Ortíz y cols., 1998).

Finalmente, la adaptación de *D. hansenii* a los medios salinos, no parece residir en su capacidad para expulsar al Na⁺, sino probablemente en alguna otra propiedad, tal vez de sus sistemas metabólicos que le permiten funcionar ante las altas concentraciones de este catión que acumula. Como ya se mencionó, otra posibilidad es que acumule el Na⁺ captado del exterior en algún compartimento interno, de los cuales el mayor es la vacuola.

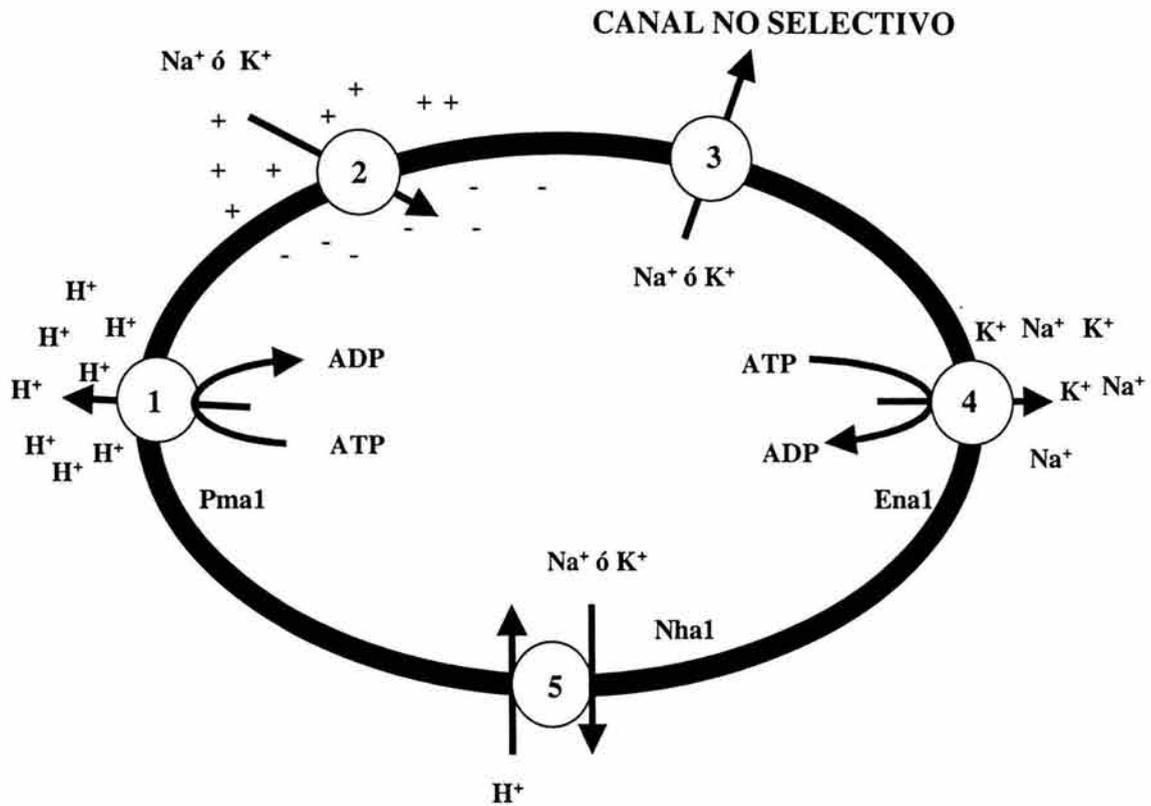


Figura 14.- Modelo propuesto para los sistemas de transporte para el Na^+ y K^+ en *D. hansenii*. **1.** ATPasa de H^+ , tipo P; **2.** Esta ATPasa energiza la membrana plasmática, creando un potencial transmembranal y un gradiente de pH de 2-4 unidades. El potencial de membrana impulsa la captación de Na^+ o K^+ vía uno o varios uniportadores; **3.** Un canal no selectivo de baja afinidad para el Na^+ y K^+ ; **4.** Una Na^+ -ATPasa tipo P; **5.** Un intercambiador de catión/ H^+ electroneutro.

Perspectivas

- Caracterizar el canal no selectivo propuesto en esta levadura.
- Utilizar inhibidores de canales para Na^+ y K^+ y evaluar la actividad relativa del antiportador catión/catión.
- Determinar el transporte de cloro en esta levadura.
- Diseñar experimentos de biología molecular, e identificar si los genes que en otras levaduras están involucrados en la tolerancia a la sal (*ENA1*, *ENA2*, *TRK*, *HAK1*), se expresan en ésta levadura que tiene características peculiares de transporte de sodio y potasio.
- Realizar experimentos necesarios para concluir los resultados obtenidos hasta el momento en la determinación de metabolitos de la glucólisis y actividades de enzimas glucolíticas.
- Evaluar el posible papel de la trehalosa sobre la actividad de las enzimas involucradas en la regulación de la vía glucolítica y metabolismo de carbohidratos.

Bibliografía

1. Adler, L., Blomberg, A. y Nilsson, A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* **162**: 300-306.
2. Almagro, A; Prista, C; Benito, B; Loureiro-Días, M. C. y Ramos, J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.* **183**: 3251-3255.
3. Armstrong, W. M. y Rothstein, A. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. *J. Gen. Physiol.* **48**: 61-71.
4. Armstrong, W. M. y Rothstein, A. 1967. Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* **50**: 968-988.
5. Bañuelos, M. A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. y Potier, S. 1998. The Nah1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology.* **144**: 2749-2758.
6. Bayley, R. M. y Morton, R. A. 1978. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **6**: 151-205.
7. Bertl, A., Slayman, C. L. y Gradmann, D. 1993. Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* **132**: 183-199.
8. Bihler, H., Slayman, C. L. y Bertl, A. 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **432**: 59-64.
9. Borst-Pauwels, G. W. F. H., Schnetkamp, P. y VanWell, P. 1973. Activation of Rb⁺ and Na⁺ uptake into yeast by monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta.* **291**: 274-279.
10. Calahorra, M., Martínez, G., Hernández-Cruz, A. y Peña, A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast.* **14**: 501-515.
11. Conway, E. J. y Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* **47**: 355-360.
12. Conway, E. J. y O'Malley, E. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem. J.* **40**: 59-67.

13. Conway, E. J. y Brady, T. G. 1950. Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* **47**: 360-369.
14. Conway, E. J., Brady, T. G. y Carton, E. 1950. Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem. J.* **47**: 369-374.
15. Conway, E. J. y Duggan, F. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* **69**: 265-274.
16. Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
17. DasSarma, S. y Arora, P. 2001. Halophiles. Enciclopedia of Life Sciences. 2001. *Nature Publishing Group/www.els.net*: **1-9**.
18. Droop, M. R. y Ferguson, E. S. 1968. Advances in microbiology of the sea. *Academic Press and New York*. **Vol. 1**.
19. Dufour, J. P., Goffeau, A. y Tsong, T. Y. 1982. Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* **257**: 9365-9371.
20. Eddy, A. A., Indge, K. J., Backen, K. y Nowacki, J. A. 1970. Interactions between potassium ions and glycine transport in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.* **120**: 845-852.
21. Gómez, M. J., Luyten, K. y Ramos, J. 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 157-60.
22. González-Hernández, J. C. y Antonio Peña. 2002. Estrategias de Adaptación de Microorganismos Halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura marina). *Rev. Latinoam. Microbiol.* **44**: 137-156.
23. Goffeau, A. y Slayman, C. W. 1981. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **639**: 197-223.

24. Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564**: 114–122.
25. Hobot, J. A. y Jennings, D. H. 1981. Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp. Mycol.* **5**: 217-228.
26. Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* **66**: 300-372.
27. Ko, C. H., Buckley, A. M. y Gaber, R. F. 1990. TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **125**: 305-312.
28. Ko, C. H. y Gaber, R. F. 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4266-4273.
29. Lages, F., Silva-Graca, M. y Lucas, C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology.* **145**: 2577-2585.
30. López, R., Enríquez, E. y Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and $\Delta\Psi$ in yeast. *Yeast.* **15**: 553-562.
31. Madrid, R., Gómez, M. J., Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A. 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**: 1438-1444.
32. Malpartida, F. y Serrano, R. 1981. Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **256**: 4175-4177.
33. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191**: 144-148.
34. Mitchell, P. y Moyle, J. 1969. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **9**: 149-155.
35. Nass, R. y Rao, R. 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *J. Biol. Chem.* **273**: 21054-21060.

36. Neves, M. L., Oliveira, R. P. y Lucas, C. M. 1997. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*. **143**: 1133-1139.
37. Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. y Pardo, J. D. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol*. **109**: 735-742.
38. Norkrans, B. 1968. Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv. Fur. Mikrobiologie*. **62**: 358-372.
39. Norkrans, B. y Klin, A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt. *J. Bacteriol*. **100**: 836-845.
40. Gomez-Puyou, A., Tuena. M. y Peña. A. 1967. Regulatory action of ions on some mitochondrial functions. *Natl. Cancer Inst. Monogr*. **27**: 97-109.
41. Peña A., Cinco, G., Gomez-Puyou A. y Tuena, M. 1969. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*. **180**: 1-8.
42. Peña A., Cinco, G., Gomez-Puyou, A. y Tuena, M. 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys*. **153**: 413-25.
43. Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. *FEBS Lett*. **34**: 117-119.
44. Peña, A. y Ramírez, J. 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membr. Biol*. **22**: 369-384.
45. Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys*. **167**: 397-409.
46. Peña, A., Carrasco, N. y Mora, M. A. 1979. Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. *J. Membr. Biol*. **47**: 262-284.
47. Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P. y Borbolla, M. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys*. **231**: 217-225.

48. Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G. y Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* **177**: 1017-1022.
49. Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C. y Ramos, J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4005-4009.
50. Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R. y Peña, A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+/H^+ exchanger. *J. Bacteriol.* **180**: 5860-5865.
51. Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A. 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport system of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* **154**: 307-311.
52. Ramos, J., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1029**: 211-217.
53. Roberts, S. K., Fischer, M., Dixon, G. K. Y Sanders, D. 1999. Divalent cation block of inward currents and low-affinity K^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 291-297.
54. Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**: 940-945.
55. Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1469**: 1-30.
56. Roos, A. y Boron, W. F. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* **61**: 296-434.
57. Rothstein, A. y Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* **44**: 18-29.
58. Rothstein, A. y Bruce, M. 1958. The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J. Cell. Comp. Physiol.* **51**: 145-159.
59. Rothstein, A. y Bruce, M. 1958. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* **51**: 439-455.

60. Rose, A. H. y Harrison, J. S. The Yeasts. Second Edition. 1987. *Academic Press*. Capitulo **1, 2, 6**.
61. Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* **105**: 419-424.
62. Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. y Fink, G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺/K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature.* **319**: 689-693.
63. Serrano, R. y Rodriguez-Navarro, A. 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 399-404.
64. Slayman, C. W., Long, W. S. y Lu, C. H. 1973. The relationship between ATP and electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* **14**: 305-338.
65. Sue, H. L. y Pringle, J. R. 1980. Reserve Carbohydrate metabolism in *Sacharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
66. Thomé-Ortiz, P. E. Peña, A. y Ramírez, J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenni* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast.* **14**: 1355-1371.
67. Wieland, O. H. 1965. Glycerol. In Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, **3rd edn**. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 598-606.

ANEXO I

Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila)

Juan Carlos González-Hernández,* Antonio Peña*

RESUMEN. El término halófilo se emplea para todos aquellos microorganismos que viven mejor en medios hipersalinos que en medios carentes de sal; son una clase interesante de microorganismos capaces de competir exitosamente en los medios salinos y resistir los efectos desnaturizantes de la sal. A esta categoría de microorganismos pertenece una amplia diversidad de microorganismos, tanto procariontes como eucariontes. Los organismos halófilos cuentan con estrategias que les permiten enfrentar al estrés osmótico: mantienen altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica. Describimos las características de algunos organismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila), que les permiten resistir altas concentraciones de sal.

En la actualidad está creciendo el interés por conocer mejor la gran diversidad de microorganismos halófilos y cada vez es mayor el número de investigaciones relacionadas con el tema ya que estos organismos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios estables que pueden tener aplicaciones prácticas. En esta revisión se describen algunos de los mecanismos con los que cuentan algunos microorganismos halófilos para resistir la elevada concentración de NaCl.

Palabras clave: Halófilo, solutos, *D. hansenii*, NaCl, estrés osmótico.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos halófilos son aquellos que se encuentran en los ambientes hipersalinos, pero se diferencian de los halotolerantes porque son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en su ausencia. Existe una amplia diversidad de estos microorganismos tanto en el phylum procarionte como en el eucarionte; estos microorganismos tienen la capacidad de balancear su presión osmótica en relación con el medio y resistir los efectos nocivos de la sal. Dentro de los microorganismos halófilos hay una gran variedad de heterótrofos y metanógenos en el phylum Archaea, adaptados para resistir altas concentraciones de NaCl, mediante una serie de mecanismos moleculares, tales como enzimas que mantienen su actividad a con-

ABSTRACT. The term halophile is used for all those organisms belonging to hypersaline habitats; they constitute an interesting class of organisms able to compete successfully in salt water and to resist its denaturing effects. A wide diversity of microorganisms, prokaryotic and eukaryotic belong to this category. Halophile organisms have strategies allowing them not only to withstand osmotic stress, but also to function better in the presence of salt, in spite of maintaining high intracellular concentrations of salt, partly due to the synthesis of compatible solutes that allow them to balance their osmotic pressure.

We describe the characteristics of some halophile organisms and *D. hansenii* (halophile yeast), that allow them to resist high concentrations of salt. The interest to know the great diversity microorganisms living in hypersaline habitats is growing, and has begun to be the center of recent investigations, since halophile organisms produce an wide variety of biomolecules that can be used for different applications. In this review we describe some mechanisms with which some halophile organisms count to resist the high concentration of salts, mainly NaCl.

Key words: Halophile, solutes, *D. hansenii*, NaCl, osmotic stress.

centraciones elevadas de sal, membranas púrpura que permite el crecimiento fotótrofo, sensores como rodopsina que regulan la respuesta fototáctica y vesículas de gas que promueven la flotación de las células.⁴³ Los microorganismos halófilos están ampliamente distribuidos en los medios hipersalinos (en zonas áridas hipersalinas, costas, diferentes profundidades del agua de mar, etc.).⁴³ En los halófilos eucariontes hay microorganismos fotosintéticos, litótrofos y heterótrofos.⁴³

Dado que las membranas biológicas son permeables al agua, las células no pueden mantener la actividad del agua de su citoplasma más alta que su alrededor; porque ello las puede llevar a perder agua hacia el medio que las rodea.³³ Por consiguiente, se puede esperar que un microorganismo que vive en altas concentraciones de sal mantenga su citoplasma al menos isosmótico con el medio extracelular. La presencia de una presión de turgencia requiere un citoplasma hiperosmótico, con la posible excepción de los *Halo-bacteriales*, del phylum Archaea,¹⁷⁶ donde todos los microorganismos halófilos mantienen una presión de turgencia.

Existen dos diferentes estrategias fundamentales para la existencia del mundo microbiano que permite a ciertos mi-

* Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. CP 04510, AP 70-242, México D. F. Tel. 5622-5633 FAX 5622-5630.

croorganismos sobrellevar un estrés osmótico debido a la presencia de una alta concentración de sal. i) Las células mantienen altas concentraciones intracelulares de sal, osmóticamente o al menos equivalente a la concentración externa de sal ("salt-in" strategy); algunos sistemas intracelulares deben adaptarse a la presencia de altas concentraciones de sal. ii) Las células mantienen bajas concentraciones de sales en su citoplasma ("compatible-solute" strategy). La presión osmótica del medio es balanceada por solutos compatibles, y no se requiere de una adaptación especial de los sistemas intracelulares.¹³

La estrategia "salt-in" es utilizada por dos grupos filogenéticamente no relacionados: Los aeróbicos extremadamente halófilos del phylum Archaea, del orden de los *Halobacteriales*,^{13,91} y las bacterias anaeróbicas halófilas del orden de los *Haloanaerobiales*.^{127,128} Es interesante que no se ha identificado ningún soluto orgánico osmoprotector en los organismos representativos de estos grupos, y en la mayoría de los estudios reportados, las concentraciones intracelulares de iones son similares a la que se encuentran en el medio donde habitan estos organismos. La composición iónica del citoplasma suele diferir grandemente de la del medio, que la mayoría de las veces contiene NaCl como principal componente salino. El medio intracelular se caracteriza por la presencia de concentraciones molares de KCl.^{91,127,128}

En las células que usan la estrategia salt-in para la adaptación osmótica, las enzimas y componentes estructurales de las células se han adaptado a la presencia de altas concentraciones de sal para asegurarse del propio funcionamiento de la maquinaria enzimática intracelular. Se ha observado que los organismos halófilos muestran adaptaciones moleculares, dentro de las cuales existe un exceso de aminoácidos con carácter ácido y pocos aminoácidos hidrofóbicos en sus proteínas.⁹⁰

En otros microorganismos halófilos y halotolerantes, el balance osmótico se establece mediante pequeñas moléculas que son sintetizadas por las células o tomadas del medio donde se encuentran disponibles. La estrategia "compatible solute" no necesariamente implica la adaptación de ciertas proteínas a esos solutos. Los solutos compatibles se definen como solutos que a altas concentraciones permiten a las enzimas funcionar eficientemente.³³ Convencionalmente las enzimas parecen funcionar en presencia de concentraciones molares de solutos. Hay una gran diversidad de solutos compatibles que se han encontrado en los microorganismos halófilos y halotolerantes, dentro de los cuales encontramos algunos polioles, como el glicerol y arabinitol, azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias como la glicina betaína. Los solutos compatibles son típicamente componentes de bajo peso molecular, altamente

solubles en agua, sin carga o con propiedades zwitteriónicas a un pH fisiológico. Ciertamente algunos solutos compatibles son más eficientes que otros en la protección de las enzimas contra los efectos de altas concentraciones de sal y otros tratamientos de estrés.^{54,55}

No se conoce bien la naturaleza de las interacciones de los solutos compatibles con las proteínas; no es posible por ahora predecir la posible estructura molecular que confieren los solutos compatibles que puedan proveer una estabilización osmótica y mantener la estructura y actividad de las enzimas. Sin embargo, la concentración intracelular de los solutos orgánicos compatibles permite un alto grado de adaptabilidad de las células a los cambios de la concentración de sal en el medio.^{54,55}

Los microorganismos están sujetos a diferentes condiciones fisiológicas de estrés y variaciones del ambiente. Para contender con los efectos dañinos del estrés, las células han desarrollado respuestas moleculares rápidas para evitar los daños y protegerse de las diferentes formas de estrés. La respuesta mejor caracterizada es la síntesis de proteínas, conocidas como las proteínas de estrés. Aunque los mecanismos postraduccionales juegan un papel importante en la regulación de la respuesta ante el estrés, la investigación en esta área se ha enfocado principalmente a nivel de la transcripción, donde se han identificado y caracterizado diversas vías de transducción y factores de transcripción que responden al estrés.⁵¹

Existe evidencia de la presencia de levaduras como constituyentes de poblaciones microbiológicas marinas, que se han aislado de diferentes profundidades y en diferentes zonas por diferentes técnicas básicas de microbiología.¹⁷³

La definición de levaduras marinas, incluye todas las levaduras, que tienen la capacidad de reproducirse bajo ambientes marinos: medio alcalino, alta concentración de sales y baja temperatura, tres características fisicoquímicas del agua de mar.¹²¹ Los primeros estudios sobre las levaduras marinas fueron realizados por el grupo de Norkrans, quien efectuó un estudio con el fin de definir si se reproducen en medios alcalinos, con altas concentraciones de sal (NaCl) y baja temperatura; sus estudios mostraron una alta tolerancia a la sal para miembros de los géneros *Debaryomyces*, *Pichia*, y *Candida*.¹⁷³

La información disponible sobre la tolerancia al NaCl por parte de las levaduras, no se limita a las levaduras marinas. La mayoría de las levaduras, independientemente de su hábitat normal, son capaces de crecer en las concentraciones de NaCl que se encuentran en el agua de mar.¹⁷³

En esta revisión se mencionan los avances y las perspectivas sobre el estudio de las estrategias de adaptación de algunos microorganismos halófilos, y al final señalaremos los avances en el estudio de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, microorganismo halófilo, con el cual trabaja-

mos en nuestro grupo de investigación realizando un estudio de la resistencia que tiene al estrés salino y alcalino.

HALOFILIA

Aunque las sales se requieren para todas las formas de vida, los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento: los halófilos ligeros muestran crecimiento óptimo dentro de una concentración de NaCl que oscila entre 0.2 y 0.85 M (2-5%); los halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20 %) de NaCl, y por último, los halófilos extremos, que crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl. En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales.⁴³

REPUESTA GENERAL AL ESTRÉS

La respuesta transcripcional hacia los cambios en el medio y condiciones de estrés es uno de los principales tópicos de la investigación básica y la aplicada. Desde un punto de vista básico, para entender estas respuestas es importante saber cómo se identifica y se traduce la señal de estrés hacia el núcleo, para identificar los genes que se inducen bajo las condiciones de estrés, y finalmente para establecer las consecuencias fenotípicas de esta inducción en la tolerancia al estrés. *S. cerevisiae* es uno de los organismos en que más se han aplicado los avances genéticos a nivel molecular, como un modelo para estudiar las respuestas al estrés, con miras a utilizar esta información para aislar y caracterizar proteínas relacionadas con el estrés en eucariotes y diseñar estrategias para aumentar la resistencia al estrés en organismos de interés industrial.⁵¹

La exposición de las levaduras a una forma de estrés les proporciona la habilidad de resistir no sólo una sino varias condiciones de estrés;^{98,132,171} sin embargo, se sabe que las células que crecen bajo condiciones limitadas de nutrientes o células ayunadas, adquieren tolerancia a una amplia variedad de condiciones de estrés, una propiedad que fue explorada en cultivos limitados de azúcar en la producción de levadura de panadero.^{51,52,107,153,159,166,167} Estas observaciones indican que la levadura tiene un mecanismo global que adquirió para resistir las diferentes condiciones de estrés, que se ha denominado respuesta general al estrés "general stress response".^{107,153,159}

La idea general de la respuesta general al estrés surge como un sistema que regula la inducción coordinada de

muchos genes de estrés a través de un elemento común cis en su promotor (conocido como elemento de respuesta al estrés, STRE). El STRE se induce por diferentes cambios de ambiente o estrés metabólico y la activación transcripcional se regula a través de este elemento, resultando en la adquisición de un estado de tolerancia hacia alguna condición de estrés.⁵¹

Por otra parte, un gran número de genes responsables del estrés son controlados por los elementos de respuesta al estrés (STREs), vía la regulación transcripcional de *Msn2p* y *Msn4p*.^{110,157} Los STREs se encontraron por análisis de computadora en varios promotores de las levaduras^{113,170} y así, en una mutante carente de *MSN2* y *MSN4*, se encontró la expresión alterada de aproximadamente 150 genes.^{36,60,146}

Notablemente, no todos los genes que se expresan bajo estrés están fuertemente afectados en *Msn2p* y *Msn4p*. *Msn2p* y *Msn4p* pueden controlar muchos genes indirectamente; alternativamente, los dos factores pueden ser capaces de unirse a diferentes elementos en el promotor; por ejemplo, en conjunción con otros factores se ha demostrado que la mayoría de los genes son controlados directamente por *Msn2p* y *Msn4p* conteniendo diversos STREs cercanos.¹¹³ Necesariamente se requiere de más trabajo para comprender la organización de los promotores controlados por *Msn2p* y *Msn4p*.

Se ha mostrado que los cambios de la osmolaridad del medio afectan diferentes vías de señalización; el sistema que mejor se ha caracterizado es la vía de alta osmolaridad por glicerol (HOG), la cual se activa en menos de un minuto cuando el cambio de osmolaridad se lleva a cabo.²³ La incapacidad de las mutantes de HOG para adaptarse a un medio de alta osmolaridad y el conocimiento de la función de los genes cuya expresión se estimula vía HOG, confirman que el papel celular de esta vía es orquestado en una significativa parte de la respuesta transcripcional de las células de levaduras hacia una alta osmolaridad. La vía HOG también regula efectos postraduccionales y de los sistemas de osmorrespuesta más entendido en los sistemas eucarióticos. Se ha encontrado que ante un cambio osmótico, la proteína cinasa A (dependiente de cAMP) modifica la expresión de genes.¹²⁰ La proteína cinasa A regula la respuesta general al estrés que se observa bajo condiciones de choque térmico, ayuno prolongado, concentraciones elevadas de alcohol, estrés oxidativo y estrés osmótico. Aunque no se conoce el mecanismo por el cual se controla la proteína cinasa A por el estrés, se cree que no actúa directamente para responder a los cambios osmóticos.^{108,153,159}

VÍA DE LAS MAP CINASAS

Las MAP cinasas son unidades de señalamiento en apariencia altamente conservadas en los sistemas eucarióticos,

donde juegan un papel esencial en la respuesta a los cambios del ambiente, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Las vías de las MAP cinasas controlan el crecimiento celular, morfogénesis, proliferación y respuestas al estrés y están involucradas en muchos procesos en algunas enfermedades. Existen diversas revisiones acerca de las vías de MAP cinasa; sin embargo, la parte central de la vía de MAP cinasa es que existen tres clases de proteínas cinasas, una Map cinasa (MAPK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK ó MEK), y una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK ó MEKK) (Fig. 1). La proteína MAPKKK activa por fosforilación a la MAPKK sobre una serina y una treonina en una parte conservada del dominio N-terminal de la cinasa. Subsecuentemente, la MAPKK fosforila la MAPK sobre una treonina (algunas veces serina) y un residuo de tirosina, separado sólo por un aminoácido (Tre/Ser-X-Tir). Este sitio de fosforilación se localiza en el dominio catalítico; la fosforilación dual sobre la treonina y tirosina es necesaria para la activación de la MAPK. Típicamente la fosforilación estimula la transferencia de la MAPK del citosol hacia el núcleo, donde esta fosforila sobre el blanco serina/treonina, seguido de una prolina. Sin embargo, una porción de la MAPK aparentemente activa se encuentra en el citoplasma para regular los efectos postraduccionales. La activación de MAPKKKs puede ocurrir por la fosforilación a través de una proteína cinasa o por la interacción con otras proteínas, un proceso que puede involucrar pequeñas proteínas G.

Los mecanismos de activación y sistemas sensoriales que preceden a las vías de MAP cinasa son diversos y pueden incluir un receptor de tirosina cinasa (en los sistemas de animales), receptores acoplados a la proteína G, sistemas de fosforilación y otros. Las diferentes vías de MAP cinasas forman sistemas de señalamiento interactivo. Por una parte, una MAPKK cinasa puede controlar diferentes MAPK, como se observa en las levaduras. Diferentes vías con en el mismo organismo comparten cinasas; especialmente en los eucariontes superiores, aunque en las levaduras, esta situación resulta ser un sistema complejo en las vías de señalización. La presentación del sistema de MAP cinasas como una vía lineal como se muestra en la Fig. 1 para explicar la nomenclatura, es realmente una simplificación del sistema; las vías de MAP cinasas están controladas negativamente por proteínas fosfatasa que actúan sobre MAPKK y la MAPK (serina-treonina fosfatasa) o solamente sobre la MAPK (tirosina fosfatasa).^{12,38,68,83,85,87,99.}

REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE LA VÍA HOG

Recientemente se ha obtenido más información acerca de las proteínas que regulan las respuestas transcripciona-

les en la vía HOG; como una complicación adicional, existen pocos genes donde la estimulación por el estrés osmótico sea exclusivamente controlada por la vía HOG; mediante análisis de la expresión global de genes se han identificado sistemas de expresión simple.^{60,137,146} Sko1/Acr1p, Hot1p, y probablemente Msn2p y Msn4p, así como Smp1p están implicados en la transcripción dependiente de HOG. Todos estos factores pertenecen a diferentes familias de reguladores transcripcionales. También se sabe que bajo choque osmótico los genes dependientes de Msn2p/Msn4p requieren de la vía HOG para su inducción pero lo que no se conoce es si esto es debido al control directo de Msn2p/Msn4p o por Hog1p.¹⁵⁸

Sko1/Acr1p, por otra parte, son ambos represores^{134,140} y activadores,¹⁴⁷ cuya función represiva está controlada por Hog1p directamente.¹⁴¹ Hot1p es una proteína que re-

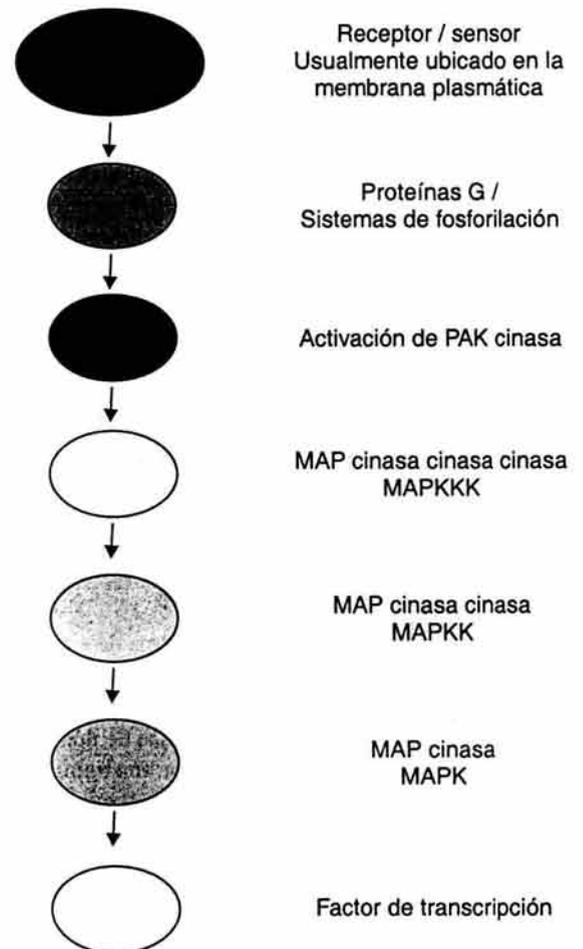


Figura 1. Nomenclatura de proteínas en la vía de MAP cinasas. Las flechas solamente indican el sentido de la vía; los complejos de las proteínas específicas son comunes y requeridos para la transmisión de señales.

cluta la Hog1p cinasa como blanco de los promotores.^{8,145} Smp1p es un factor recientemente identificado, el cual es fosforilado por Hog1p y contribuye en la expresión de algunos genes.¹³⁸

Existen observaciones que indican que bajo estrés osmótico la translocación de Msn2p y Msn4p hacia el núcleo es necesaria pero no suficiente para la estimulación de genes. Después de todo, el análisis global de la expresión revela una marcada correlación entre Msn2p/Msn4p, así como entre los genes dependientes de Hog1p.¹⁴⁶ Esencialmente la expresión de genes después de un choque térmico disminuye en más del 75% en mutantes *msn2Δ msn4Δ* y también en una mutante *hog1Δ*. Por otra parte, hay muchos genes cuya expresión disminuye fuertemente en una mutante *hog1msn2Δ*, pero que no se afectó por la eliminación de *MSN2* y *MSN4*,¹⁴⁶ congruente con el hecho de que Hog1p regula la respuesta transcripcional a través de diversos mecanismos. Mientras que esta observación se basa esencialmente en dicha correlación, es bien conocido desde hace varios años que la inducción osmótica de STRE requiere de la vía HOG.^{110,158} La localización de Msn2p/Msn4p no se afecta en una mutante *hog1msn2Δ*. Esta observación pueden indicar que Hog1p controla la actividad nuclear de Msn2p y Msn4p después del choque térmico. Sin embargo, también se observó que aunque la eliminación de *MSN2* y *MSN4* reduce drásticamente la expresión de un gen reportero de STRE, la inducción es específicamente por estrés osmótico (pero no por otras condiciones de estrés), aunque sea a nivel basal.¹⁵⁸ Las deleciones adicionales de *PBS2* en las mutantes *msn2Δ msn4Δ* eliminaron por completo la inducción.¹¹⁰ Esto sugiere que bajo la presencia del estrés osmótico algunas proteínas no caracterizadas regulan la inducción de los genes STRE dependiente de Hog1p. En conclusión, se requiere de más investigación en el campo para la mejor comprensión de la inducción de los genes STRE controlada por la vía HOG, y saber si Hog1p controla directamente a Msn2p/Msn4p.¹¹⁰

BACTERIAS HALÓFILAS

Las bacterias halófilas extremas crecen en concentraciones de NaCl entre 2.8 M y 6.2 M. La biología general de los organismos halófilos extremos está bien documentada;^{28,86,94} existen diversas distinciones y características intrínsecas de estos organismos, como resultado de la selección natural del medio, que no parecen tener un papel determinante en las relaciones de los dominios de los microorganismos halófilos.

Una característica en los halófilos bacterianos es la ausencia de peptidoglicanos, no sólo en las paredes de las halobacterias,^{26,28} sino también en las paredes de la

gram-positiva *halococci*.⁵⁴ Se cree que la carencia de peptidoglicanos en las bacterias halófilas se debe a una incapacidad para sintetizar ácido murámico.⁵⁴

Los principales ácidos fosfatídicos de los lípidos *Halobacteriales* derivan del 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol. Los fosfátidos predominantes de las *halobacterias* son análogos diéter del fosfatidil glicerol fosfato, el cual puede acumularse hasta llegar a un 70 % del fósforo lipídico en *H. cutirubrum* y un 80 % en *H. halobium*.¹⁰⁹ El fosfátido más abundante después de éstos en ambas especies, es el análogo éter del fosfatidil glicerol, que se llega a acumular del 6 al 7.5% del fósforo lipídico en cada especie. Los éteres lipídicos no son exclusivos de los organismos halófilos,¹⁶¹ pero no son muy comunes en las bacterias. Los lípidos de los organismos halófilos son muy ácidos, una propiedad de relevancia directa, en relación con la presencia de medios salinos.⁹⁰

Es de esperarse *a priori*, que las condiciones extremas del medio produzcan la selección de ciertas vías metabólicas. Tal selección se refleja en las características de la pared celular y composición de ciertos organismos halófilos. *Halobacterium salinarium* produce una glucosa deshidrogenasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa sólo cuando se inducen, y estas enzimas no tienen una alta actividad específica.⁵

Se han elaborado diversos medios sintéticos para las bacterias halófilas. Dundas *et al.*,⁴⁷ utilizaron un medio que contenía 10 aminoácidos y ácido citidílico, el cual estimuló el crecimiento limitado. Onishi *et al.*,¹²⁶ utilizaron un medio que contenía 15 aminoácidos, 2 nucleótidos, glicerol y asparagina o NH_4^+ , que mostró mejores resultados. Dundas *et al.*,⁴⁷ concluyeron que la valina, metionina, isoleucina y leucina son esenciales para el crecimiento de *H. salinarium*. Sus resultados mostraron además que la lisina no es esencial. Por otra parte Onishi *et al.*,¹²⁶ encontraron que los aminoácidos esenciales para *H. cutirubrum* son la arginina, leucina, lisina y valina.

Los aspectos anteriores que se han descrito, aunque se refieren a las características generales de las bacterias halófilas y son de interés intrínseco, no parecen jugar un papel directamente determinante en la relación de estos organismos con el agua y la sal, excepto por la naturaleza ácida de los fosfolípidos de la membrana.

Por otra parte, la inestabilidad de la pared celular refleja un requerimiento específico de solutos, que puede ser descrito como la relación con el agua ("water relations"). El papel de la sal para el mantenimiento de la integridad estructural de la envoltura celular ha sido discutido por Brown en términos de las posibles contribuciones de la sal a la estructura del agua, los enlaces hidrofóbicos y las fuerzas electrostáticas;²⁸ estas contribuciones se han atribuido a los efectos electrostáticos de las sales en la neutralización del exceso de cargas sobre la membrana.^{25,27,29} Baxter ha

planteado una explicación similar sobre la inactivación de la lactato deshidrogenasa en una solución diluida de un organismo halófilo.¹⁴ Brown atribuyó los eventos electrostáticos en la membrana a una carga negativa causada por un exceso de aspartato y glutamato en las proteínas de la membrana. Lanyi ha propuesto convincentemente que las interacciones hidrofóbicas son los principales factores que suelen intervenir en las proteínas de los halófilos.⁹¹

La fisiología intracelular de los organismos halófilos extremos está dominada por la masiva acumulación de K^+ y Cl^- y por una eficaz exclusión del Na^+ . Este hecho fue demostrado por Christian y Waltho, quienes encontraron que *H. salinarium*, al crecer hasta la fase estacionaria en un medio que contenía 4 M de NaCl y 0.03 M de KCl, acumuló K^+ hasta una concentración de 4.5 M y concentraciones de Na^+ y Cl^- de 1.4 y 3.6 M, respectivamente.³⁹

Continúa la discusión sobre las relaciones que existen entre la sal y las enzimas de los organismos halófilos, que son de inmediata relevancia. Las condiciones que permiten a una enzima funcionar vigorosamente pueden también conferirle una importante vía de inactivación; algunas enzimas son estables bajo ciertas condiciones que inhiben severamente la actividad. Así, la isocitrato deshidrogenasa de un halófilo es muy estable, pero se inhibe fuertemente por 4 o 5 M de NaCl.^{5,6}

Las enzimas de los organismos halófilos se han estudiado lo suficiente para hacer una generalización de sus requerimientos de sal, aunque, por supuesto, hay excepciones. En general las enzimas que están asociadas con la membrana celular tienen un óptimo en su actividad en la concentración de 4 M de NaCl ó KCl; las enzimas ribosomales tienen un requerimiento específico para KCl en un óptimo cercano a 4 M. Las enzimas solubles del metabolismo intermediario colectivamente tienen un amplio margen de sal óptima, pero por ejemplo, la isocitrato deshidrogenasa específica para nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP), tiene un óptimo entre 0.5 y 1.0 M de NaCl o KCl.⁶

Las enzimas citoplasmáticas que se inhiben con altas concentraciones de sal pueden funcionar porque la composición intracelular es tal que el impacto del ambiente del organismo es ligero. Si el KCl no se acumulara, la actividad relativa de agua (a_w) y la concentración total de soluto podrían ser iguales. Este ajuste termodinámico al medio puede llevarse a cabo por la pérdida de agua; en tal caso, los solutos intracelulares principales pueden ser la poza de metabolitos intermediarios, sales, etc., las cuales pueden ser severamente inhibitorias a tales concentraciones, o que las bacterias puedan acumular NaCl, lo cual también se ha mostrado que tiene efecto inhibitorio.⁶

De esta manera, en las bacterias halófilas, el KCl tiene una función fisiológica muy similar a la de los compuestos poliólicos en las levaduras xelotolerantes y algas halófilas.³⁰

LEVADURAS XELOTOLERANTES

Las levaduras asociadas con concentraciones moderadas de sal comprenden diversos géneros, entre los cuales podemos encontrar *Saccharomyces rouxii*, *Debaryomyces*, *Hansenula* y *Pichia*. La nomenclatura y la distribución de las levaduras tolerantes han sido discutidas por Onishi.¹²⁵

Scarr y Rose,¹⁵⁶ definieron como levaduras osmófilas a todas aquellas capaces de crecer en soluciones de azúcares a concentraciones de 65 °Brix (65% wt/wt) a 20 °C; esta definición puede usarse para la descripción del grupo de levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcar. Dado que las relaciones de agua de estos organismos varía notablemente con la presencia del soluto para ajustar la a_w , no es posible anticipar una definición real basada en la tolerancia a la baja a_w . Por ejemplo, Onishi reportó que a 30 °C, la levadura *Torulopsis halonitratophila* no puede crecer en un medio diluido, pero sí lo hace en presencia de 6% (wt/wt) de NaCl a 20 °C; Sin embargo, ésta creció en un medio diluido; así a alta temperatura el organismo fue halófilo o xerófilo, mientras que a 20°C fue xelotolerante.¹²⁴

Los cambios de temperatura juegan un papel muy importante en los mecanismos transcripcionales y postraducionales que promueven la acumulación de trehalosa y glucógeno. Durante un cambio de temperatura de 25 °C a 33-38 °C, se observa la activación transcripcional de *TPS1* y *GSY2*, que participan en la acumulación de glucógeno y trehalosa.⁷⁵ Durante un incremento de temperatura de 38-40 °C, la concentración intracelular de sustratos puede ser decisiva para la acumulación de trehalosa.¹³³ Finalmente, se debe enfatizar que la capacidad de las células para acumular trehalosa y glucógeno en respuesta al estrés está ligada a la presencia y cantidad de enzimas que contienen antes de la exposición al estrés; esto se encontró en experimentos realizados con las mutantes en *msn2/msn4* y *hsp104*, las cuales acumulan menos reservas de glucosa después de la exposición al estrés térmico.^{44,77,133,181}

Onishi ha reportado algunos efectos de la concentración de solutos sobre la capacidad de la levadura para asimilar los azúcares.¹²⁵ Por ejemplo, una cepa de *S. rouxii* asimiló glucosa rápidamente en un medio diluido o en la presencia de 18% de NaCl. Ésta creció también inmediatamente en presencia en un medio basal con galactosa o maltosa como fuente de carbono, pero en presencia de estos azúcares más el NaCl, creció pobremente. También comenta que muy pocas cepas pueden asimilar o fermentar estos azúcares en un medio alcalino.

Aunque las levaduras xelotolerantes pueden prosperar a niveles de actividad de agua más bajos que en los que se encuentran las bacterias halófilas extremas, estos dos organismos son muy diferentes; igual que las levaduras, no tienen requerimiento absoluto para un soluto específico.

Brown encontró diferencias consistentes entre *S. cerevisiae* y *S. rouxii* en la cantidad de captación de solutos como una función de la concentración extracelular de solutos; al incubar las levaduras en soluciones amortiguadoras de algún azúcar o glicerol. *S. rouxii* mostró una baja capacidad para la captación de los no electrolitos, comparada con *S. cerevisiae*.³¹

Todas las cepas xelotolerantes contienen altas concentraciones de polialcoholes; el principal es el arabinitol cuando las levaduras se crecen en medio básico.³⁰ Los polioles confieren dos características a las levaduras xelotolerantes; i) funcionan como osmorreguladores y ii) como solutos compatibles que son sustancias que a altas concentraciones mantienen la actividad de las enzimas contra la inhibición o inactivación. Además, los polioles sirven como fuente de reserva. Las bases fisiológicas de la xelotolerancia en los hongos imperfectos no se ha estudiado en detalle, pero es razonable suponer una similitud general con las levaduras xelotolerantes. La acumulación de polioles en levaduras es común.³⁰

ALGAS HALÓFILAS

Hay algas halófilas en el phylum *Chlorophyta*, en el orden *Volvocales*. El género principal con especies halófilas es *Dunaliella* y *Chlamydomonas*. Ambos son flagelados; la principal distinción morfológica entre ellos es la carencia de una pared celular en *Dunaliella*. Se conocen pocos detalles de *Chlamydomonas*, pero la evidencia ecológica sugiere que el género es mucho menos halotolerante que *Dunaliella*.²⁴

Una diferencia fundamental entre las bacterias y las algas halófilas reside en la capacidad de las algas para extender sus límites de tolerancia a la sal, hacia una alta o baja concentración, con la implicación de que esos límites están determinados en parte por la historia evolutiva del organismo; es así que McLachlan reportó que *D. tertiolecta* creció en un margen aproximado de 0.06-2 M de NaCl.¹⁰⁶

La presencia de altas concentraciones de sal en las algas no es evidente; sin embargo, los análisis directos reportados por Trezzi *et al.*,¹⁶⁹ mostraron diferencias de los cambios de volumen en *D. salina* en respuesta a los cambios de sal en el medio; concluyen que la membrana plasmática es libremente permeable a la sal y que el alga puede acumular concentraciones citoplasmáticas de sal similares a las del medio de crecimiento. Por otra parte, Johnson *et al.*,⁷⁹ señalan que existe una sensibilidad a la sal de un número de enzimas preparadas de un extracto de células de *D. viridis*. Ben-Amotz y Avron¹⁷ encontraron que el glicerol se acumula hasta una concentración de 2 M en *D. parva*, cuando el alga

se adapta a una concentración extracelular de 1.5 M de NaCl.

La producción de polioles en las algas ha sido ampliamente estudiada por Lewis y Smith.¹⁰¹ El manitol es un poliol común en las algas, particularmente en las marinas; también se menciona que la alta concentración del manitol es un fenómeno ubicuo, por la alta concentración del poliol en líquenes, lo cual denota la posible función de estos compuestos como osmorreguladores en algas marinas.

A la acumulación de glicerol en *Dunaliella* se le suponen tres principales funciones:²²

i) La primera y más obvia, es que actúa como osmorregulador; es decir, como una sustancia que, en la concentración en la que se encuentra responde positivamente a la concentración extracelular del soluto (negativamente a la a_w), y mantiene de este modo aproximadamente una igualdad entre la actividad interna y externa a_w (o potencial de agua), y por lo tanto minimiza el estrés osmótico y la deshidratación a la cual está sujeta la célula. ii) la segunda función es como un soluto compatible o protector de la actividad enzimática. iii) Puede funcionar como fuente de reserva bajo ciertas condiciones.²²

En el género *Chlamydomonas* hay especies que crecen con un mínimo requerimiento de NaCl de 0.34 M; además tiene la habilidad de crecer en 1.7 M de NaCl.¹⁷² Algunas algas verde-azules aisladas del Mar Muerto, y en particular la especie *Aphanocapsa*, tiene un mínimo requerimiento de sal de 1.0 M y crece mejor en presencia de 1.5 a 3 M de NaCl.¹⁷⁶ El Mar Muerto así como otros ambientes marinos contienen altas concentraciones de Mg^{2+} , el cual por sí mismo es un factor significativo que contribuye a la tolerancia a la sal.

PLANTAS

La producción de polioles también es común en las plantas. En *Mesembryanthemum crystallinum*, el sodio se acumula en altas concentraciones en las vacuolas, y los polioles (myo-inositol, D-ononitol y D-pinitol) se acumulan en el citosol. La síntesis de polioles es regulada por el NaCl y está involucrada en la inducción y represión de genes.¹⁴⁹

Las plantas que acumulan naturalmente solutos osmoprotectores lo hacen a concentraciones que suelen oscilar entre 5 y 50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco en la base de la planta (6–60 μM) y esto aumenta si la planta es expuesta a algún tipo de estrés osmótico.¹⁴⁹ En las células de las plantas los osmoprotectores están típicamente confinados principalmente en el citosol, cloroplastos y otros compartimentos citoplasmáticos que en total pueden ser parte del 20% del volumen total de las células maduras (el otro 80% se localiza en la vacuola). Las concentraciones naturales de los

osmoprotectores en los compartimentos del citoplasma puede llegar o exceder una concentración de 200 mM. Tales concentraciones son osmóticamente significativas y su papel fundamental es mantener la turgencia de las células y el gradiente para la captación de agua durante las condiciones de estrés.¹⁴⁹

Se ha investigado el papel de la ectoína en la adaptación osmótica de *Rhizobium meliloti*; la cual provee condiciones de crecimiento similares como la glicina betaína en *R. meliloti* bajo condiciones osmóticas de crecimiento adversas (0.5 M NaCl). Ensayos de resonancia magnética nuclear con ¹³C y ensayos de radioactividad muestran que la ectoína no se acumula en el citoplasma y como consecuencia no reprime la síntesis de solutos compatibles endógenos (glutamato, trehalosa). Sin embargo, la alta concentración de glutamato en las células sometidas a un estrés osmótico en presencia de ectoína sugiere que está involucrado en la restauración del balance osmótico, la ectoína puede jugar un papel en la estimulación en la síntesis de osmolitos endógenos.¹⁶⁴

Se ha encontrado que en sistemas fotosintéticos, la betaína, por ejemplo, protege eficientemente varios componentes de la maquinaria fotosintética como la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) y el complejo fotosintético (PSII).⁶¹ Se ha demostrado la acumulación de betaína en respuesta a la sal, deshidratación y frío en plantas superiores que son características en la acumulación de este soluto compatible.¹³¹

Los niveles de prolina en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (100 µg/g peso fresco) es aproximadamente el doble que las plantas control crecidas en ausencia de estrés, y tres veces mayor (600 µg/g peso fresco) en plantas sometidas a estrés durante el crecimiento. Los altos niveles de prolina fueron correlacionados con la presencia de un corto periodo de estrés salino en presencia de 600 mM NaCl al cual fueron sometidas las plantas.¹¹⁵

En algunas plantas que acumulan naturalmente glicina betaína (espinacas, remolachas); la síntesis se lleva a cabo en los cloroplastos por medio de dos reacciones de oxidación de la colina hacia la glicina betaína. La primera oxidación hacia aldehído betaína es catalizada por la colina monooxigenasa (CMO); la oxidación de la aldehído betaína hacia glicina betaína es catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa.¹⁴²

SOLUTOS COMPATIBLES EN LAS CÉLULAS ANIMALES

En los mamíferos, el riñón es un órgano clave componente del sistema de defensa contra los cambios intra/extracelulares de las concentraciones de los solutos. Esto se debe a que este órgano tiene la capacidad de producir orina

de una muy alta y variable osmolaridad, dependiendo del estado de hidratación. Este rasgo característico del riñón es el resultado de la operación y la interacción que existe con el sistema de la médula renal. Durante la deshidratación, cuando se excreta una orina concentrada, se acumula NaCl y la urea en el intersticio medular y proveen la fuerza conductora para la reabsorción del agua a través de la colección por el ducto epitelial.⁷⁸

Las altas y variables concentraciones extracelulares de NaCl y urea que confrontan las células presentan tres problemas principales: Primero, en el riñón existen diversos efectos de estrés osmótico por las altas concentraciones de Na⁺, el cual, en contraste con la urea, no penetra rápidamente en las membranas celulares y está principalmente acompañado por el anión Cl⁻. En las células de la médula renal, el equilibrio osmótico en presencia de concentraciones elevadas de NaCl se lleva a cabo primeramente por la acumulación de pequeños solutos orgánicos.^{15,59} En el riñón de los mamíferos, el segundo cambio al que se enfrentan las células de la médula renal es la alta concentración de urea (200 mM). Aunque la urea rápidamente penetra la mayoría de las membranas celulares y consecuentemente no ejerce un estrés osmótico; tales concentraciones *per se* afectan la viabilidad de la célula seriamente promoviendo daños en la estructura y función de las proteínas y ácidos nucleicos.^{35,162} El tercero es que esas células deben contener con los cambios extremos en las concentraciones externas de solutos durante la transición de la diuresis; ejemplo, bajas concentraciones de solutos en la médula hacia la anti-diuresis, altas concentraciones de solutos medulares, y viceversa. Estas fluctuaciones fisiológicas en la osmolaridad extracelular requieren de mecanismos que permitan la efectiva acumulación y reducción de osmolitos orgánicos.¹⁶²

Las células de la médula renal, que bajo condiciones fisiológicas normales se exponen a condiciones variables extracelulares de los solutos, responden al estrés hipertónico mediante la acumulación de osmolitos orgánicos como glicerofosforil colina (GPC), betaína, mio-inositol, sorbitol, y aminoácidos. El incremento intracelular de estos osmolitos se lleva a cabo por el efecto combinado del aumento en la captación (mio-inositol y betaína), síntesis (sorbitol y posiblemente GPC), disminución en la degradación (GPC) y liberación de osmolitos.¹⁶

Se han identificado solutos orgánicos activos que existen en altas concentraciones en la médula interna renal. Los niveles de los osmolitos se han cuantificado por espectrofotometría de resonancia magnética nuclear y por ensayos bioquímicos en extractos obtenidos con ácido perclórico de ratas normales y deshidratadas (3 días). La deshidratación aumenta la osmolaridad de la orina de 1,503 a 3,748 mosmol/kg y el contenido de la urea en la médula interior de

2,036 a 4,405 nmol/mg proteína. En consecuencia, los polialcoholes (inositol y sorbitol) aumentaron significativamente entre 95 y 78%. En conclusión, los principales osmolitos involucrados en la médula interna renal pueden aumentar durante la antidiuresis, pero son regulados de manera compleja.⁶⁶

Las células renales medulares contienen altos niveles de (glicina) betaína, glicerofosforil colina (GCP), mio-inositol y sorbitol. Se han propuesto dos funciones para estos osmolitos 1) Son compatibles, y regulan el volumen celular (contra altas concentraciones externas de NaCl) sin inhibir a las enzimas y 2) Las metilaminas (GPC y betaína) son osmolitos que interactúan y estabilizan las proteínas contra la perturbación de la alta concentración de urea renal.¹³⁵

Los solutos orgánicos activos se han encontrado en altas concentraciones en la médula renal interna de una amplia variedad de especies de mamíferos, pero no se ha demostrado su existencia en riñones humanos. Está demostrado que algunos osmolitos orgánicos como la glicina betaína, mio-inositol, sorbitol y glicerofosforil se encuentran en diferentes muestras de tejidos de riñones humanos que fueron removidos quirúrgicamente por daños involucrados en un polo del riñón; también se estudiaron riñones de perros, puercos y conejos. Los niveles de osmolitos fueron mayores en la médula más que en los cortes de tejidos, los resultados muestran en los riñones humanos una alta concentración de sorbitol, glicerofosforil colina, glicina betaína y mio-inositol. Se detectaron osmolitos en bajas concentraciones en el músculo esquelético de conejo. Los osmolitos orgánicos detectados en humanos son importantes fisiológicamente y podrían estudiarse en otros mamíferos como modelos para la investigación del sistema de osmolitos en la función del riñón humano.¹⁶⁰

Las células de la médula renal se exponen a altas concentraciones de sal durante la antidiuresis. Éstas se adaptan en parte ante la acumulación de mio-inositol, glicina betaína, taurina y otros aminoácidos, transportándose a través del fluido intersticial. Este transporte es regulado osmóticamente por los cambios en la transcripción de los transportadores y por las modificaciones postraduccionales.⁵⁹

ASPECTOS ENERGÉTICOS DE LOS ORGANISMOS HALÓFILOS

La fuente primaria de energía para la expulsión del Na⁺ y acumulación de K⁺ por la mayoría de los microorganismos es el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) a través de la membrana citoplásmica. Este gradiente electroquímico de protones deriva de la cadena transportadora de electrones (en *Halobacteriales* durante el crecimiento aeróbico) o del ATP formado durante la fosforilación por la actividad de la ATPasa (H⁺-ATPasa tipo F en bacterias,

H⁺-ATPasa tipo A en organismo halófilos del phylum Archaea).⁷⁴ Existe un caso excepcional de la generación directa de una fuerza protón motriz generada por la luz, mediada por la bacteriorrodopsina en *Halobacterium salinarum* y algunos miembros de *Halobacteriaceae*, ésta parece ser una excepción, más que la regla en los halófilos del dominio Archaea, y sin embargo, estos organismos pueden crecer heterotróficamente en la obscuridad.¹⁹

Se puede también establecer un gradiente de Na⁺ ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) a expensas del gradiente de protones, vía los antiportadores Na⁺/H⁺; tal actividad ha sido demostrada en las halófilas del phylum Archaea^{92,93}, bacterias halófilas⁷⁰ y eucariontes.⁸¹

El bombeo de protones en los microorganismos que acumulan solutos orgánicos también requiere energía para el bombeo de iones, para mantener su concentración iónica intracelular baja y contender con la difusión de sales inorgánicas a través de sus membranas.

Los antiportadores Na⁺/H⁺ se han caracterizado en las bacterias halófilas moderadas que sintetizan solutos orgánicos, tales como *Salinivibrio costicola*.⁷⁰ Estos antiportadores juegan un papel importante para mantener bajas las concentraciones de Na⁺. La actividad del antiportador Na⁺/H⁺ de la membrana citoplásmica de *Dunaliella* aumenta cuando las células crecen en altas concentraciones de NaCl.

La captación o expulsión de iones de las células juega un papel importante en la osmoadaptación de ciertos organismos. *E. coli*, por ejemplo, activa un sistema de captación de iones K⁺ en condiciones de alta osmolaridad; esto lo realiza con el fin de acumular el ion K⁺ así como otros osmolitos.¹⁸⁰

En las células de los mamíferos, la disminución del volumen se regula por medio de un choque hipoosmótico inducido; el hinchamiento de las células se conoce desde hace tiempo, y es regulado por canales estrechos que causan la salida de osmolitos incluyendo diferentes iones.⁸⁹

Las levaduras específicamente controlan la proporción intracelular de iones de Na⁺ y K⁺ activamente, por la actividad de una Na⁺-ATPasa o vía el antiportador por H⁺, haciendo uso de los gradientes de protones generados a través de las membranas citoplásmica y vacuolares, resultantes de la actividad de las ATPasas y transportadores respectivos.¹⁵² Aunque estos mecanismos son importantes para la homeostasis iónica bajo estrés salino, se ha involucrado también a varios de los transportadores con la adaptación osmótica que además pueden ser regulados por señales osmóticas.¹⁵²

SOLUTOS COMPATIBLES

En los microorganismos halófilos y halotolerantes se ha reconocido un buen número de solutos diferentes;⁵⁵ a con-

tinuación se presenta una breve recopilación y selección (Fig. 2) de acuerdo con su distribución en el reino microbiano y su capacidad para acumularse en grandes cantidades cuando el microorganismo se encuentra en un medio salino. El glicerol, por ejemplo, facilita el crecimiento del alga *Dunaliella*¹⁸ a concentraciones saturantes de NaCl, y este soluto también se ha encontrado en un gran número de hongos;^{4,5} la sacarosa y la trehalosa se han encontrado principalmente en bacterias no halófilas y halófilas ligeras al crecerlas en concentraciones altas de sal, y también en las cianobacterias.¹⁰⁴ El glucosilglicerol, principal osmótico estabilizador en las cianobacterias, se sintetiza ante concentraciones intermedias de sal,¹⁰⁴ pero también se ha identificado como un soluto osmótico en las bacterias heterotróficas *Pseudomonas mendocina*.¹³⁶ La glicina betaína es producida por muchas bacterias fotosintéticas anoxigénicas halófilas^{55,60} y por la mayoría de las cianobacterias tolerantes a la sal (muchas bacterias heterotróficas halófilas o halotolerantes que toman del medio la glicina betaína, obviamente cuando el compuesto se encuentra en concentraciones suficientes para poder conferir un balance osmó-

tico).^{76,174} Solamente algunos heterótrofos sintetizan glicina betaína, como *Actinopolyspora halophilala*.⁵⁵ La glicina betaína también se sintetiza junto con otros compuestos en ciertos organismos metanogénicos halófilos del dominio Archaea.⁸⁸ La ectoína (ácido carboxílico 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidina) es el principal soluto producido por las bacterias heterotróficas halófilas, y también se ha encontrado en la bacteria fotosintética del género *Halorhodospira*.^{54,65}

Onishi *et al*.¹²⁵ estudiaron 119 cepas de levaduras para determinar la producción de polioles, y encontraron que la mayoría de las especies producen glicerol, arabinitol, y cierta cantidad de eritritol, y mostraron que las altas concentraciones de azúcares o sales en el medio de crecimiento cambian el patrón de fermentación en muchas levaduras osmotolerantes, lo cual se reflejó en un incremento en la producción de polioles.

El glicerol se sintetiza en dos pasos, a partir de la dihidroxiacetona fosfato (Fig. 3). Estos pasos son catalizados respectivamente por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Gpd) NAD dependiente, y la glicerol-3-fosfatasa (Gpp). Para am-

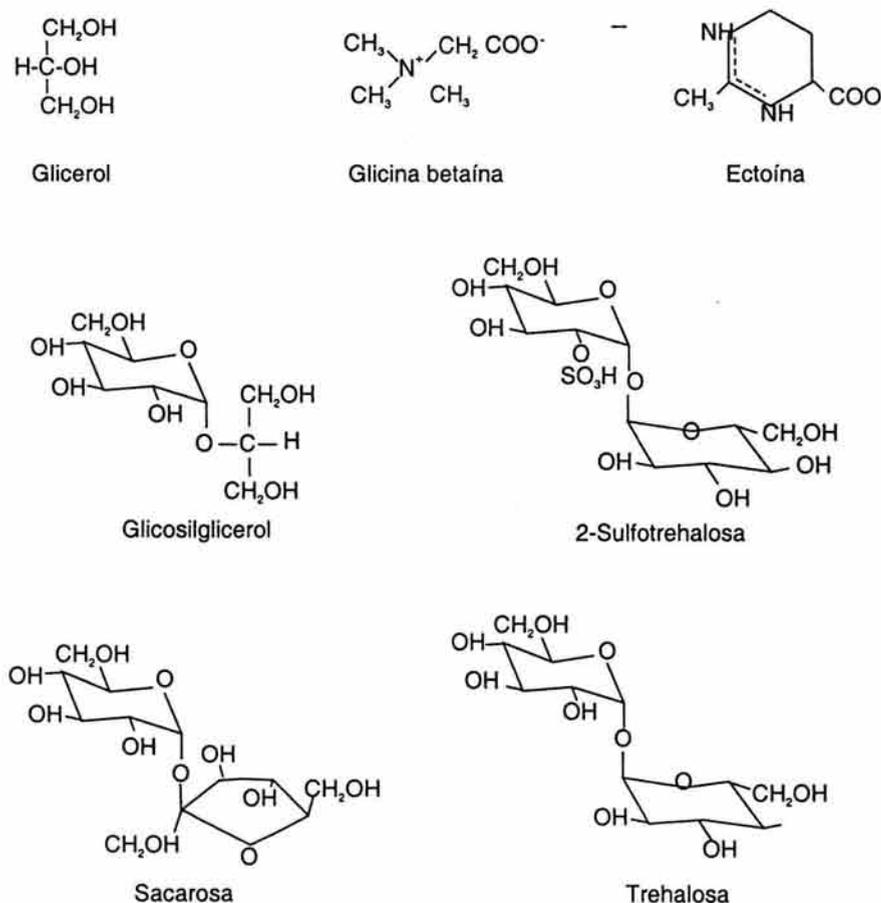


Figura 2. Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y halotolerantes.

bas enzimas, la levadura posee dos isoformas expresadas diferencialmente GPD1 y GPD2^{7,10,20} y GPP1 (RHR2) y GPP2 (HOR2).^{71,118,130} *S. cerevisiae* también posee genes que codifican para las enzimas glicerol deshidrogenasa (GCY1 Y YPR1), así como la dihidroxiacetona cinasa (DAK1 y DAK2), que constituyen la vía de la degradación del glicerol. En la vía para la producción del glicerol vía Gpdp y Gpp, el NADH se convierte en NAD, mientras que para la utilización del glicerol, éste se convierte en dihidroxiacetona fosfato vía Gcy1p y Dak1p, y en el proceso, reduce al NADP a NADPH. Así, un ciclo de la dihidroxiacetona fosfato puede esencialmente funcionar como una transhidrogenasa para la interconversión de NADH a NADPH.^{20,119} *S. cerevisiae* no tiene transhidrogenasas para interconvertir el NADH en NADPH¹¹⁶, y por esta razón este ciclo puede tener varios sitios de control. Existen dos glicerol-3-fosfato deshidrogenasas, una dependiente de NAD (Gpd1p y Gpd2p) y una dependiente de FAD (Gut2p), que participa en el transporte de electrones del NADH hacia el FADH y se encuentra dentro de la cadena respiratoria mitocondrial.

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas con un enlace α -1,1, y se usa como un soluto compatible en las bacterias.⁶² Este compuesto también está ampliamente distribuido en las levaduras y se acumula normalmente durante condiciones de disminución de crecimiento, particularmente durante periodos de inanición y diferenciación.¹⁶⁵ Aunque en la fase estacionaria las células de *S. cerevisiae* contienen una concentración elevada de trehalosa, cuando se crecen en un medio con un potencial de agua disminuido,¹¹² la trehalosa parece estar jugando un pequeño papel en la osmorregulación durante las etapas del crecimiento.

Las células de levadura producen y acumulan también glucógeno, un polisacárido formado por cadenas lineales de moléculas de glucosa unidas con enlaces α -1,4, y ramificaciones con enlaces α -1,6. El glucógeno juega el papel de un carbohidrato de reserva, mientras que la trehalosa como protector contra el estrés; esto sin embargo, como se mencionó, no es tan claro en la levadura como en las bacterias.^{96,97} La trehalosa actúa más bien como protector ante el

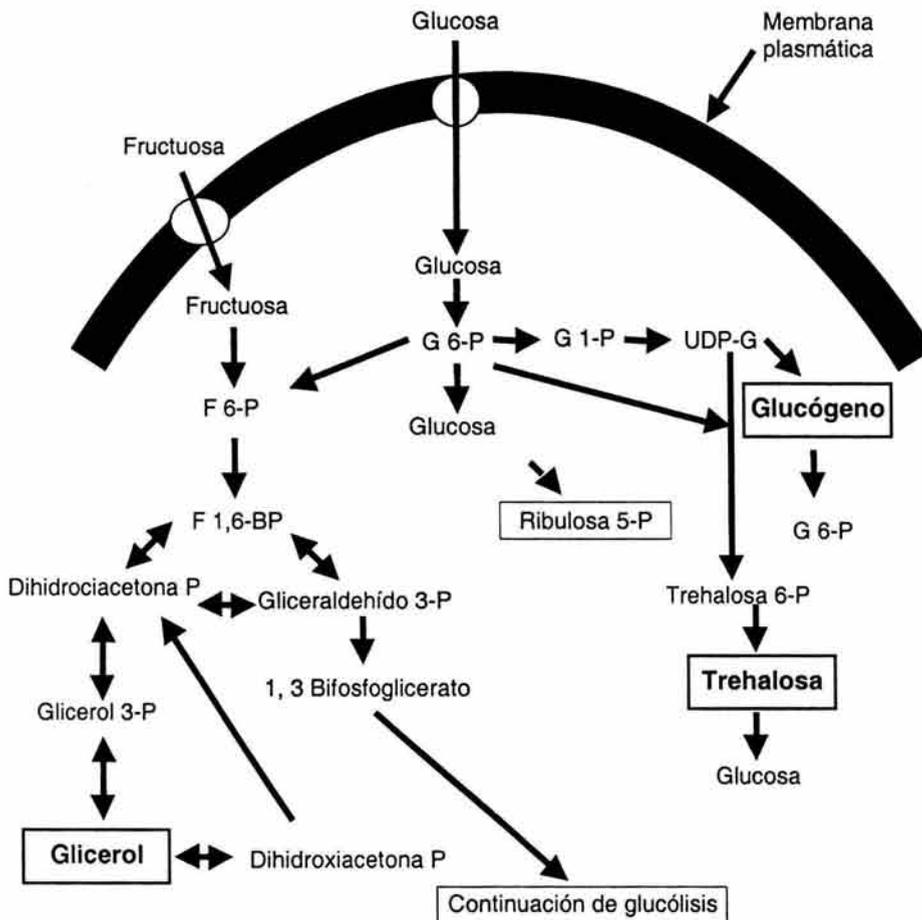


Figura 3. Vías metabólicas para la producción de glicerol, trehalosa y glucógeno en la levadura.

estrés térmico y otras formas extremas de estrés osmótico, como la desecación y el congelamiento. Además de esto, la trehalosa juega un papel importante en el control de la glucólisis, y potencialmente en el control de la relación ATP/ADP de células bajo condiciones de estrés.^{20,52} Por esta razón conviene mencionar de manera general las vías de síntesis de la trehalosa y el glucógeno (Fig. 3).

Los niveles de trehalosa y glucógeno son bajos durante las fases de proliferación en cultivos en matraz con glucosa como fuente de carbono; el glucógeno comienza a acumularse en la última parte de la fase logarítmica, antes de que la glucosa se consuma en su totalidad; la trehalosa se sintetiza luego que la glucosa se ha consumido casi completamente haciendo uso de la glucosa residual y del etanol producido durante la fermentación.⁵²

La producción del glucógeno y la trehalosa se ilustran en la Fig. 3; comienza con la conversión de la glucosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato por la fosfoglucomutasa (Pgm1p y Pgm2p) y después a UDP-glucosa por la UDP-glucosa fosforilasa (Ugp1p). La expresión de PGM2 y UGP1 se estimula en diversas situaciones de estrés.^{36,54} La producción de glucógeno se inicia por la glucogenina, codificada por GLG1 y GLG2, la cual produce pequeñas cadenas unidas a ésta por enlaces α -1,4. Subsecuentemente, las cadenas son elongadas por la glucógeno sintasa (Gsy1p y Gsy2p) y se ramifica por la enzima ramificadora, Glc3p. La hidrólisis del glucógeno es catalizada por una enzima desramificadora (Gdp1p) y la glucógeno fosforilasa (Gph1p), la cual produce glucosa 1-fosfato. Esta vía es idéntica a la de las células de los mamíferos.⁵² La expresión de los genes GLG1, GSY1, GSY2, GLC3 y GPH1, se estimula en diversas condiciones de estrés.

Para la producción de trehalosa, la UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato se convierten primero en trehalosa 6-fosfato por acción de la trehalosa 6-fosfato sintasa (Tps1p) y luego en trehalosa por la trehalosa 6-fosfatasa (Tps2p). Tps1p y Tps2p son parte de un complejo que también contiene Tps1p y Tps3p. Estos son, probablemente genes alternativos, reguladores o subunidades estabilizadoras.^{101,102,178}

MECANISMOS PROPUESTOS DEL EFECTO DE LOS SOLUTOS COMPATIBLES

La trehalosa muestra características de estabilizador de proteínas y membranas bajo condiciones de estrés, especialmente durante la desecación; su efecto protector consiste en reemplazar a las moléculas de agua a través de las uniones polares de sus residuos, la trehalosa previene la desnaturalización de las proteínas y la fusión de membranas; además, forma cristales en estado seco, un proceso que puede ser requerido para la estabilización de las moléculas en estado deshidratado.⁴¹ Además, la trehalosa man-

tiene estables a las proteínas en altas temperaturas y pH ácido. Las propiedades protectoras de la trehalosa son claramente superiores a otros azúcares, tales como la sacarosa, convirtiendo a la trehalosa en un protector ideal contra el estrés.⁴¹

Hochachka y Somero (1984)⁷³ establecieron que en los animales multicelulares, los osmolitos orgánicos juegan un papel relativamente menor en el balance osmótico de los fluidos extracelulares. El razonamiento de apoyo a esta idea es que muchas de las maquinarias metabólicas y biosintéticas de los organismos multicelulares están en el compartimento intracelular. Durante un estrés hiperosmótico los osmolitos orgánicos, tales como aminoácidos libres, polioles y metilaminas, se acumulan en las células a concentraciones elevadas. Estos solutos no afectan la actividad enzimática como lo hacen las concentraciones elevadas de sales inorgánicas; por ello, se les llama solutos compatibles.¹⁶² La acumulación de estos solutos permite el funcionamiento de las enzimas intracelulares. Este patrón se demuestra, por ejemplo, en los invertebrados marinos (langostas, moluscos) que acumulan altas concentraciones de osmolitos orgánicos.⁶³

Los cambios en la osmolaridad externa disparan el flujo de agua a través del gradiente osmótico causando hinchamiento (y eventualmente la lisis) en medios hipotónicos o plasmólisis y la deshidratación bajo medios hipertónicos. Los solutos compatibles responden al problema de la elevada osmolaridad involucrando una respuesta bifásica en la cual aumentan los niveles de K/(glutamato), lo cual se ha observado como una respuesta primaria al fenómeno,⁴⁹ seguido de un dramático incremento en la concentración citoplasmática (síntesis/captación),⁵⁵ los cuales no interactúan con las proteínas; el papel de los solutos compatibles consiste en una estabilización efectiva de la función enzimática,³² otorgando protección contra la salinidad, alta temperatura, deshidratación y el estrés térmico.^{100,177}

Los principios moleculares de la función de los solutos compatibles de la exclusión preferencial de la superficie de las proteínas y de otras macromoléculas citoplasmáticas es la base para la compatibilidad de la naturaleza de los osmolitos.¹¹ Existen tres posibles explicaciones de la exclusión de esos solutos de la interfase proteína-agua. Un modelo propuesto por Bull y Breese³⁴ sugiere que los solutos compatibles pueden incrementar la tensión de superficie del agua, incrementando las fuerzas cohesivas con la estructura del agua, haciendo de esta manera más difícil romper las interacciones agua-agua, favoreciendo el complejo proteína-agua. La solvatación de la proteína con la baja tensión de superficie del agua es energéticamente más favorable, el volumen de agua puede tender a hidratar a la proteína exponiendo la alta tensión de superficie del agua a la superficie de la proteína. Segundo, al aumentar la tensión de su-

perficie, la incompatibilidad estérica juega un papel importante en la exclusión de osmolitos de las superficies macromoleculares. En contraste con el agua (mismo tamaño, polaridad y potencial de hidrógeno), que es capaz de acomodar casi toda la geometría de superficie de la proteína, muchos osmolitos orgánicos son largos, rígidos, repletos de grupos hidrógenos, que son preferencialmente excluidos de la superficie de la proteína, favoreciendo el contacto con las moléculas de agua. El tercer modelo, la explicación más trivial para la exclusión preferencial, se centra en la existencia de posibles fuerzas repulsoras entre los solutos y ciertos grupos de la superficie de la proteína.¹⁰³

En adición a la teoría de la protección por solutos; Cayley *et al.*³⁷ han propuesto que el volumen citoplasmático es el determinante fundamental del crecimiento bajo condiciones de estrés hiperosmóticas y que el efecto secundario del incremento del volumen por la acumulación de solutos compatibles (una consecuencia de la exclusión preferencial de las macromoléculas citoplasmáticas y componentes de membrana) es la clave para su función osmoprotectora. Así, los solutos compatibles pueden servir como un papel dual en la osmorregulación de las células, restaurando el volumen celular y la estabilización de la estructura de proteínas.³⁷

DEBARYOMYCES HANSENI

Como se mencionó en la introducción, fue Norkrans en 1966¹²¹ quien realizó los primeros estudios con levaduras marinas. Su trabajo se inició con el fin de comprobar si estas levaduras se reproducen en medios alcalinos, con altas concentraciones de sal (NaCl) y baja temperatura. Encontró una alta tolerancia a la sal para miembros del género *Debaryomyces*, *Pichia*, y *Candida*. Más tarde (Norkrans, 1968), estudió la respiración y la fermentación de *D. hansenii* y otras levaduras en diferentes medios con diferentes sustratos, y demostró que *D. hansenii* era la más tolerante al NaCl, mostrando hasta un 10% de su actividad aún cultivada en 4.4 M NaCl.¹²²

En 1969 Norkrans y Kylin,¹²³ mediante el uso de isótopos radioactivos, estudiaron la captación y retención de K⁺ y Na⁺ en *D. hansenii*, levadura considerada en esa época como halotolerante, y de *S. cerevisiae* una levadura menos tolerante al NaCl. Realizaron sus estudios en presencia de 4 mM, 0.68, 1.35 y 2.7 M de NaCl en el medio de crecimiento. Encontraron que la relación de la concentración de K⁺/Na⁺ es mayor en el interior de las células que en el medio, y que es mayor en *D. hansenii* que en *S. cerevisiae*. Sugirieron que esta diferencia entre las dos cepas puede deberse a la mayor capacidad de *D. hansenii* de expulsar el Na⁺ y captar K⁺.

El glicerol se ha sugerido como un agente osmótico en *D. hansenii*; Gustafsson y Norkrans^{67,95} estudiaron la con-

centración total, intracelular y extracelular de glicerol producido por esta levadura en presencia de 4 mM, 0.68 y 2.7 M de NaCl en el medio de crecimiento. La concentración de glicerol no fue directamente proporcional a la producción de biomasa, pero se encontró una concentración de 0.2, 0.8 y 2.6 M en la fase logarítmica, con las concentraciones respectivas en el medio de crecimiento. Adler y Gustafsson³ encontraron que el glicerol es el principal poli-ol sintetizado en la fase logarítmica, mientras que el arabinol se produce en la fase estacionaria al cultivarla en presencia de 4 mM y 2.7 M de NaCl en el medio de crecimiento; también evaluaron la poza de aminoácidos durante el crecimiento de *D. hansenii*, sin encontrar cambios drásticos en su composición. La cantidad total de aminoácidos libres, en relación con el peso seco fue de 15 a 50 % más baja en las células cultivadas en 2.7 M NaCl, en comparación con las que se cultivaron en presencia de 4 mM.

También se ha estudiado el crecimiento de *D. hansenii* en relación con el pH y la salinidad; *D. hansenii* es capaz de crecer más rápido en presencia de altas concentraciones de NaCl y en medio alcalino en comparación con *S. cerevisiae*. Sin embargo, a un pH de 5.2 disminuye el crecimiento de ambas células. El efecto puede atenuarse agregando sales de ácidos débiles al medio. Cuando *D. hansenii* crece en un medio alcalino, acumula mejor al K⁺ que al Na⁺ que cuando se crece en un medio más ácido.⁷²

Prista *et al.*,¹³⁹ estudiaron los efectos del KCl, NaCl y LiCl en el crecimiento de *D. hansenii*, usualmente considerada como levadura halotolerante, y compararon los efectos con *S. cerevisiae*. El KCl y NaCl tuvieron un efecto similar en *D. hansenii*, indicando que el NaCl sólo representa un estrés osmótico, mientras que el LiCl tuvo un efecto inhibitorio.

En medios con baja concentración de K⁺, el Na⁺ fue capaz de sustituir al K⁺, restaurando la relación del crecimiento específico y la biomasa final. La concentración interna de Na⁺ alcanzó valores de hasta 800 mM, sugiriendo que el metabolismo de *D. hansenii* no se afecta a esta concentración elevada de NaCl. Se ha propuesto que el metabolismo de *D. hansenii* es menos sensible al Na⁺ intracelular, en comparación con *S. cerevisiae*, que el Na⁺ sustituye al K⁺ cuando el K⁺ es escaso y que el transporte de K⁺ se favorece en presencia de Na⁺. En medios donde la concentración de K⁺ es baja, *D. hansenii* se comporta como una levadura halófila.¹³⁹

En presencia de 1 M de KCl o NaCl, *D. hansenii* muestra un aumento en el crecimiento. Muestra también una baja acidificación del medio que aumenta con el NaCl, así como un aumento de la capacidad de captación de ⁸⁶Rb⁺ y ²²Na⁺. El transporte de ⁸⁶Rb⁺ es saturable con valores de Km y Vmax más altos para las células cultivadas en NaCl 1 M, mientras que el transporte de ²²Na⁺ muestra un com-

ponente de difusión, que también es mayor en las células cultivadas en NaCl. Los niveles de ATP son mayores también en las células que se cultivan en NaCl. Al incubar con glucosa las células crecidas en presencia de KCl, alcanzan valores similares a las que crecieron en NaCl; estos datos fueron reportados por Thomé-Ortiz *et al*.¹⁶⁸ Estos autores proponen la existencia de tres posibles mecanismos de transporte de iones a) una ATPasa funcional que contribuye al bombeo de protones, que genera una diferencia en el potencial de membrana que es aprovechado para transportar K⁺ (ó Na⁺) a través de un uniportador; b) un sistema intercambiador de K⁺/H⁺; y c) un posible intercambiador catión/catión muy rápido.¹⁶⁸ Nosotros, por otra parte, encontramos que el transporte de sodio sí es saturable, y Thomé-Ortiz *et al.*, encontraron un comportamiento de difusión debido a que utilizaron concentraciones bajas de Na⁺ en su trabajo (datos no publicados).

Se han reportado aplicaciones biotecnológicas a *D. hansenii*^{42,45,65} uno de los aspectos en que esta levadura ha sido empleada es la producción de xilitol, que se utiliza ampliamente en la industria alimenticia por su poder endulzante, sus propiedades anticaries, y por la tolerancia que presentan los diabéticos a este poliol.

D. hansenii es la levadura más común encontrada en todo tipo de quesos, en contraste con otras especies de levaduras tales como *Candida vini* o *C. zeylanoides*, cuya presencia depende de las características del queso.⁵³ *D. hansenii* es también común en los productos lácticos,⁵³ congruente con su capacidad de crecer en presencia de sal y baja temperatura. Esta levadura es capaz de metabolizar ácido láctico y cítrico; esto implica una actividad proteolítica y lipolítica durante la maduración de los quesos. Aunque *D. hansenii* se considera no patógena, se ha presentado un caso de infección en hueso asociado con esta levadura.¹⁷⁹

También se ha evaluado la asimilación de carbohidratos, como pentosas y hexosas, ya sean solas o en mezclas de los dos azúcares. Se ha observado que el crecimiento de *D. hansenii* en presencia de pentosas es lento en comparación con las hexosas, pero los valores obtenidos en el rendimiento de biomasa son similares en presencia de cualquiera de estos azúcares. Sin embargo, cuando se mezclan estos dos tipos de azúcares, el consumo de una fuente de carbono no inhibe el consumo de la otra.¹¹⁷

El desarrollo de las técnicas moleculares se ha empleado para la construcción de pruebas específicas para la identificación rápida y precisa de un gran número de cepas aisladas de quesos;⁴⁰ se han desarrollado métodos rápidos y sensibles para la identificación de *D. hansenii*, basados en la hibridación de secuencias específicas para cada especie. La especificidad de esas pruebas se reafirma por la hibridación del DNA de varias especies de levaduras encontradas comúnmente en los quesos.

Otro avance más relacionado con el estudio de *D. hansenii* es la clonación y expresión de dos genes codificantes para la Na⁺-ATPasa; los dos genes fueron clonados y secuenciados. Los genes, designados ENA1 de *D. hansenii* (DhENA1 y DhENA2), mostraron alta homología con los correspondientes de *Schwanniomyces occidentalis*. DhENA1 se expresó en presencia de altas concentraciones de Na⁺, mientras que la expresión de DhENA2 requirió la presencia de un pH elevado.⁹

BIOTECNOLOGÍA

Algunos organismos halófilos extremos del phylum Archaea contienen pigmentos unidos a las membranas, la bacteriorrodopsina (BR) y halorrodopsina, que les permite usar la luz y convertirla para utilizarla en sus procesos bioenergéticos mediante la generación de gradientes de H⁺ y Cl⁻, respectivamente.¹²⁹ Otra aplicación de la BR es la renovación de la energía bioquímica; por ejemplo la conversión de ADP hacia ATP; tal como el sistema de reciclamiento solar el cual puede ser de interés en los procesos biotecnológicos que necesitan gran cantidad de ATP.⁶⁹ Otra aplicación patentada de la BR es su uso como un bioelemento en un sensor de movimiento¹ y de imágenes en biocomputadoras.⁸⁴

El interés biotecnológico por los solutos compatibles ha aumentado, y sus aplicaciones como biomoléculas estabilizadoras (enzimas, DNA, membranas) de células, antagonistas de las sales y agentes protectores contra el estrés. Uno de los osmolitos más abundantes es la ectoína. Las ectoínas son comunes en eubacterias aeróbicas heterotróficas.⁵⁵

Una de las aplicaciones más prometedoras es el uso de la ectoína como estabilizador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁵⁵

La trehalosa, un osmolito en varias bacterias halotolerantes, puede utilizarse como crioprotector para el congelamiento de biomoléculas, pero también para la conservación de los microorganismos, ya que la estructura de las membranas es preservada en presencia de este disacárido.⁵⁶

Los liposomas son usados en medicamentos y cosméticos para el transporte de los compuestos hacia sitios específicos en el cuerpo. Los lípidos unidos a éteres de halófilos del phylum Archaea tienen una alta estabilidad química y resistencia contra las esterasas y de esta manera tienen una alta tasa de sobrevivencia comparada con los liposomas que están basadas en derivados de ácidos grasos.^{56,57}

La mayoría de las enzimas de los microorganismos halófilos se inactivan o desnaturalizan a concentraciones por debajo de 1 M de NaCl.² Su alta solubilidad en soluciones altamente concentradas de NaCl dificulta la aplicación de

los procedimientos cromatográficos.⁴⁸ La adaptación de las enzimas halófilas a nivel molecular ha sido revisada por Madern *et al.*¹⁰⁵ Los aminoácidos activos son ampliamente usados como intermediarios en la semisíntesis de antibióticos, hormonas peptídicas y pesticidas. Una ruta quimioenzimática para la síntesis de D-aminoácidos involucra la conversión de DL-5-hidantoinas. Estas son asimétricamente hidrolizadas a N-carbamoyl D-aminoácido por una hidantoinasa específica (dihidro-pirimidasa). El producto es convertido químicamente a los correspondientes D-aminoácidos bajo condiciones ácidas. Joshi *et al.*,⁸⁰ patentó un proceso para la preparación de D(-)-N-carbamoylphenilglicina (CPG), usando hidantoinasa del halófilo *Pseudomonas* sp. ATCC 55940. La cepa fue aislada del agua de mar y se describe que creció en presencia de NaCl al 7% (w/v) y sintetizó de 5-6% de CPG en 10-15 h.

Una serina extracelular de un halófilo extremo, *Halo-bacterium halobium* (ATCC 43214), es un excelente catalizador para la síntesis de péptidos, particularmente para los péptidos que contienen glicina. La enzima requiere 4 M NaCl para obtener la actividad catalítica y la estabilidad óptima en soluciones acuosas.¹⁵⁴

Recientemente se aislaron de medios hipersalinos 99 cepas de la halotolerante *Bacillus*, la mayoría de las cuales crecen en medios con 20-25 % (w/v) de NaCl.⁵⁸ Su descubrimiento es de gran importancia biotecnológica porque muchos de estos microorganismos producen industrialmente muchas hidrolasas.

Los microorganismos halotolerantes juegan un papel esencial en varios procesos de fermentación que ocurren en presencia de sal; pueden catalizar la fermentación produciendo varios compuestos que dan el sabor y aroma de los productos finales.

Los organismos halofílicos producen una amplia variedad de biomoléculas estables que pueden ser usadas para aplicaciones prácticas; producen enzimas estables (enzimas hidrolíticas, tales como DNAasas, lipasas, amilasas, gelatinasas y proteasas) capaces de funcionar bajo condiciones que normalmente suelen llevar a la precipitación o desnaturalización de muchas proteínas. Las proteínas de los organismos halófilos compiten efectivamente con las sales para la hidratación, una propiedad que puede resultar en la resistencia en los medios con baja actividad de agua, como en presencia de solventes orgánicos.⁴³

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los organismos halófilos son una clase interesante de organismos extremofílicos que se han adaptado a condiciones hipersalinas, son capaces de competir exitosamente por el agua y resistir los efectos desnaturalizantes de las sales. Estos organismos aparecen en la mayoría de los géneros,

como por ejemplo: las algas verdes fotosintéticas, las cianobacterias, las bacterias púrpuras y verdes, las bacterias sulfuro oxidantes, anaerobios fermentativos, las bacterias reductoras de sulfato, las bacterias heterotróficas Gram-negativas y Gram-positivas.

El interés por conocer la diversidad de microorganismos que se encuentran en medios hipersalinos está creciendo gracias al estudio de los mecanismos moleculares de adaptación a las condiciones hipersalinas. Los organismos halófilos parecen excluir las sales por medio de la síntesis de una cantidad igual o mayor de solutos compatibles sin carga o mantener macromoléculas estables que puedan resistir los efectos desnaturalizantes de la sal. Los genes involucrados en la síntesis y acumulación de solutos compatibles y su regulación ha comenzado a ser el foco de recientes investigaciones.⁴⁵

Los mecanismos involucrados en la tolerancia de la levadura halófila *D. hansenii* a la sal y los propuestos por Prista *et al.*¹³⁹ continúan bajo investigación, y se ha logrado establecer algunas de sus características fisiológicas. En nuestro grupo de trabajo estudiamos la resistencia al estrés salino y alcalino de *D. hansenii*, algunas funciones metabólicas y la producción de algunos solutos compatibles, todo con el fin de obtener el conocimiento general de las características fisiológicas de esta levadura halófila, y contribuir en la caracterización general del comportamiento de los organismos halófilos. También pensamos realizar análisis de microarreglos, que nos pueden proporcionar datos cuantitativos, en los cuales podemos definir los niveles de expresión. Se pueden diseñar análisis de microarreglos, en los cuales se pueden instrumentar diferentes condiciones experimentales y tiempo de exposición a las diferentes condiciones de estrés y obtener datos sobre el curso del tiempo, con el cambio en los niveles de expresión y con ciertas limitaciones, podemos concluir también las razones de cambio. Datos similares pueden ser obtenidos de la expresión global de proteínas. Nosotros también podemos medir, el nivel y la proporción de cambio de muchos metabolitos durante la adaptación a cualquier condición de estrés.

La disponibilidad de las secuencias completas de genomas ha facilitado los avances en el campo de la adaptación osmótica. La comparación de los genomas, acoplados con el avance de la proteómica, facilita la rápida detección de nuevos sistemas empleados por los microorganismos halófilos o halotolerantes para adaptarse a las diversas formas de estrés en las cuales se encuentran.

Los análisis estructurales de algunos sistemas aislados usando técnicas como difracción de rayos X, acoplados con la reconstitución artificial de membranas, proporcionan información importante en relación con la estructura y función de esos sistemas aislados, complementado con un riguroso análisis cinético de los mecanismos de activación,

en relación con los estudios estructurales de los componentes del sistema, deben de indicarnos la presencia de ciertas modificaciones estructurales que puedan tener un papel en la respuesta a la osmoadaptación.

Los principales cambios que hay que aclarar es cómo las señales son percibidas, en relación con la amplia y compleja causa-efecto que se presenta bajo condiciones de estrés; dada la diversidad de los sistemas involucrados y las múltiples señales fisiológicas (osmolaridad interna/externa, presión de turgencia o los parámetros relacionados tales como la tensión de membrana), los mecanismos moleculares de osmoadaptación se mantienen aún no completamente entendidos.

Los organismos halófilos proveen oportunidades significativas para la biotecnología. Como resultado de los cambios naturales y los promovidos por el hombre, los ambientes hipersalinos van en aumento. Los ambientes hipersalinos pueden ser fácilmente creados por la concentración del agua de mar en medios áridos, principalmente en las lagunas costeras. Estos factores, junto con la presencia de nuevas biomoléculas estables en los organismos halófilos, sugieren que estos organismos pueden ser muy importantes en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Roberto Coria y M. En C. Victoriano Pérez-Vázquez por sus críticas y sugerencias realizadas a este manuscrito; también agradecemos la participación del técnico académico de la biblioteca C. D. Javier Gallegos Infante en la obtención del material bibliográfico.

El trabajo realizado en nuestro grupo fue apoyado por el proyecto IN-223999, del PAPIIT, de la Dirección de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, y por el proyecto 36070-N y Beca No. 127608, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCIAS

- Ackley, D.E. & C.L. Shieh. 1998. Thin film transistor biochemical sensor. Patent US5719033. 1998 February 17.
- Adams, M.W.W. & R.M. Kelly. 1995. Enzymes in extreme environments. Chem. Eng. News. 73:32-42.
- Adler, L. & L. Gustafsson. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 124:123-130.
- Adler, L., A. Blomberg & A. Nilsson. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 162:300-306.
- Aitken, D.M. & A.D. Brown. 1969. Citrate and glyoxylate cycles in the halophil, *Halobacterium salinarium*. Biochim. Biophys. Acta. 177:351-354.
- Aitken, D.M., A.J. Wicken & A.D. Brown. 1970. Properties of halophil nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase. Biochem. J. 116:125-134.
- Albertyn, J., S. Hohmann & B.A. Prior. 1994. Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. Curr. Genet. 25:12-18.
- Alepuz, P.M., A. Jovanovic., V. Reiser & G. Ammerer. 2001. Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. Mol. Cell 7:767-777.
- Almagro, A., C. Prista., B. Benito., M.C. Loureiro-Días & J. Ramos. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 183:3251-3255.
- Ansell, R., K. Granath., S. Hohmann., J.M. Thevelein & L. Adler. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J. 16:2179-2187.
- Arakawa, T. & S.N. Timasheff. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. Biophys. J. 47:411-414.
- Banuet, F. 1998. Signalling in yeast: an informational cascade with links to the filamentous fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:249-274.
- Bayley, R.M. & R.A. Morton. 1978. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 6:151-205.
- Baxter, R.M. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. Can. J. Microbiol. 5:47-57.
- Beck, F.X., A. Dörge., K. Thurau & W.G. Guder. 1990. Cell osmoregulation in the countercurrent system of the renal medulla: the role of organic osmolytes. pp.132-158. In: Beyenbach KW (ed) Cell volume regulation. Karger, Basel.
- Beck, F.X., A. Burger-Kentischer & E. Müller. 1998. Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 436:814-827.
- Ben-Amotz, A. & M. Avron. 1973. The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. Plant Physiol. 51:875-878.
- Ben-Amotz, A. & M. Avron. 1981. Glycerol and b-carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella parva*: a model system for biosolar energy conversion. Trends. Biochem. Sci. 6:297-299.
- Bickel-Sandkötter, S., W. Gärtner & M. Dane. 1996. Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. Arch. Microbiol. 166:1-11.
- Blomberg, A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol. Lett. 182:1-8.
- Bohnert, H.J., D.E. Nelson & R.G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7:1099-1111.
- Borowitzka, L.J. & A.D. Brown. 1974. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella parva*. The role of glycerol as a compatible solute. Arch. Microbiol. 96:37-52.
- Brewster, J.L., T. de Valoir., N.D. Dwyer., E. Winter & M.C. Gustin. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science. 259:1760-1763.
- Brock, T.D. 1975. Salinity and the ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. J. Gen. Microbiol. 89: 258-292.
- Brown, A.D. 1963. The peripheral structures of Gram-negative bacteria. IV. The cation sensitive dissolution of the cell membrane of the halophilic bacterium, *Halobacterium halobium*. Biochim. Biophys. Acta. 75:425-435.
- Brown, A.D. & C.D. Shorey. 1963. The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. J. Cell. Biol. 18:681-689.
- Brown, A.D. 1964. The development of halophilic properties in bacterial membranes by acylation. Biochim. Biophys. Acta. 93:136-142.

28. Brown, A.D. 1964. Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* 28:296-329.
29. Brown, A.D. & K.Y. Cho. 1970. The walls of extremely halophilic cocci. Gram-positive bacteria lacking muramic acid. *J. Gen. Microbiol.* 62:267-270.
30. Brown, A.D. & J.R. Simpson. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72:589-591.
31. Brown, A.D. 1974. Microbial water relations. Features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeasts. *J. Bacteriol.* 118:769-777.
32. Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40:803-846.
33. Brown, A. D. 1990. Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. Jhon Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Unites Kingdom.
34. Bull, H.B. & K. Breese. 1974. Surface tension of amino acid solutions: a hydrophobicity scale of the amino acid residues. *Arch. Biochem. Biophys.* 161:665-670.
35. Burg, M.B., E.D. Kwon & E.M. Peters. 1996. Glycerophosphocholine and betaine counteract the effect of urea on pyruvate kinase. *Kidney Int.* 50 (57):S100-S104.
36. Causton, H.C., B. Ren., S.S. Koh., C.T. Harbison., E. Kanin., E.G. Jennings., T.I. Lee., H.L. True., E.S. Lander & R.A. Young. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12:323-337.
37. Cayley, S., B.A. Lewis & M.T. Record Jr. 1992. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174:1586-1595.
38. Chang, L. & M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410:37-40.
39. Christian, J.H. B. & J.A. Waltho. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 65:506-508.
40. Corredor, M., A.M. Davila., C. Gaillardin & S. Casaregola. 2000. DNA probes specific for the yeast species *Debaryomyces hansenii*: useful tools for rapid identification. *FEMS Microbiology Letters.* 193:171-177.
41. Crowe, J.H., J.F. Carpenter & L.M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology.* 60:73-03.
42. Cruz, J.M., J.M. Domínguez., H. Domínguez & J.C. Parajó. 2000. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Lett.* 22:1895-1898.
43. DasSarma, S. & P. Arora. 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences.* 2001 Nature Publishing Group/www.els.net: 1-9.
44. De Virgilio, C., P. Piper., T. Boller & A. Wiemken. 1991. Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp104 and in the absence of protein synthesis. *FEBS Lett.* 288:86-90.
45. Domínguez, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Lett.* 20:53-56.
46. Donald, E.N., M. Koukoumanos & H.J. Bohnert. 1999. Myo-Inositol-Dependent Sodium Uptake in Ice Plant. *Plant Physiology.* 119:165-172.
47. Dundas, I.D., V.R. Srinivasan & Halvorson. 1963. A chemically defined medium for *Halobacterium salinarum* strain I. *Can. J. Microbiol.* 9:619-624.
48. Eisenberg, H., M. Mevarech & G. Zaccari. 1995. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv. Protein. Chem.* 43:1-62.
49. Epstein, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 3-78.
50. Eriksson, P., L. Andre., R. Ansell., A. Blomberg & L. Adler. 1995. Molecular cloning of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison to *GPD1*. *Mol. Microbiol.* 17:95-107.
51. Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews.* 24:469-486.
52. François, J. & J.L. Parrou. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:125-145.
53. Fleet, G.H. 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68:199-211.
54. Galinski, E.A. 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia.* 49:487-496.
55. Galinski, E.A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 273-328.
56. Galinski, E.A. & B.J. Tindall. 1992. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. pp.6-114. In: Herbert RH, Sharp RJ (eds.) *Molecular biology and biotechnology of extremophiles.* Blackie, Glasgow.
57. Gambacorta, A., A. Gliozzi & M. De Rosa. 1995. Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11:115-131.
58. Garabito, M.J., M.C. Márquez & A. Ventosa. 1998. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can. J. Microbiol.* 44:95-102.
59. Garcia-Perez, A. & M.B. Burg. 1991. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol. Rev.* 71:1081-1115.
60. Gasch, A.P., P.T. Spellman., C.M. Kao., O. Carmel-Harel., M.B. Eisen., G. Storz., D. Botstein & P.O. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.* 11:4241-4257.
61. Ghoram, J. 1995. Betaines in higher plants: biosynthesis and role in stress metabolism. pp.171-203. In: Wallsgrove R.M, ed. *Amino acids and their derivatives in higher plants.* Cambridge: Cambridge University Press.
62. Giaever, H.M., O.B. Styrvoid., I. Kaasen & A.R. Ström. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:2841-2849.
63. Gilles, R. 1987. Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. *Curr. Topics Membr. Transport* 30:205-247.
64. Ginzburg, M. 1969. The unusual membrane permeability of two halophilic unicellular organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 173:370-376.
65. Gfrio, F.M., C. Amaro., H. Azinheira., F. Pelica & M.T. Amaral-Collaco. 2000. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technol.* 71:245-251.
66. Gullans, S.R., J.D. Blumenfeld., J.A. Balschi., M. Kaleta., R.M. Brenner., C.W. Heilig & S.C. Hebert. 1988. Accumulation of major organic osmolytes in rat renal inner medulla in dehydration. *Am. J. Physiol.* 255:F626-F634.
67. Gustafsson, L. & B. Norkrans. 1976. On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 110:177-183.
68. Gustin, M.C., J. Albertyn., M. Alexander & K. Davenport. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1264-1300.
69. Groß, M. 1997. *Exzentriker des Lebens.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
70. Hamaide, F., D.J. Kushner & G.D. Sprott. 1983. Proton motive force and Na⁺/H⁺ antiport in a moderate halophile. *J. Bacteriol.* 156:537-544.
71. Hirayama, T., T. Maeda., H. Saito & K. Shinozaki. 1995. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (*HOR*) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249:127-138.

72. Hobot, J.A. & D.H. Jennings. 1981. Growth of *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* in relation to pH and salinity. *Exp. Mycol.* 5:217-228.
73. Hochachka, P.W. & G.N. Somero. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton, N.J: Princeton University Press.
74. Hochstein, L.I. & R. Bogomolni. 1999. GAT do extreme halophiles tell us about the evolution of the proton-translocating ATPases? pp.273-280. In A. Oren (ed.), *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
75. Hottiger, T., P. Schmutz & A. Wiemken. 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169:5518-5522.
76. Imhoff, J.F. & F. Rodríguez-Valera. 1984. Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* 160:478-479.
77. Iwahashi, H., S. Nwaka., K. Obuchi & Y. Komatsu. 1998. Evidence for the interplay between trehalose metabolism and Hsp104 in yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4614-4617.
78. Jamison, R.L. & W. Kriz. 1982. Urinary concentrating mechanism: structure and function. Oxford University Press, New York.
79. Johnson, M.K., E.J. Johnson., R.D. McElroy., H.L. Speer & B.S. Bruff. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J. Bacteriol.* 95:1461-1468.
80. Joshi, R., T. Ravindranathan., K.B. Bastawade., D.V. Gkhale., U.R. Kalkote & S.S. Sudge. 2000. Halophilic *Pseudomonas* strain having accession No. NCIM 5209 (ATCC 55940) and a process for preparing D(-)N-carbamoylphenylglycine using said strain. Patent US6121024. 2000 September 19.
81. Katz, A., U. Pick & M. Avron. 1989. Characterization and reconstitution of the Na⁺/H⁺ antiporter from the plasma membrane of the halophilic alga *Dunaliella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 983:1224-1229.
82. Kempf, B. & E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319- 330.
83. Keyse, S.M. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:186-192.
84. Kikura, M., Y. Seno & H. Tomioka. 1998. Bacterial type rhodopsin, bacterial type rhodopsin gene, recombinant DNA and production of bacterial type rhodopsin. Patent JP10150987. 1998 June 9.
85. Kultz, D. & M. Burg. 1998. Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J. Exp. Biol.* 201:3015-3021.
86. Kushner, D.J. 1968. Halophilic bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 10:73-99.
87. Kyriakis, J.M. & J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81:807-869.
88. Lai, M.C. & R.P. Gunsalus. 1992. Glycine betaine and potassium ion are the major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen *Methanohalophilus* strain Z7302. *J. Bacteriol.* 174:747-7477.
89. Lang, F., G.L. Busch., M. Ritter., H. Volkl., S. Waldegger., E. Gulbins & D. Haussinger. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78:247-306.
90. Langworthy, T.A., W.R. Mayberry & P.F. Smith. 1974. Long-chain glycerol diether and poly dialkyl glycerol triether lipids of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 119:106-116.
91. Lanyi, J.K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38:272-290.
92. Lanyi, J.K. & R.E. McDonald. 1976. Existence of electrogenic hydrogen/sodium antiport in *Halobacterium* cell envelope vesicles. *Biochemistry.* 15:4608-4614.
93. Lanyi, J.K. & M.P. Silverman. 1979. Gating effects in *Halobacterium halobium* membrane transport. *J. Biol. Chem.* 254:4750-4755.
94. Larsen, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilism. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1:97-132.
95. Larsson, C., C. Morales., L. Gustafsson & L. Adler. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* 172:1769-1774.
96. Larsson, K., P. Eriksson., R. Ansell & L. Adler. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 10:1101-1111.
97. Lewis, D.H. & D.C. Smith. 1976. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.* 66:143-184.
98. Lewis, J.G., R.P. Learmonth & K. Watson. 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 141:687-694.
99. Ligterink, W. & H. Hirt. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int. Rev. Cytol.* 201:209-275.
100. Lippert, K. & E.A. Galinski. 1992. Enzyme stabilization by ectoine type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:61-65.
101. Londesborough, J. & O. Vuorio. 1991. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex from bakers yeast: purification of a proteolytically activated form. *J. Gen. Microbiol.* 137:323-330.
102. Londesborough, J. & O.E. Vuorio. 1993. Purification of trehalose synthase from baker's yeast. Its temperature-dependent activation by fructose 6-phosphate and inhibition by phosphate. *Eur. J. Biochem.* 216:841- 848.
103. Low, P.S. 1985. Molecular basis of the biological compatibility of nature's solutes. pp.469-477. In: *Transport Processes Iono and Osmoregulation* (Gilles, R. and Gilles-Baillien, M., Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
104. Mackay, M.A., R.S. Norton & Borowitzka. 1984. Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:2177-2191.
105. Madern, D., C. Ebel & G. Zaccari. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4:91-98.
106. McLachlan, J. 1960. The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher a euryhaline organism. *Can. J. Microbiol.* 6:367-369.
107. Mager, W.H. & A.J. De Kruijff. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59:506-531.
108. Marchler, G., C. Schüller., G. Adam & H. Ruis. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12:1997-2003.
109. Marshall, C.L. & A.D. Brown. 1968. The membrane lipids of *Halobacterium halobium*. *Biochem. J.* 110:441-448.
110. Martinez-Pastor, M.T., G. Marchler., C. Schüller., A. Marchler-Bauer., H. Ruis & F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* 15:2227-2235.
111. Marré, E. & O. Servettaz. 1959. Sul meccanismo di adattamento a condizioni osmotiche estreme in *Dunaliella salina*. II. Rapporte fra concentrazione del mezzo esterno e composizione del succo cellulare. *Tai. Acad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. Fis. Mat. Natur. Ser.8.* 25:567-575.
112. Meikle, A.J., R.H. Reed & G.M. Gaad. 1988. Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. G. Microbiol.* 134:3049-3060.
113. Moskvina, E., C. Schüller., C.T.C. Maurer., W.H. Mager & H. Ruis. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* 14:1041-1050.
114. Lanyi, J.K. 1995. Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *Nature.* 75:461-463.
115. Nanjo, T., M. Kobayashi., Y. Yoshida., Y. Kakubari., K. Yamaguchi-Shinozaki & K. Shinozaki. 1999. Antisense suppress-

- sion of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 461:205-210.
116. Nissen, T.L., M. Anderlund., J. Nielsen., J. Villadsen & M.C. Kielland-Brandt. 2001. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. Yeast 18:19-32.
 117. Nobre, A., C. Lucas & C. Leão. 1999. Transport and utilization of hexosas and pentosas in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Appl. Environ. Microbiol. 65:3594-3598.
 118. Norbeck, J., A.K. Pählman., N. Akhtar., A. Blomberg & L. Adler. 1996. Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3- phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J. Biol. Chem. 271:13875-13881.
 119. Norbeck, J. & A. Blomberg. 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. J. Biol. Chem. 272:5544- 5554.
 120. Norbeck, J. & A. Blomberg. 2000. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 16:121-137.
 121. Norkrans, B. 1966. Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. Archiv. Für Mikrobiologie. 54:374-392.
 122. Norkrans, B. 1968. Studies on marine occurring yeast: Respiration, fermentation and salt tolerance. Archiv. Für Mikrobiologie. 62:358-372.
 123. Norkrans, B. & A. Kylin. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. J. Bacteriol. 100-2:836-845.
 124. Onishi, H. 1960. studies on osmophilic yeasts. Part IX. Isolation of a new obligate halophilic yeast and some consideration on halophilism. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn. 24:226-230.
 125. Onishi, H. 1963. Osmophilic yeasts. Adv. Fodd Res. 12:53-94.
 126. Onishi, H., M.E. McCance & N.E. Gibbons. 1965. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 11:365-373.
 127. Oren, A. 1986. Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halo-bacteroides halobius*. Can. J. Microbiol. 32:4-9.
 128. Oren, A., M. Haldal & S. Norland. 1997. X-ray microanalysis of intracellular ions in the anaerobic halophilic eubacterium *Haloanaerobium praevalens*. Can. J. Microbiol. 43:588-592.
 129. Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 334-348.
 130. Pählman, A.K., K. Granath., R. Ansell., S. Hohmann & L. Adler. 2001. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 276:3555-3563.
 131. Papageorgiou, G.C. & N. Murata. 1995. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II com plex. Photosynthesis Research. 44:243-252.
 132. Park, J.I., C.M. Grant., P.V. Atfield & I.W. Dawes. 1997. The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. Appl. Environ. Microbiol. 63:3818-3824.
 133. Parrou, J.L., M.A. Teste & J. François. 1997. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. Microbiology. 143:1891-1900.
 134. Pascual-Ahuir, A., R. Serrano & M. Proft. 2001a. The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 21:16-25.
 135. Peterson, D.P., K.M. Murphy., R. Ursino., K. Streeter & P.H. Yancey. 1992. Effects of dietary protein and salt on rat renal osmolytes: covariation in urea and GPC contents. Am. J. Physiol. 263:F594-F600.
 136. Pocard, J.A., L.T. Smith., G.M. Smith & D. Le Rudulier. 1994. A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. J. Bacteriol. 176:6877-6884.
 137. Posas, F., J.R. Chambers., J.A. Heyman., J.P. Hoefler., E. de Nadal & J. Arino. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. J. Biol. Chem. 275:17249-17255.
 138. Posas, F. 2001. Personal communication.
 139. Prista, C., A. Almagro., M.C. Loureiro-Días & J. Ramos. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *D. hansenii*. Appl. Environ. Microbiol. 63:4005-4009.
 140. Proft, M. & R. Serrano. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. Mol. Cell. Biol. 19:537-546.
 141. Proft, M., S. Pascual-Ahuir., E. de Nadal., J. Arino., R. Serrano & F. Posas. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. EMBO J. 20:1123-1133.
 142. Rathinasabapathi, B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. Ann. Botany. 86:709-716.
 143. Rast, D.M. & G.E. Pfyffer. 1989. Botanical Journal of the Linnean Society. 99:39-45.
 144. Rengpipat, S., S.E. Lowe & J.G. Zeikus. 1988. Effect of extreme salt concentrations on the physiology and biochemistry of *Halo-bacteroides acetoethylicus*. J. Bacteriol. 170:3065-3071.
 145. Rep, M., V. Reiser., U. Holzmüller., J.M. Thevelein., S. Hohmann., G. Ammerer & H. Ruis. 1999b. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. Mol. Cell. Biol. 19:5474-5485.
 146. Rep, M., M. Krantz., J.M. Thevelein & S. Hohmann. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. J. Biol. Chem. 275:8290-8300.
 147. Rep, M., M. Proft., F. Remize., M. Tamas., R. Serrano., J.M. Thevelein & S. Hohmann. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. Mol. Microbiol. 40:1067-1083.
 148. Rhodes, D. & A.D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Plant Mol. Biol. 44:357-384.
 149. Rhodes, D. & Y. Samaras. 1994. Genetic control of osmoregulation in plants. pp.347-361. In "Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation" (S.K. Strange, Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
 150. Robertson, D.E., M.F. Roberts., N. Belay., K.O. Stetter & D.R. Boone. 1990. Detection of the osmoregulator betaine in methanogens. Appl. Environ. Microbiol. 56:563-565.
 151. Robertson, D.E., M.C. Lai., R.P. Gunsalus & M.F. Roberts. 1992. Composition, variation, and dynamics of major osmotic solutes in *Methanohalophilus* strain FDF1. Appl. Environ. Microbiol. 58:2438-2443.
 152. Rodríguez-Navarro, A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. Biochim. Biophys. Acta 1469:1-30.
 153. Ruis, H. & C. Schüller. 1995. Stress signaling in yeast. Bioessays 17:959-965.

154. Ryu, K., J. Kim & J.S. Dordick. 1994. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microb. Technol.* 16:266-275.
155. Sauer, T. & E.A. Galinski. 1998. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol. Bioeng.* 57:306-313.
156. Scarr, M.P. & D. Rose. 1966. Study of osmophilic yeasts producing invertase. *J. Gen. Microbiol.* 45:9-16.
157. Schmitt, A.P. & K. McEntee. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5777-5782.
158. Schüller, G., J.L. Brewster., M.R. Alexander., M.C. Gustin & H. Ruis. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* 13:4382-4389.
159. Siderius, M. & W.H. Mager. 1997. The general stress response in search for a common denominator. pp.213-230. *In* S. Hohmann and W. H. Mager (ed.), *Yeast stress responses*. R.G. Landes Company, Austin, TX.
160. Sizeland, P.C., Chambers, S.T., Lever, M., Bason, L.M. & R.A. Robson. 1993. Organic osmolytes in human and other mammalian kidneys. *Kidney Int.* 43(2): 448-453.
161. Snyder, F. *Ether lipids. Chemistry and Biology.* 1972. (ed.). Academic Press Inc., New York.
162. Somero, G.N. & P.H. Yancey. 1997. Osmolytes and cell volume regulation: physiological and evolutionary principles. pp.441-484. *In*: Hoffman JF Jamieson JD (eds.) *Handbook of physiology; Section 14: cell physiology.* Oxford University Press, New York.
163. Strom, A.R. & I. Kaasen. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* 8:205-210.
164. Talibart, R., M. Jebbar., G. Gouesbet., S. Himdi-Kabbab., H. Wroblewski., C. Blanco & T. Bernard. 1994. Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J. Bacteriol.* 176(17):5210-5217.
165. Thevelein, J.M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* 48:42-59.
166. Thevelein, J.M., & J.H. de Winde. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33: 904-918.
167. Thevelein, J.M., L. Cauwenberg., S. Colombo., J.H. de Winde., M. Donation., F. Dumortier., L. Kraakman., K. Lemaire., P. Ma., D. Nauwelaers., F. Rolland., A. Teunissen., P. Van Dijck., M. Versele., S. Wera & J. Winderickx. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 26:819-825.
168. Thomé-Ortíz, P., A. Peña & J. Ramírez. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentration of KCl and NaCl. *Yeast.* 14:1355-1371.
169. Trezzi, M., G. Galli & F. Bellini. 1965. The resistance of *Dunaliella salina* to osmotic stresses. *A. Bot. Ital.* 72:255-263.
170. Treger, J.M., T.R. Magee & K. McEntee. 1998. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243:13-19.
171. Trollmo, C., L. André., A. Blomberg & L. Adler. 1988. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:321-326.
172. Van Auken, O.W. & I.B. McNulty. 1968. Some growth characteristics of a halophilic *Chlamydomonas*. *Proc. Utah Acad. Sci.* 45:312-313.
173. Van Uden, N. 1968. Marine Yeasts. *Advances in Microbiology of the Sea.* pp. 168-201. Ed. M.R. Droop and E.S. Ferguson Wood. Vol. 1. Academic Press London and New York.
174. Ventosa, A., J.J. Nieto & A. Oren. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:504-544.
175. Volcán, B.E. 1944. The microorganisms of the Dead Sea. pp.71-85. *In* Papers collected to commemorate the 70th anniversary of Dr. Chaim Weizmann. Daniel Sieff Research Institute, Rehovoth, Israel.
176. Walsby, A.E. 1971. The pressure relationships of gas vacuoles. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 178:301-326.
177. Welsh, D.T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:263-290.
178. Winderickx, J., J.H. de Winde., M. Crauwels., A. Hino., S. Hohmann., P. Van Dijck & J.M. Thevelein. 1996. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol. Gen. Genet.* 252:470-482.
179. Wong, B., T.E. Kiehn., F. Edwards., E.M. Bernard., R.C. Marcove., E. de Harven & D. Armstrong. 1982. Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. *J. Clin. Microbiol.* 16:545-548.
180. Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:230-262.
181. Zahringer, H., J.M. Thevelein & S. Nwaka. 2000. Induction of neutral trehalase *nth1* by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Mol. Microbiol.* 35:397-406.

Correspondence to:

J.C. González-Hernández
 Departamento de Genética Molecular,
 Instituto de Fisiología Celular,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 México, D.F. C.P. 04510, A.P. 70-242,
 Tel. 56 22 56 33, Fax. 56 22 56 30.
 E-mail: jgonza@ifisiol.unam.mx

Factores que influyen en el transporte del potasio en la levadura

Juan Carlos González-Hernández¹, Victoriano Pérez-Vázquez² y Antonio Peña¹

Dpto. de Genética Molecular¹ y Bioquímica², Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Resumen

El transporte del potasio es fundamental para todas las células. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se propuso como un intercambiador H^+/K^+ dependiente del potencial redox. Sin embargo, posteriormente se demostró que hay una ATPasa que bombea protones y genera un potencial electroquímico que impulsa al K^+ al interior por un transportador diferente. Mediante experimentos en la levadura intacta, el aislamiento y la reconstitución de los sistemas de transporte H^+ -ATPasa/transportador de K^+ , se ha demostrado que los sistemas funcionan por separado. Además, se han clonado los genes de ambos sistemas. De hecho, *S. cerevisiae* contiene dos sistemas de captación de K^+ (Trk1p y Trk2p). También hay varios intercambiadores H^+/K^+ que parecen tener importancia para la regulación del pH interno y la acumulación de K^+ en la levadura. Además, se ha caracterizado un canal de K^+ , el cual permite la salida del K^+ citosólico.

Palabras Clave: Transporte, potasio, levadura.

Abstract

Potassium transport is fundamental within the cell. The first redox potential dependent H^+/K^+ antiporter was proposed to exist in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In addition, an ATPase that pumps protons and generates an electrochemical gradient was described later. This gradient provides the energy for the active uptake of K^+ through different transporters. In experiments with whole cells and in the isolated or reconstituted H^+ -ATPase/ K^+ transporter systems, it was demonstrated that these systems function independently. In addition, the genes of both systems have been cloned. In fact, *S. cerevisiae* contains two K^+ uptake systems (Trk1p and Trk2p). There are also several exchangers H^+/K^+ that seem to be important for the regulation of internal pH and for the

regulation of K^+ transport in the yeast. In addition, a K^+ channel has been characterized, which allows the efflux of cytosolic K^+ .

Key words: Transport, potassium, yeast.

Introducción

El ión potasio (K^+) es un componente indispensable para todas las formas celulares, y todas dependen de la captación, y eventualmente de la liberación de K^+ para crecer y mantenerse. Es también conocido que las células en la mayoría de los medios naturales contienen altas concentraciones de K^+ en su interior, usando diferentes tipos de transporte. Los primeros experimentos enfocados para explicar el mecanismo de la captación del K^+ en células eucarióticas (diferentes a las de mamífero), mostraron que en las levaduras el K^+ parecía ser intercambiado por protones (H^+) (1, 2).

Probablemente fue la levadura *S. cerevisiae* el organismo en el cual se realizaron los primeros estudios formales sobre el transporte de iones, en especial del K^+ . El grupo de Conway observó primero la producción de una gran cantidad de ácido (H^+) por la levadura (3), y realizó estudios orientados a definir el mecanismo del transporte del K^+ , en los cuales observó una relación prácticamente estequiométrica de 1:1 entre la entrada de K^+ y la salida de H^+ al medio durante la fermentación (3). Esto lo llevó a postular que la entrada de K^+ y de otros iones a la célula se lleva a cabo preferentemente por un sistema de transporte o acarreador fisiológico de K^+ , y se propuso una "bomba" que podía funcionar al mismo tiempo como una bomba de protones, produciendo el intercambio de K^+ por H^+ , mediante un mecanismo eléctricamente neutro, impulsado por el potencial redox de la célula (4, 5). Este es un proceso importante, no sólo para la célula, sino también desde el punto de vista industrial; *S. cerevisiae*, al entrar en contacto con el medio, tiene la capacidad de acidificarlo expulsando H^+ en intercambio con K^+ , y dado que las fermentaciones industriales suelen llevarse a cabo en anaerobiosis, ello le permite apoderarse de él, en contra de otros microorganismos que no tienen la capacidad de sobrevivir en medio ligeramente ácido.

Una parte del problema se resolvió a partir de los experimentos de Rothstein y Demis (6), quienes encontraron que la fermentación se estimula en presencia de K^+ extracelular, en otro estudio la adición de K^+ también estimula la respiración (7).

Mediante experimentos de transporte y aplicaciones cinéticas, también fue la levadura en la que por primera vez se demostró la presencia de un acarreador de K^+ (8, 9), pero manteniendo la hipótesis de la existencia de un intercambiador que transporta simultáneamente los H^+ al exterior y el K^+ al interior, ambos en contra de un gradiente de concentración, inducido por la energía libre de las reacciones de óxido-reducción del metabolismo celular (5).

Algunos años después, Peña y cols. (10) propusieron la existencia de una bomba de protones en la forma de una ATPasa, capaz de bombear protones y generar un potencial electroquímico, negativo y alcalino en el interior de la célula, cuyo componente eléctrico representa el impulso que permite al K^+ entrar a la célula por un transportador diferente de la ATPasa. Poco después, el grupo de Slayman demostró que la ATPasa de la membrana plasmática en células de *Neurospora crassa* utiliza energía libre hidrolizando ATP para bombear H^+ fuera de la célula (11). También mediante estudios en la levadura intacta, Peña y Ra-

mírez (12) demostraron que el transporte del K^+ tiene lugar mediante el mecanismo propuesto por el grupo de Slayman.

En otros experimentos, Peña y cols. (10) observaron que el pH alcalino del medio de incubación sin K^+ también estimula ambos procesos celulares (fermentación y respiración), y que éste se acompaña de una salida rápida de H^+ ; además de que la salida de H^+ se acelera al agregar K^+ , pero sólo cuando el pH del medio es ácido (4.0). Se encontró que tanto la adición de K^+ como el aumento del pH del medio producen una rápida disminución de los niveles de ATP y un aumento de ADP y fosfato inorgánico (6, 12). Dado que el elemento común es un aumento del bombeo de protones al exterior, de acuerdo con la teoría quimiosmótica de Mitchell (13, 14), se propuso que en ambos casos se estimula la actividad de una ATPasa que bombea protones al exterior y que, ante la adición del K^+ , el potencial transmembranal, que impulsa al K^+ al interior, se abate, aumentando la actividad de la ATPasa y el bombeo de protones. En vista de que esta ATPasa se estimula en medio alcalino, en el cual no hay transporte de potasio sino sólo el bombeo de protones, se propuso su existencia como una entidad separada, pero acoplada al transporte del K^+ a través del potencial electroquímico.

Otro enfoque para demostrar que el transporte del K^+ implicaba dos sistemas diferentes, una ATPasa de protones y un acarreador del catión, consistió en utilizar diversos inhibidores, entre los cuales se encuentran las alquilguanidinas y algunos colorantes como safranina, azul de metileno, bromuro de etidio, etc. (12, 15, 16), que inhiben el transporte del potasio, pero no el bombeo de protones.

Las alquilguanidinas inhiben el transporte de K^+ competitivamente sin alterar la salida de protones (15); este efecto se demostró de manera contundente al utilizar bromuro de etidio (12), permitiendo separar la actividad de bombeo de H^+ de la del transporte del K^+ .

En *N. crassa* el efecto del pH extracelular sobre el transporte de cationes sugirió que la entrada de K^+ y la salida de H^+ se pueden explicar en términos de la existencia de una bomba de protones (11).

En esta revisión, discutiremos brevemente los factores que influyen en el transporte del K^+ como el potencial de membrana, el pH del medio y las vías involucradas en el transporte de K^+ .

El potencial de membrana y el transporte del K^+

Mitchell postuló que el intermediario en la fosforilación oxidativa era un gradiente de protones creado a través de la membrana (13, 14). La idea central de su hipótesis establece que la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias o de las bacterias aeróbicas está acoplada a la síntesis de ATP mediante un potencial electroquímico de protones $\Delta\mu_H^+$, el cual se crea a través de las membranas transductoras de energía y el cual es necesario también para mover los iones al interior de las mitocondrias (o las bacterias) en contra del gradiente de concentración química mediante sistemas de transporte específicos. Otra de las contribuciones importantes de Mitchell consistió en postular que la ATPasa mitocondrial, al hidrolizar al ATP, puede bombear protones al exterior de la membrana, pero que es una enzima reversible, que en presencia del gradiente electroquímico de H^+ lo utiliza para sinteti-

zar el ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico; propuso inclusive cambiar el nombre de ATPasa por ATP sintetasa o sintasa (13, 14).

Los experimentos ya mencionados en la levadura condujeron al planteamiento de la existencia de una bomba de protones en la membrana plasmática. Esto se demostró en los trabajos de Peña y cols. (10) sobre el efecto del pH y del K^+ sobre la glucólisis y la respiración en las levaduras, donde plantearon la posible existencia de una ATPasa que funciona como una bomba de H^+ , que consume una fracción apreciable del ATP celular, que se inhibe por altas concentraciones de H^+ en el medio y que se estimula al aumentar el pH o por la presencia de potasio (10, 13).

En experimentos con desacoplantes se observó que, con glucosa como sustrato, se inhibe el transporte del K^+ sin disminuir los niveles de ATP, y que su efecto depende de la dirección de los gradientes combinados de H^+ y K^+ o del potencial electroquímico de la célula, de acuerdo con la capacidad reportada para conducir H^+ a través de la membrana. Esto demostró la existencia de una bomba de H^+ (H^+ -ATPasa), responsable de crear el potencial electroquímico que involucra el transporte de potasio de una forma acoplada pero independiente (12), de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica (14).

Hay varios mecanismos para la formación de los potenciales electroquímicos a través de las membranas biológicas. Desde luego que en la levadura el más importante es el generado por el bombeo de H^+ por la ATPasa de la membrana plasmática, y se pueden cuantificar, según el mecanismo, por la teoría de Nernst o la de Donnan que permiten calcular la magnitud del potencial o describir la relación de concentración de los iones.

El K^+ , al acumularse utiliza y por tanto disminuye el potencial de membrana formado por el bombeo de H^+ , permitiendo aumentar el gradiente de protones (ΔpH) y disminuyendo en parte el gradiente eléctrico ($\Delta \Psi$), cuyo valor aún se discute, pero que se estima en cerca de -200 mV en *S. cerevisiae* (17).

La confirmación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática como componente responsable del bombeo de H^+ capaz de generar un gradiente electroquímico, provino de estudios con mutantes de la levadura deficientes en la respiración y con inhibidores de la ATPasa de membrana plasmática. Con estas mutantes de *S. cerevisiae*, Serrano (18) observó que el dietilestilbestrol y la dicitlohexilcarbodiimida (DCCD) inhiben la actividad de la ATPasa y el bombeo de H^+ de una manera específica, sin afectar los niveles de ATP celular ni la permeabilidad de los protones; con lo que concluyó que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática está implicada en el bombeo de protones en la levadura.

Posteriormente, se obtuvo evidencia más directa de la actividad del bombeo de H^+ por la ATPasa de membrana plasmática y la electrogenicidad del proceso, al purificar la enzima y reconstituirla en liposomas, tanto a partir de *S. cerevisiae* (19), como de *Schizosaccharomyces pombe* (20). En estos sistemas, el ATP se hidroliza del lado externo de la membrana y la entrada de H^+ genera un potencial de membrana positivo en el interior durante la hidrólisis. La naturaleza electrogénica del bombeo de H^+ , se demostró por la transposición de H^+ que sólo tiene lugar en presencia del K^+ y el ionóforo valinomicina para compensar las cargas.

Finalmente, Serrano y cols. (21) clonaron y obtuvieron la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la enzima H^+ -ATPasa de *S. cerevisiae*, y otros investigadores las de otras levaduras y hongos (22).

Los cambios del pH intracelular y el transporte de H⁺ en *S. cerevisiae*

Durante la actividad metabólica celular se genera una diversidad de compuestos que tienden a producir una acidificación interna; por esta razón, la medida del pH interno es un tema de importancia en el área, ya que el pH determina distintas características importantes de la estructura y actividad de varias moléculas y procesos biológicos (incluyendo los de transporte) y, por lo tanto, del comportamiento general de las células. Si además una buena parte de los fenómenos de transporte de la levadura dependen de la actividad de una ATPasa que bombea H⁺ al exterior, es necesario tener información sobre los cambios del pH intracelular, pues esta H⁺-ATPasa, aumenta su actividad cuando la célula transporta K⁺, o al aumentar el pH del medio.

Ya sea por un método o por otro, los diferentes grupos de investigación han tratado de determinar los valores y la respuesta del pH interno ante diferentes condiciones de incubación. Así, Peña y cols. (10), reportaron que el pH externo influye de una manera directa en el pH interno, y si se añade glucosa como sustrato, el pH aumenta, gracias al bombeo de protones. Este dato fue confirmado posteriormente mediante una técnica más precisa (23)

Por otro lado, el pH celular también depende del estado metabólico de la célula y de las diferentes condiciones de cultivo; pero a pesar de que existe una tendencia de la célula a mantener la concentración interna de H⁺ dentro del intervalo de operación óptima de varias enzimas citoplásmicas (24), es claro que la constancia del pH intracelular representa un estado estacionario y no de equilibrio real, en el que participan, inclusive, como en el caso de *S. cerevisiae*, la producción de ácido carbónico y otros ácidos orgánicos débiles por parte de la célula (25).

La regulación del pH interno de la levadura

El principal mecanismo por el cual la levadura se deshace de los protones consiste en su transposición a través de la membrana por medio de la H⁺-ATPasa, con lo cual retiene una cantidad considerable de aniones de ácidos débiles producto de su metabolismo. Esto lleva a la discusión sobre el papel regulador de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática sobre el pH interno de la célula. Considerando que es esta enzima la que se deshace de una gran parte de los H⁺ derivados del metabolismo, podría decirse que sí regula el pH interno; sin embargo, parece tratarse más bien de una capacidad de la enzima simplemente para bombear más H⁺ mientras más haya, pero no a un papel regulador propiamente dicho (24).

El bombeo de H⁺ por parte de la H⁺-ATPasa da lugar a que el medio externo se acidifique; pero en presencia de glucosa, que se esperaría produjera valores más bajos de pH que en presencia de etanol, por la producción de CO₂ y el ácido carbónico derivado de su hidratación, en realidad es más alto (5, 25). De esta manera, el bombeo de H⁺ por la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, en especial a valores altos de pH externo, o aún a pH bajos en presencia de K⁺, da lugar a una alcalinización del citoplasma, como resultado neto de la acumulación de bicarbonato (7, 10). Resulta entonces que la ATPasa es más bien la responsable de los cambios, que la reguladora del pH interno.

La regulación del pH interno requiere de un mecanismo que evite una exagerada alcalinización en presencia de glucosa, tanto a un pH alto del medio, como en presencia de K^+ . Al respecto, se ha propuesto que hay un intercambiador H^+/K^+ que tiene la función de expulsar al catión monovalente a cambio de H^+ y así evitar la alcalinización exagerada del citoplasma (26). Otros grupos han propuesto intercambiadores con función semejante, como el considerado originalmente Na^+/H^+ , codificado por el gen Nah1 (27). Se ha identificado otro intercambiador semejante en el interior celular (28). No obstante, el problema está todavía lejos de resolverse.

Los sistemas de transporte del K^+

Los estudios cinéticos que se han realizado sobre el transporte de K^+ indican que se trata de un sistema complejo, porque varios factores importantes como el potencial de membrana y el pH del medio, entre otros, influyen directamente. Rothstein y Bruce (9) y Conway y Duggan (8) demostraron que el transporte de K^+ obedece a una cinética de saturación del tipo Michaelis-Menten, lo cual indica la participación de un sistema de transporte. También Armstrong y Rothstein (29) encontraron una cinética de competencia entre los distintos cationes monovalentes, lo cual indica que aún el Na^+ entra a la célula por el mismo transportador que el K^+ .

El grupo de Borst-Pauwels (30) encontró también una estimulación del transporte de cationes monovalentes por influencia de otros iones en el medio de incubación, pero a concentraciones muy pequeñas. A partir de estos estudios, Haro y Rodríguez-Navarro (31) propusieron un modelo para el transportador del potasio, en el que el transportador mete los iones de dos en dos. En 1984, Rodríguez-Navarro y Ramos observaron que la cinética del transporte varía significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento y ensayo (32). En un sistema con células en crecimiento, la situación es más compleja, porque se manifiestan dos sitios de interacción o dos sistemas de transporte diferentes (33), uno de baja afinidad que se expresa en levaduras cultivadas a concentraciones relativamente altas de K^+ , con una K_m de 2 mM, y otro de alta afinidad con una K_m de 20 μ M, que se presenta cuando la concentración de K^+ en el medio de crecimiento se reduce a 5 μ M. Estos sistemas de transporte no sólo difieren en su cinética, sino también en su dependencia del pH y de la temperatura, sensibilidad a desacoplantes y respuesta a cambios del ATP. La existencia de estos dos sistemas de transporte se confirmó al clonar y secuenciar los genes correspondientes, TRK1 y TRK2 y obtener las mutantes respectivas (34, 35).

Serrano y Rodríguez-Navarro (36) clonaron y secuenciaron el gen de la ATPasa de H^+ , tipo P, codificada por Pma1 (Fig. 1, No. 1) que energiza la membrana plasmática, creando un potencial transmembranal que probablemente varía entre -100 y -250 mV y un gradiente de pH de 2-4 unidades. El potencial de membrana impulsa la captación de K^+ vía los transportadores Trk1p y Trk2p (Fig. 1, No. 2) y por canales no selectivos de cationes de Na^+ y K^+ , lo cual se confirmó en plantas, pero no en las levaduras (Fig. 1, No. 3). El Na^+ es expulsado por otra ATPasa tipo P codificada por el gen ENA1 (Fig. 1, No. 4) y por los antiportadores electroneutros codificados por Nha1 (Fig. 1, No. 5). La compartimentalización vacuolar del Na^+ parece estar mediada por un antiportador Na^+/H^+ , codificado por el gen Nhx1 (Fig. 1, No. 6), energizado por el gradiente de pH desarrollado por la H^+ -ATPasa vacuolar de tipo V, codi-

ficada por el gen *Vma* (Fig. 1, No. 7). (37). Además se ha caracterizado un canal rectificador de K^+ (TOK1) que promueve la salida del mismo catión (Fig. 1, No. 8) (37).

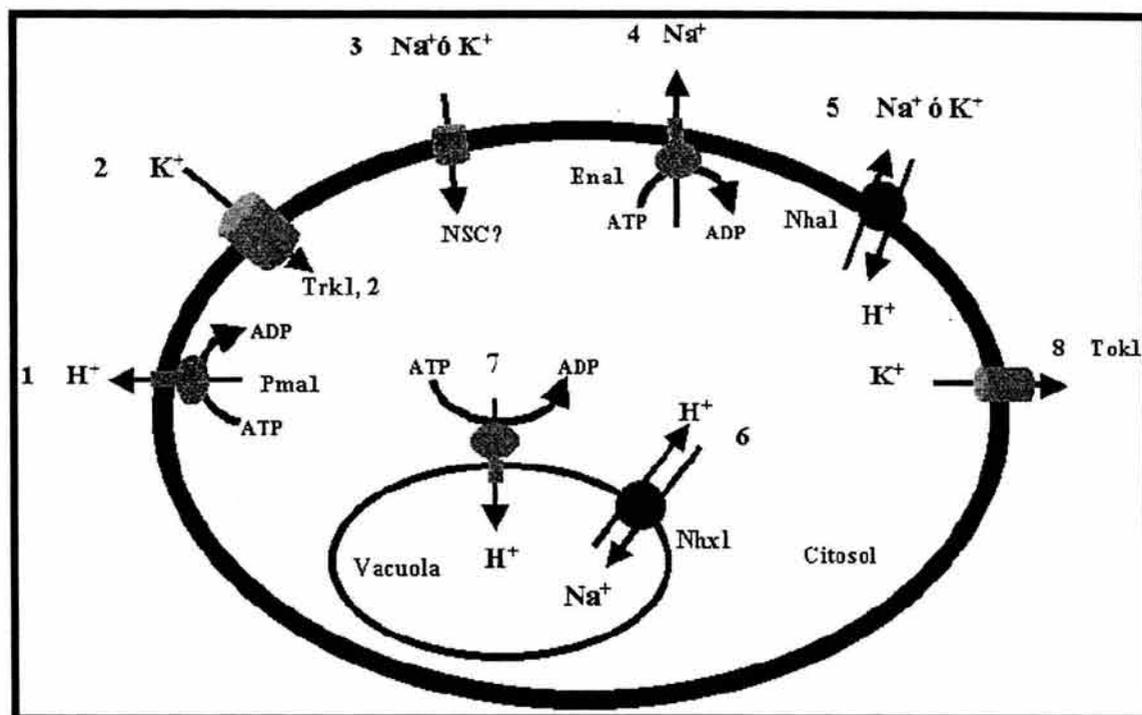


Figura 1. Principales sistemas de transporte de K^+ en *Saccharomyces cerevisiae*. No. 1, ATPasa de H^+ tipo P codificada por *Pma1*; No. 2, transportadores *Trk1p* y *Trk2p*; No. 3, canales no selectivos de cationes de Na^+ y K^+ ; No. 4, ATPasa tipo P codificada por el gen *Ena1*; No. 5, antiportador electroneutro codificado por *Nha1*; No. 6, antiportador Na^+/H^+ , codificado por el gen *Nhx1*; No. 7 ATPasa tipo V, codificada por el gen *Vma* y No. 8, canal rectificador de K^+ (TOK1). Tomado y modificado de Serrano y Rodríguez-Navarro (36).

Prespectivas

Aunque el estudio de los sistemas de transporte de K^+ es muy complejo, se han logrado establecer algunas de sus funciones: participan en la respuesta al estrés salino, regulan el contenido de iones y el pH intracelular. En la actualidad, después de la clonación de los genes que codifican para los diversos sistemas de transporte de K^+ en *S. cerevisiae* y en otras levaduras e incluso plantas, los estudios están enfocados a esclarecer las bases moleculares de la expresión y la regulación de los transportadores. Esto se puede realizar mediante la sobreexpresión de las proteínas de transporte, lo que facilitará su purificación para realizar estudios estequiométricos, de estructura y de regulación; complementado con estudios cristalográficos. En nuestro grupo de investigación también estudiamos el transporte de K^+ y Na^+ en la levadura marina *Debaryomyces hansenii*. Este trabajo nos permite establecer que existen mecanismos diferentes para la salida del K^+ o el Na^+ , que es tan rápida, que permite proponer un canal iónico como la vía más lógica. Los cambios subsecuentes, que ocurren en las levaduras incubadas con el catión opuesto, pueden explicarse mediante la existencia de un uniportador que ambos cationes al interior de la célula, pero con mayor afi-

nidad por el K^+ , que por el Na^+ (datos no publicados); además, a través de mutaciones, se estudió la relación que existe entre los diferentes sistemas involucrados en los flujos de iones; Sychrová y cols. (38) reportaron que la delección del gen NHA1 está implicada en la regulación del pH intracelular en *S. cerevisiae*; esta delección promueve un aumento del pH citoplásmico en las células suspendidas en agua ó en diferentes medios de incubación. La adición del KCl a las células ayunadas dio lugar a una alcalinización mucho más alta del pH citoplásmico en una cepa que carecía de Nha1p comparado con la cepa control.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto 36070-N y Becas No. 127608 y 153130 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Se agradece la obtención del material bibliográfico a Javier Gallegos Infante, Técnico Académico de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Referencias

1. Rothstein, A. y Bruce, M. 1958. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51: 439-455.
2. Conway, E. J. y Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47: 355-360.
3. Conway, E. J. y O'Malley, E. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem. J.* 40: 59-67.
4. Conway, E. J. y Brady, T. G. 1950. Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47: 360-369.
5. Conway, E. J., Brady, T. G. y Carton, E. 1950. Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem. J.* 47: 369-374.
6. Rothstein, A. y Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44: 18-29.
7. Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. y Tuena, M. 1969. Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 180:1-8.
8. Conway, E. J. y Duggan, F. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69: 265-274.
9. Rothstein, A. y Bruce, M. 1958. The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51: 145-159.
10. Peña, A., Cinco, G., Gómez Puyou, A. y Tuena de Gómez, M. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 413-425.

11. Slayman, C. W., Long, W. S. y Lu, C. H. 1973. The relationship between ATP and electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. J. Membr. Biol. 14: 305-338.
12. Peña, A. y Ramírez, J. 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. J. Membr. Biol. 22: 369-384.
13. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191: 144-148.
14. Mitchell, P. y Moyle, J. 1969. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. Eur. J. Biochem. 9: 149-155.
15. Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K⁺ transport in yeast. FEBS Lett. 34:117-119.
16. Peña, A., Carrasco, N. y Mora, M. A. 1979. Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. J. Membr. Biol. 47: 262-284.
17. Eddy, A. A., Indge, K. J., Backen, K. y Nowacki, J. A. 1970. Interactions between potassium ions and glycine transport in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochem. J. 120: 845-852.
18. Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. Eur. J. Biochem. 105: 419-424.
19. Malpartida, F. y Serrano, R. 1981. Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. J. Biol. Chem. 256: 4175-4177.
20. Dufour, J.P., Goffeau, A. y Tsong, T. Y. 1982. Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase. J. Biol. Chem. 257: 9365-9371.
21. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. y Fink, G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. Nature 319: 689-693.
22. Goffeau, A. y Slayman, C.W. 1981. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 639: 197-223.
23. Peña A; Ramírez J; Rosas G. y Calahorra M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. J. Bacteriol. 177: 1017-1022.
24. Roos, A. y Boron, W. F. 1981. Intracellular pH. Physiol. Rev. 61: 296-434.
25. López R; Enríquez E. y Peña A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, delta pH and delta psi in yeast. Yeast 15: 553-562.
26. Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R. y Peña, A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. J. Bacteriol. 180: 5860-5865.
27. Bañuelos, M. A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J. L. y Potier, S. 1998. The Nah1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. Microbiology 144: 2749-2758.

28. Nass, R. y Rao, R. 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. *J. Biol. Chem.* 273: 21054-21060.
29. Armstrong, W. M. y Rothstein, A. 1967. Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* 50: 968-988.
30. Borst-Pauwels, G. W. F. H., Schnetkamp, P., y Van Well, P. 1973. Activation of Rb⁺ and Na⁺ uptake into yeast by monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 291: 274-279.
31. Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1564:114-122.
32. Rodríguez-Navarro A. y Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159: 940-945.
33. Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A. 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport system of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154: 307-311.
34. Ko, C.H., Buckley, A.M. y Gaber, R.F. 1990. TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305-312.
35. Ko, C. H. y Gaber, R. F. 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4266-4273.
36. Serrano, R. y Rodríguez-Navarro, A. 2001. Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 399-404.
37. Bertl, A., Slayman, C.L., y Gradmann, D. 1993. Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132:183-199.
38. Sychrová, H; Ramírez, J. y Peña, A. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Lett.* 171: 167-172.

Research Article

Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*

J. C. González-Hernández*, C. A. Cárdenas-Monroy and A. Peña

Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-242, 04510 México D.F., México

*Correspondence to:

J. C. González-Hernández,
Departamento de Genética y
Biología Molecular, Instituto de
Fisiología Celular, Universidad
Nacional Autónoma de México,
Apartado 70-242, 04510
México D.F., México.
E-mail: jcgonza@ifc.unam.mx

Abstract

Debaryomyces hansenii, a halophile yeast found in shallow sea waters and salty food products grows optimally in 0.6 M of either NaCl or KCl, accumulating high concentrations of Na⁺ or K⁺. After growth in NaCl or KCl, a rapid efflux of either accumulated cation was observed if the cells were incubated in the presence of KCl or NaCl, respectively, accompanied by a slower accumulation of the cation present in the incubation medium. However, a similar, rapid efflux was observed if cells were incubated in buffer, in the absence of external cations. This yeast shows a cation uptake activity of both ⁸⁶Rb⁺ and ²²Na⁺ with saturation kinetics, and much higher affinity for ⁸⁶Rb⁺ than for ²²Na⁺. The pH dependence of the kinetics constants was similar for both cations, and although *K_m* values were higher at pH 8.0, there was also an increase in the *V_{max}* values. The accumulation of ²²Na⁺ was found to be increased in cells grown in the presence of 0.6 M NaCl. ⁸⁶Rb⁺ was also accumulated more in these cells, but to a slightly greater extent. The inhibition kinetics of the uptake of ²²Na⁺ by K⁺, and that of ⁸⁶Rb⁺ by Na⁺ was found to be non-competitive. It can be concluded that Na⁺ in *D. hansenii* is not excluded but instead, its metabolic systems must be resistant to high salt concentrations. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 1 November 2003
Accepted: 31 December 2003

Keywords: *Debaryomyces hansenii*; halophile; transport; salt tolerance; potassium; sodium

Introduction

The term 'halophile' is used for those organisms belonging to hypersaline habitats; they constitute an interesting class of organisms able to compete successfully in high salt concentrations and to resist their toxic effects, particularly to Na⁺. This wide diversity of microorganisms includes both prokaryotes and eukaryotes. Halophile organisms have developed strategies that allow them not only to withstand osmotic stress, but also to function better in the presence of high intracellular concentrations of salt, partly due to the synthesis of compatible solutes allowing them to balance their osmotic pressure (González-Hernández and Peña, 2002).

Most work on salt tolerance in eukaryotic organisms has been carried out with *S. cerevisiae*. *D. hansenii*, being one of the most common yeasts

found in salty environments, such as sea water or salted foods also represents an excellent model organism.

Fungi and plants transport K⁺ through an electrical membrane potential difference generated by an H⁺-ATPase, driving the uptake of K⁺ (Peña *et al.*, 1972; Peña, 1975; Goffeau and Slayman, 1981) Trk1p and Trk2p are responsible for potassium and sodium influx in *S. cerevisiae*, showing a much higher affinity for K⁺ when both cations are present (Ramos *et al.*, 1990). Normally, the amount of Na⁺ entering yeast is low, and upon salt stress this cation is believed to be taken up with low affinity by systems involved in K⁺ transport (Bañuelos *et al.*, 1998).

Following work by Norkrans (1968) and Norkrans and Kylin (1969), the particular properties of

D. hansenii were recognized, mainly in its capacity to accumulate and resist large concentrations of Na^+ , in comparison to *S. cerevisiae*, the yeast most used in studies of monovalent cation transport (Gómez *et al.*, 1996). It was proposed that it possesses a Na^+/K^+ antiporter, because although accumulating large concentrations of Na^+ , when incubated in the presence of K^+ , rapidly extrudes Na^+ in an exchange for K^+ (Norkrans, 1968; Norkrans and Kylin, 1969; Thomé *et al.*, 1998). This yeast is halophilic, rather than halotolerant, growing faster in the presence of up to 1 M of both NaCl and KCl (Prista *et al.*, 1997; Thomé *et al.*, 1998) and also because the transport of $^{86}\text{Rb}^+$ could be stimulated by Na^+ (Prista *et al.*, 1997). In this yeast, ENA genes similar to those of *S. cerevisiae* have been found (Almagro *et al.*, 2001).

These facts prompted us to gain further insight on the characteristics of ion transport by this yeast, as well as changes produced by growing the cells in the absence or presence of different salt concentrations.

Materials and methods

Yeast strain, media and culture conditions

D. hansenii, strain Y7426 (US Department of Agriculture, Peoria, IL), kept on YPD plates (1% yeast extract, 1% bacto-peptone and 2% glucose, plus 2% Bacto-agar) was grown in 100 ml liquid media at 30 °C for 24 h in YPD, with or without 0.6 or 1.0 M either KCl or NaCl. Then 0.5 l cultures were grown for 36 h. Cells were collected and washed twice with water by centrifugation, and then suspended in water to a concentration of 0.5 g/ml and kept on ice. Cells prepared in these different ways were designated as follows: grown in YPD (C), with 0.6, 1.0, 2.0 and 3.0 M NaCl: Na06, Na1, Na2 and Na3, respectively; or with 0.6, 1.0, 2.0 and 3.0 M KCl: K06, K1, K2 and K3, respectively.

Measurement of intracellular Na^+ and K^+ content

Internal concentrations of cations were measured in the supernatant of cell suspensions boiled in a water bath for 15 min and centrifuged. Cation concentrations were measured in a PF5 Zeiss flame photometer after measuring the internal value of water

under the different conditions, measured from the distribution of the radioactive isotopes ^{14}C -sucrose and $^3\text{H}_2\text{O}$. They were determined in the supernatant obtained from 500 μl cells (0.5 g/ml protein); and assuming the uniform distribution of $^3\text{H}_2\text{O}$ within the cell. The internal water content was as follows: for cells cultivated in YPD, 44%; Na06 and Na1, 35%; K06, 44%; K1, 39%.

Extracellular Na^+ and K^+

The efflux of the cations was measured in the medium after incubating the cells (250 mg) in 20 mM of either MES-TEA, pH 6.0 (20 mM morpholino ethanesulphonic acid taken to pH 6.0 with triethanolamine), or BICINE-TEA, pH 8.0 [*N,N*-bis(2-hydroxyethyl) glycine, taken to pH 8.0 with triethanolamine], 50 mM glucose; final volume, 5.0 ml at 30 °C. The suspension was centrifuged and Na^+ and K^+ were measured in the supernatant.

Exchange of radioactive cations

Cells, 1 g wet weight in 12 ml, were loaded by incubation for 14 h with either 50 mM $^{22}\text{NaCl}$ or 50 mM $^{86}\text{RbCl}$ in water, collected and washed twice with water by centrifugation, to be resuspended at a ratio of 0.5 g/ml. Then the cells were incubated at pH 6.0 (MES-TEA) or pH 8.0 (BICINE-TEA) plus 50 mM glucose. The efflux of $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ was evaluated in the absence or presence of different concentrations of KCl or NaCl, respectively (1, 10 and 100 m). At 30 s intervals, 200 μl aliquots were withdrawn; the samples were filtered through 0.45 μm pore cellulose nitrate filters, washing twice with 5 ml 10 mM KCl. The filters were dried and placed in scintillation vials with a scintillation cocktail, and their radioactivity was measured in a scintillation counter (Beckman LS6500).

Transport of labelled cations

The cells (50 mg) were suspended in 20 mM MES-TEA, pH 6.0, or BICINE-TEA, pH 8.0 plus 50 mM glucose. In the accumulation experiments, the concentrations of $^{86}\text{Rb}^+$ or $^{22}\text{Na}^+$ were 20 mM and 40 mM, respectively; for kinetic experiments, variable concentrations of $^{86}\text{Rb}^+$ or $^{22}\text{Na}^+$ were added. At 2 min intervals, samples of 200 μl incubation mixture were withdrawn and filtered through

0.45 µm cellulose nitrate filters, washing twice with 5 ml 10 mM KCl. The filters were dried to measure radioactivity in a scintillation counter (Beckman LS6500). From each set of values, the y axis intercept was subtracted, using the linear part of the curves to calculate the kinetic constants.

Results

As reported previously (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998), a significantly increased growth was observed in cells grown in Na06 or K06, compared to other concentrations, but at higher concentrations NaCl produced a clear decrease of growth compared with KCl. Also, the lag phase increased in the presence of either 2 M NaCl or KCl. Doubling times are shown in Table 1; 0.6 M both salts produced the highest growth rate.

Table 2 shows that cells grown in YPD (C) or in K06 or K1 contained only a small amount of Na⁺. Na06 and Na1 cells accumulated high

concentrations of Na⁺ and moderate concentrations of K⁺, with an internal Na⁺ concentration higher than that of K⁺.

In order to reevaluate the existence of a cation/cation antiporter (Norkrans and Kylin, 1969), it was decided to determine the changes of the internal concentrations of Na⁺ and K⁺ during the incubation of the cells in either cation-free media, or in 0.6 and 1 M solutions of KCl and NaCl, respectively (Table 2). Cells grown with different salt concentrations, of either NaCl or KCl were incubated in the presence of 1.0 M KCl or 1.0 M NaCl, respectively (the 'opposite cation'), and samples were taken every 4 min. An immediate efflux of the most abundant cation accumulated was observed, accompanied by a slower uptake of the opposite cation; in the figures, time — 4 corresponds to the concentration of Na⁺ or K⁺ present in the cells before incubation (Table 2). Cells cultivated in YPD (Figure 1A, B), when incubated in the presence of 1 M KCl, showed at first a slight increase of K⁺, which soon stabilized around 125 mM, whereas sodium was almost totally expelled. Incubating in 1 M NaCl, an immediate efflux of K⁺ was observed, reaching approximately 50 mM which remained rather stable, accumulated up to 25 mM of Na⁺, and continued accumulating Na⁺ at a rather constant rate. When cells grown in either NaCl or KCl were incubated in the presence of the opposite cation (Figure 2A, B), a rapid efflux was observed of the accumulated Na⁺ or K⁺, respectively. However, this efflux of the predominant cation was not compensated by an equivalent immediate increase of the opposite cation, which entered the cells slowly and steadily in the case of Na⁺, and faster in the case of K⁺.

This rapid loss of the accumulated cations was also observed if the cells were simply incubated in buffer, without the addition of cations; in Table 3 we present the internal concentrations of Na⁺ and K⁺ at external pH 6.0 or 8.0. In both cases the cells very rapidly lost the accumulated cation, whether it was Na⁺ or K⁺. At external pH 8.0, efflux of both cations efflux was smaller compared with pH 6.0; this difference was clearer and more significant in the K⁺ efflux than in the Na⁺ efflux.

Because of the previous results obtained regarding the fast efflux of the predominant cation inside the cells, and the slow entrance of the opposite cation, but faster for K⁺, we studied the kinetic properties of the transport systems, measuring the

Table 1. Doubling time of *D. hansenii* grown in different media

	Doubling time (h)
C	3.46
Na06	2.77
Na1	3.10
Na2	7.04
Na3	99
K06	2.51
K1	2.67
K2	4.99
K3	10.22

Doubling time was determined from the exponential phase of the curves. Cells were grown as described under Materials and methods. The results are the means of three experiments.

Table 2. Intracellular concentrations of Na⁺ and K⁺ of cells grown in the absence or presence of different concentrations of NaCl or KCl

	C	Na06	Na1	K06	K1
Na ⁺ [mM]	6.77	143.79	236.70	5.93	4.67
K ⁺ [mM]	153.08	108.59	58.56	175.84	186.37

After growth and twice washing with water, the cells (250 mg) were suspended in water and boiled in a water bath during 15 min; the suspension was centrifuged and the supernatant was used to measure Na⁺ and K⁺ in the flame photometer. The results are the means ± SEM (n = 3).

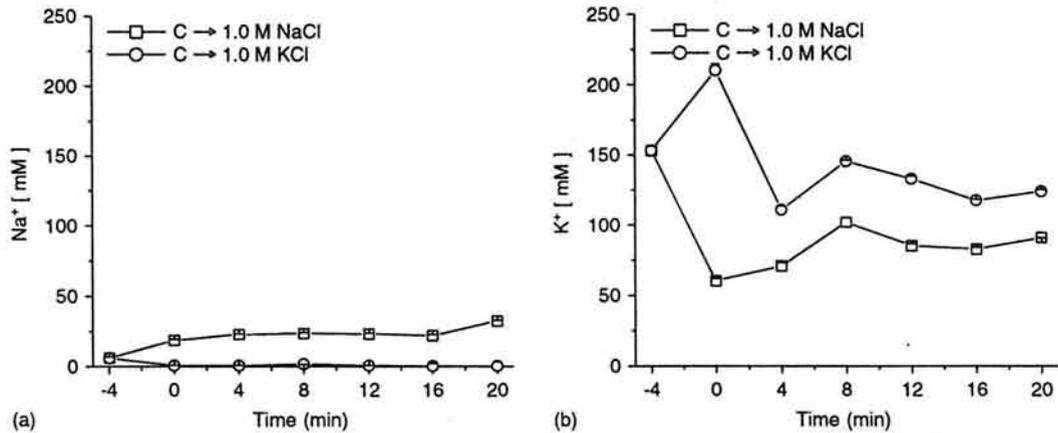


Figure 1. Changes in the intracellular concentrations of Na⁺ and K⁺ of cells grown in YPD and then incubated with 1 M either KCl or NaCl; 5 ml cells (2.5 g) grown in YPD were incubated in 100 ml 1 M solution of KCl or NaCl and 50 mM glucose. At the indicated times, aliquots of 10 ml were taken and centrifuged. The cells were resuspended in water and boiled for 15 min in a waterbath. The concentrations of Na⁺ (A) and K⁺ (B) were then measured in the supernatants by flame photometry after centrifuging the cells. Results are the means [SEM ($n = 3$)]

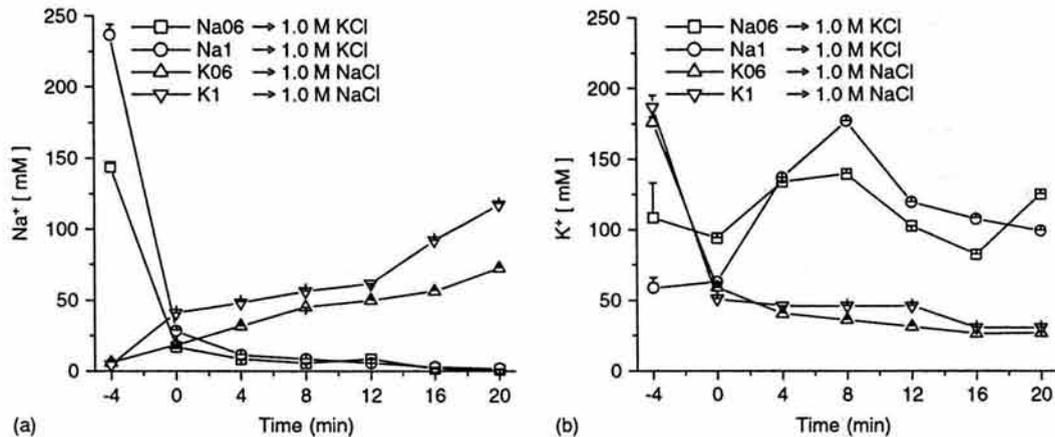


Figure 2. Changes of the intracellular Na⁺ (A) and K⁺ (B) concentrations of cells grown in either 0.6 M or 1.0 M KCl or NaCl and then incubated in the presence of 1.0 M either NaCl or KCl, respectively. The experimental procedure was similar to that of Figure 1. Numbers are the respective means [SEM ($n = 3$)]

initial transport rates of ²²Na⁺, or ⁸⁶Rb⁺ as an analogue of K⁺. The kinetic constants were obtained for C, Na06 and K06. The transport of both cations was found saturable and adjustable to one component at both pH 6.0 and 8.0. The results can be summarized as follows (Table 4): (a) K_m values for ²²Na⁺ or ⁸⁶Rb⁺ were similar to one another for the cells grown in media with or without salt at pH 6.0 or 8.0, respectively; (b) K_m values for ²²Na⁺ were

around 10-fold higher than those for ⁸⁶Rb⁺ at pH 6.0, and about three-fold higher at pH 8.0; (c) the K_m values for both cations were higher at pH 8.0 than pH 6.0; (d) it is important that the transport of ⁸⁶Rb⁺ occurred with an almost three-fold greater affinity at pH 6.0, compared with pH 8.0. For ²²Na⁺, this difference was only around 50%; (e) the V_{max} values were two- to three-fold higher for the cells in the experiments at pH 8.0 compared

Table 3. Extracellular and internal concentrations of Na⁺ and K⁺, in cells grown in different media

	External pH 6.0				External pH 8.0			
	OUT [mM]		IN [mM]		OUT [mM]		IN [mM]	
	Na ⁺	K ⁺						
C	1.46	0.81	5.01	152.19	2.7	14.95	3.77	138
Na06	88.53	0.48	55.17	108.02	79.98	0.48	63.72	108.02
Na1	84.32	0.58	152.38	57.92	79.40	0.41	157.3	58.09
K06	4.19	70.40	1.78	105.4	4.8	50.26	1.17	125.54
K1	3.68	73.33	0.99	112.97	4.96	66.43	1.01	119.87

After growth, the cells (250 mg) were suspended in 20 mM MES-TEA (pH 6.0) or BICINE-TEA (pH 8.0), 50 mM of glucose (final volume, 5.0 ml), at 30 °C. The suspension was centrifuged and the supernatant was used to determine the Na⁺ and K⁺ in the flame photometer. The results represent the means ± SEM (n = 3).

Table 4. Kinetic parameters of ⁸⁶Rb⁺ and ²²Na⁺ transport at pH 6.0 and 8.0, of *D. hansenii* grown in the absence or the presence of 0.6 M of either NaCl or KCl

⁸⁶ Rb ⁺	pH 6.0		pH 8.0	
	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m
C	2.3	1.3	7.5	5.3
Na06	5.0	1.3	9.4	4.0
K06	3.0	1.6	5.9	5.3

²² Na ⁺	pH 6.0		pH 8.0	
	V _{max}	K _m	V _{max}	K _m
C	3.0	10.6	4.9	15.8
Na06	2.5	12.0	7.4	20.0
K06	2.5	12.0	4.2	12.3

The transport of labelled cations was measured as described under Methods. [V_{max}: μmol/min/g; K_m: (mM)]. Results represent the means ± SEM (n = 6).

with pH 6.0; (f) it is interesting that at both pH 6.0 and 8.0, the V_{max} values were not very different between ²²Na⁺ and ⁸⁶Rb⁺; (g) in addition, with the cells grown in 0.6 M NaCl at pH 6.0 and 8.0, an increase of the values of V_{max} was observed.

Thomé *et al.* (1998), reported that ²²Na⁺ takes place by simple diffusion in *D. hansenii* (Y7426), but that conclusion was reached because of the low concentrations of the cation used, covering only the first-order part of the transport phenomenon. The present results were obtained using a wider concentration range, giving a clear saturation of transport and allowing a better definition the transport kinetics for this cation.

Since the differences in the kinetic parameters, except for the cells grown in KCl, did not show great differences, the capacity of accumulation of ²²Na⁺ of *D. hansenii* grown under different conditions was measured (Figure 3A, B). The Na06 cells accumulated higher concentrations of this cation, compared with C and K06. This behaviour was similar at pH 6.0 and 8.0. Also, the capacity of accumulation of ⁸⁶Rb⁺ was determined (Figure 4A, B); the Na06 cells accumulated more ⁸⁶Rb⁺ than C cells and these more than K06 cells, but this increase was slightly greater, compared with that of ²²Na⁺. It was also observed that the accumulation of ⁸⁶Rb⁺ was faster and larger at pH 8.0 compared with pH 6.0 in all culture conditions.

Kinetic studies were also performed of the competition of 0, to 48 mM K⁺, against the transport of 0.5–60 mM ²²Na⁺. KCl behaved as a hyperbolic non-competitive inhibitor (data not shown). Figure 5 shows the Lineweaver–Burk plots of the experiment. Cells grown in YPD (C) at pH 6.0 and 8.0, and also those grown in Na06 and K06, showed the same non-competitive inhibition. Table 5A presents the inhibition constants obtained. Cells grown in YPD (C) showed a decrease of the inhibition constant from 56.5 mM at pH 6.0, to 41.4 mM at pH 8.0, and the Na06 cells from 71.3 mM at pH 6.0, to 36.4 mM at pH 8.0. The K06 cells did not show any pH-dependent significant changes (Table 5A).

Kinetic studies were also performed to measure competition of Na⁺ for ⁸⁶Rb⁺ transport (Figure 6). Figure 6 shows the double reciprocal plots of the results at pH 6.0 and 8.0, in experiments measuring the transport of 0.5–20 mM ⁸⁶Rb⁺ in the presence

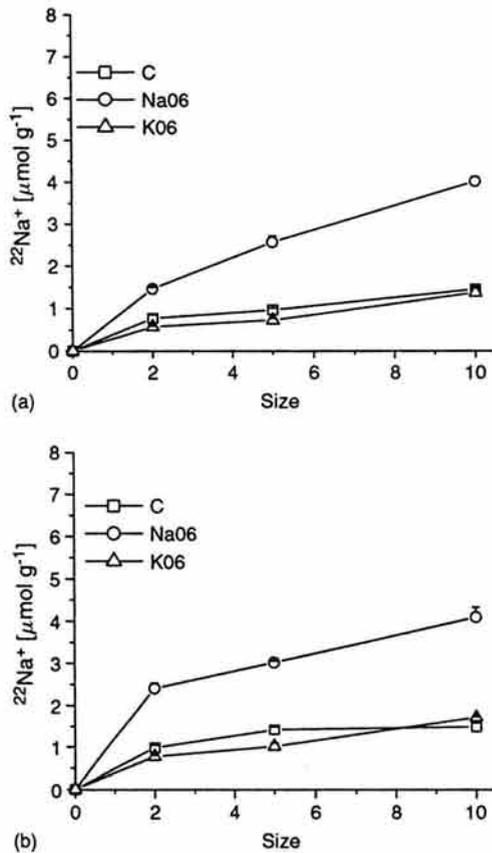


Figure 3. Accumulation of $^{22}\text{Na}^+$ at pH 6.0 (A) or 8.0 (B) by *D. hansenii* grown in YPD with 0.6 M either NaCl or KCl. 50 mg/ml of cells grown in different conditions were incubated in 20 mM MES-TEA, pH 6.0, or BICINE-TEA pH 8.0, 50 mM glucose (final volume, 2.0 ml), at 30 °C; 40 mM $^{22}\text{NaCl}$ was added. Aliquots of 200 μl cell suspension were taken at the indicated times and handled as described under Methods. Results are the means [SEM ($n = 6$)]

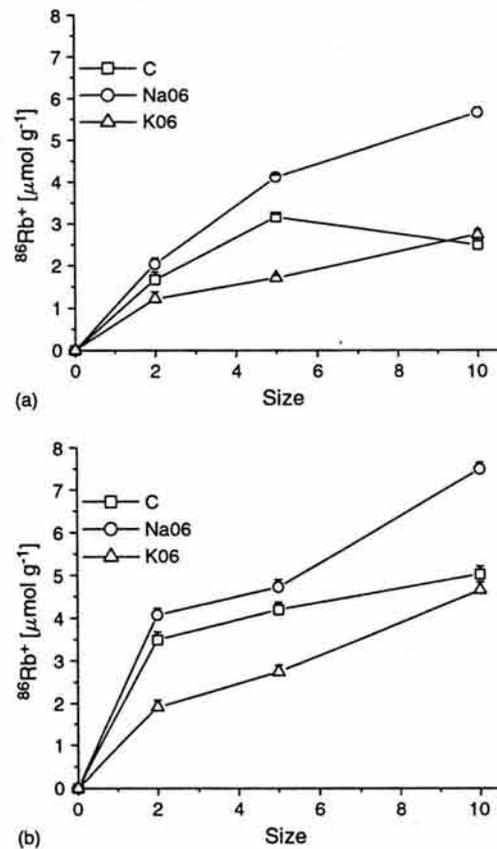


Figure 4. Accumulation of $^{86}\text{Rb}^+$ at pH 6.0 (A) and 8.0 (B) of cells grown in YPD with 0.6 M either NaCl or KCl. 50 mg/ml cells cultivated in different conditions were incubated in 20 mM MES-TEA, pH 6.0, or BICINE-TEA, pH 8.0 (final volume, 2.0 ml), at 30 °C; 20 mM $^{86}\text{RbCl}$ was added. Aliquots of 200 μl incubation mixture were taken at the indicated times and handled as described under Methods. Results are the means [SEM ($n = 6$)]

of 0–48 mM NaCl. The inhibition by NaCl found was also non-competitive. In the C cells, a decrease of the inhibition constant was observed at pH 8.0 as compared to pH 6.0 (72.3–27.3 mM). With the Na06 cells, no changes were observed for the inhibition constant, and for the K06 cells only a slight decrease of the K_i for Na^+ of 42.7 to 33.8 mM was observed (Table 5B).

To explore the possible existence of a K^+/Na^+ exchanger (Norkrans, 1968; Norkrans and Kylin, 1969; Thomé *et al.*, 1998), the efflux of $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ (pH 6.0 and 8.0) in the presence of KCl and NaCl was measured. All cells, during loading

(C, Na06 and K06), accumulated more $^{86}\text{Rb}^+$ in comparison with $^{22}\text{Na}^+$, and the loading with $^{22}\text{Na}^+$ after the different conditions of cell culture (C, Na06 and K06) did not show differences. Cells grown in the presence of salts (Na06 and K06), accumulated approximately twice the amount of $^{86}\text{Rb}^+$ in comparison to those grown in the presence of YPD (C). After loading the cells, the efflux of the accumulated isotope was evaluated in the absence or presence of different concentrations of KCl and NaCl; the efflux was fast and very similar under all experimental conditions (results not shown).

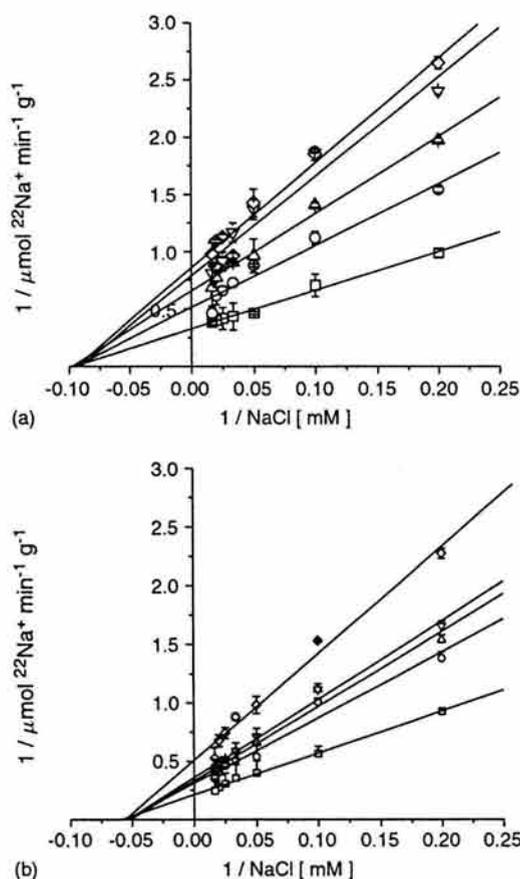


Figure 5. Inhibition kinetics of $^{22}\text{Na}^+$ transport by K^+ at pH 6.0 (A) or pH 8.0 (B) of *D. hansenii* grown in YPD. 50 mg/ml cells cultivated in YPD were incubated in 20 mM MES-TEA, pH 6.0, or BICINE-TEA, pH 8.0 (final volume, 2.0 ml), at 30°C. Variable concentrations of KCl were added. □, control; ○, 1 mM; Δ, 12 mM; ▽, 24 mM; ◇, 48 mM of KCl. Aliquots of 200 μl were taken, filtered and washed with 10 ml KCl. Results represent the means [SEM ($n = 6$)]

Discussion

The results confirm previous data (Thomé *et al.*, 1998) in the sense that *D. hansenii* grows better in the presence of moderate (0.6 M) concentrations of NaCl and KCl than in the absence or at higher salt concentration, agreeing that *D. hansenii* can be considered a moderate halophile yeast (Prista *et al.*, 1997). This increase was accompanied by the accumulation of high concentrations of either K^+ or, more strikingly, Na^+ , indicating that the mechanism of the adaptation does not involve a

Table 5. Kinetic parameters for the inhibition of $^{22}\text{Na}^+$ (A) and $^{86}\text{Rb}^+$ (B) transport by *D. hansenii* at pH 6.0 and 8.0

A	pH 6.0	pH 8.0
	[K_i (mM)]	[K_i (mM)]
C	56.5	41.4
Na06	71.3	36.4
K06	56.3	52.8

B	pH 6.0	pH 8.0
	[K_i (mM)]	[K_i (mM)]
C	72.3	27.3
Na06	35.6	35.6
K06	42.7	33.8

The competition of 0, to 48 mM K^+ , against the transport of 0.5–60 mM $^{22}\text{Na}^+$ was studied. Kinetic studies were also performed to measure competition of Na^+ for $^{86}\text{Rb}^+$ transport in experiments measuring the transport of 0.5–20 mM $^{86}\text{Rb}^+$ in the presence of 0–48 mM NaCl. The experiments were carried out at pH 6.0 (20 mM MES-TEA) or pH 8.0 (20 mM BICINE-TEA), 50 mM glucose. Aliquots of 200 μl were taken, filtered and washed with 10 ml KCl, as described under Materials and methods. Results are means \pm SEM ($n = 6$).

particular capacity to extrude Na^+ , but probably an intrinsic resistance to the toxic effects of this cation, not observed in other yeasts, particularly *S. cerevisiae*. It is also possible that this yeast can accumulate the Na^+ taken up in the vacuole. It was also interesting that the cells were not able to maintain the high concentrations of cations accumulated during growth. When incubated with or without the opposite cation, they very rapidly lost the cation accumulated during growth, and the simultaneous accumulation of the opposite cation was much smaller and slower. Norkrans and Kylin (1969) concluded that, particularly to eliminate Na^+ , an exchanger for K^+ was the mechanism involved. This appears not to be the case, since the efflux of either Na^+ or K^+ accumulated during growth was quantitatively much higher and faster for both cations than the influx of the opposite cation. These findings permit the suggestion that this yeast has an ionic channel allowing the rapid efflux of any cation accumulated during growth in the presence of high concentrations of monovalent cations. Also, although the existence of a K^+/Na^+ exchanger can not be excluded, this appears not to be the main mechanism of efflux, because the efflux was also observed in the absence of the opposite cation. This proposed cation channel would also

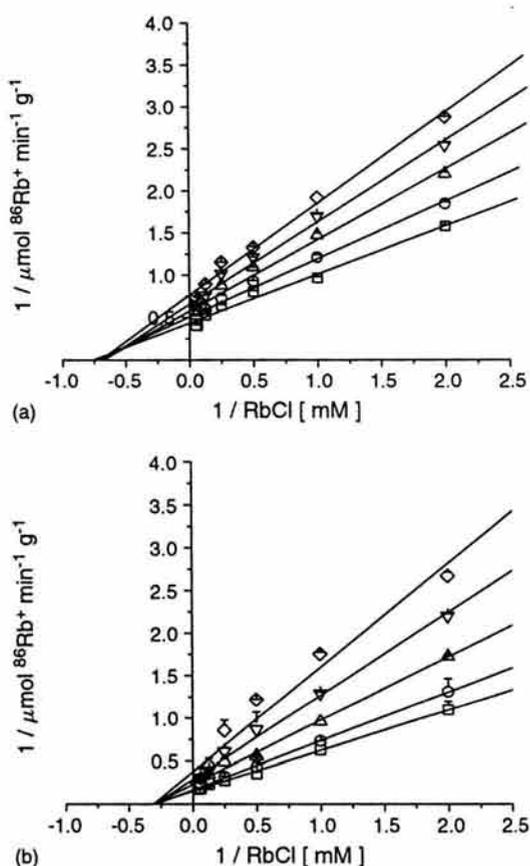


Figure 6. Inhibition kinetics of $^{86}\text{Rb}^+$ transport by Na^+ at pH 6.0 (A) and pH 8.0 (B). 50 mg/ml cells cultivated in YPD were incubated in 20 mM MES-TEA, pH 6.0, or BICINE-TEA, pH 8.0, 50 mM glucose (final volume, 2.0 ml), at 30 °C; variable concentrations of NaCl were added. □, control; ○, 1 mM; △, 12 mM; ▽, 24 mM; ◇, 48 mM of NaCl. Aliquots of 200 μl were taken, filtered and washed with 10 ml KCl. Results are the means [SEM ($n = 6$)]

appear to be unspecific, since it promotes a similar efflux of both cations. Although the existence of an H^+ /cation exchanger cannot be discarded, the magnitude of the changes seems to favour the existence of an ionic channel. In addition, experiments carried out with cells loaded with $^{22}\text{Na}^+$ or $^{86}\text{Rb}^+$ showed that, upon incubation with variable concentrations of Rb^+ or Na^+ (the opposite cation), the expected increase of the efflux of the radioactive cation by the opposite one was not observed, and the efflux was very fast and practically the same in the absence or presence of

variable concentrations of the opposite cation (not shown).

It must be pointed out that at the same time the efflux is occurring, uptake systems operate to capture the cation (s) present in the medium; since the monovalent cation transport system has a much higher affinity for K^+ ; this cation should enter the cells faster than Na^+ . For this reason, cells grown in the presence of KCl and incubated in the presence of NaCl slowly continued losing K^+ and accumulating less sodium than the K^+ lost, probably because Na^+ was slowly entering the cells through the carrier. In cells grown in the presence of NaCl and incubated in the presence of K^+ , the phenomenon was similar, but in this case the influx of K^+ was faster and larger, due to the higher affinity of the monovalent transport carrier for K^+ . This is supported by the kinetic parameters obtained for the transport of either $^{22}\text{Na}^+$ or $^{86}\text{Rb}^+$, showing a much higher affinity for the latter; it must also be considered that although Rb^+ is usually used as an analogue of K^+ , its affinity for many biological systems, including the cation transport system of *S. cerevisiae*, is around half that of K^+ (Armstrong and Rothstein, 1964).

It is important that in this work, transport of $^{22}\text{Na}^+$ was found to be saturable and not linear, as reported previously (Thomé *et al.*, 1998), because in those previously reported experiments low concentrations of the cation were used, covering the first-order concentration range and giving the false idea that the transport of this cation occurred by simple diffusion. The respective K_m values for the transport of both $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ showed no striking changes with the growth conditions of the cells, indicating that in all cases the uptake system remained the same, and the changes observed in the uptake of either Na^+ or K^+ were probably due to the number of carriers present in the plasma membrane of the cell. Another finding worth mentioning is that, in *S. cerevisiae*, the K_m values for K^+ uptake do not show any change from pH 5.0 to 8.0 (Armstrong and Rothstein, 1964), while in our experiments the K_m values for $^{86}\text{Rb}^+$ showed an almost three-fold increase from pH 6.0 to 8.0. This change was smaller, but still reproducible, for $^{22}\text{Na}^+$ uptake. It should also be pointed out that the V_{max} for the transport of $^{86}\text{Rb}^+$ was significantly increased in cells grown in the presence of 0.6 M NaCl, and this was observed at both pH values, indicating the possibility that, during growth

under these conditions, *D. hansenii* may increase the synthesis of this transporter.

These K_m and V_{max} values may influence the rates at which the cations accumulate in the cells grown in the presence of NaCl or KCl when incubated in the presence of the opposite cation (K⁺ or Na⁺, respectively; Figures 1 and 2). However, at the higher concentrations of the cations used in these experiments, it is still possible that other, less specific transport systems or factors may operate, as has been proposed for *S. cerevisiae* (Madrid *et al.*, 1998). Besides, when the accumulation of both ²²Na⁺ and ⁸⁶Rb⁺ was measured, the differences found were not of the same magnitude as those expected from the K_m and V_{max} values, and the concentrations of accumulated Na⁺ and Rb⁺ were within similar ranges.

It is also to be considered that another exchanger appears to exist in *D. hansenii*, i.e. a H⁺/cation exchanger (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998); however, although it may be important for the regulation of the internal pH of the cell, it is difficult to imagine it as involved in the uptake of considerable amounts of K⁺ or Na⁺, since the amounts of these cations to be imported into the cell by this mechanism would be limited by the available protons within the cell. Also, Almagro *et al.* (2001) indicate that a cation/H⁺ antiporter is not the main mechanism involved, an idea supported by the fact

that *D. hansenii* grows at high pH (close to 8.0) and Na⁺ concentration (Almagro *et al.*, 2001).

One mechanism proposed to explain Na⁺ toxicity in *S. cerevisiae* is the uptake of this cation through its competitive inhibition of K⁺ uptake, leading to K⁺ depletion in the cell and an increased level of sodium (Gómez *et al.*, 1996). Under our experimental conditions we found a non-competitive inhibition of K⁺ of Na⁺ transport, and vice versa. Also, the inhibition constants for both cations were significantly higher than their transport K_m values; this could be due to the involvement of two different cation-binding sites, to which the inhibitor cation and the substrate bind reversibly. Another possibility for the competition is that both cations, particularly at the high concentrations, compete for the membrane potential of the cell, which decreases upon the addition of either Na⁺ or K⁺, and in a similar way for both cations (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998).

We could not confirm the data reported by Prista *et al.* (1997), who found that the transport of K⁺ (⁸⁶Rb⁺) is favoured in the presence of 50 mM NaCl; besides the presented experiments, others were carried out in which ²²Na⁺ accumulation was measured in the presence of a wide range of KCl concentrations (1–160 mM) and also the transport of ⁸⁶Rb⁺ in the presence of 1–160 M NaCl concentrations. Always the accumulation of ²²Na⁺ and

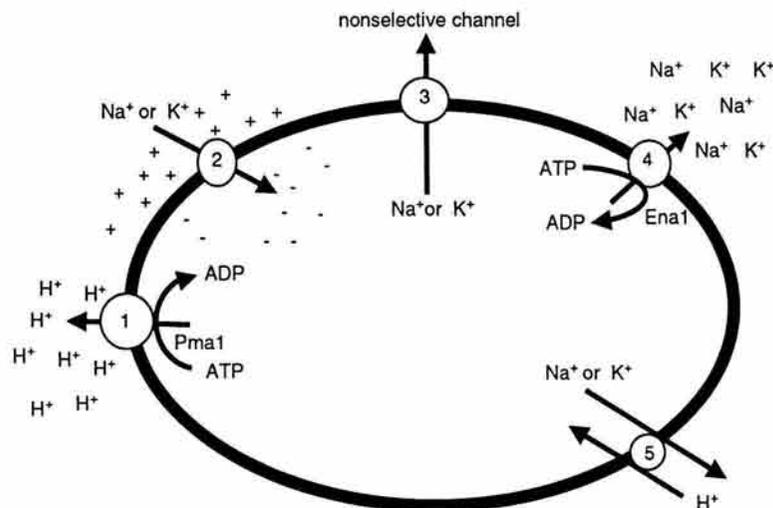


Figure 7. Hypothetical model of the possible transport systems for Na⁺ and K⁺ in *D. hansenii*: 1, a P-type H⁺-ATPase; 2, the membrane potential drives inside the uptake of Na⁺ or K⁺ via one or more uniporters; 3, a non-selective, low-affinity channel of Na⁺ and K⁺; 4, a P-type Na⁺-ATPase; 5, an electroneutral cation/H⁺ exchanger

$^{86}\text{Rb}^+$ was inhibited in the presence of every concentration of the opposite salt (not shown).

Without absolutely eliminating a cation/ H^+ exchanger, this work allows the proposition that the most probable mechanism for the rapid efflux of K^+ or Na^+ is an ionic channel. The subsequent changes in the ion content of *D. hansenii* incubated with the opposite cation can be explained by means of the existence of a uniporter responsible for the transport of both cations to the interior of the cell, with higher affinity for K^+ than for Na^+ , similar to that described in *S. cerevisiae* by Armstrong and Rothstein (1964).

With our data we propose a model for the mechanisms of Na^+ and K^+ transport in *D. hansenii* (Figure 7). A P type H^+ -ATPase, similar to that codified by the *PMA1* gene of *S. cerevisiae*, energizing the plasma membrane and generating a transmembrane potential and a pH gradient (Serrano, 1980); the membrane potential drives the uptake of Na^+ or K^+ via one or more uniporters, having a different selectivity in *D. hansenii*. We propose the presence of a non-selective channel of Na^+ and K^+ , as has been described in plants (Bihler *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). Na^+ may also slowly be expelled by another P type ATPase codified by *ENA1* (Almagro *et al.*, 2001) and by an electroneutral exchanger similar to that codified by *NHA1* found in *S. cerevisiae* (Bañuelos *et al.*, 2001) and proposed to exist in *D. hansenii* (Rodríguez-Navarro, 2000; Thomé *et al.*, 1998).

Acknowledgements

This work was partially supported by Grant No. 223999 (PAPIIT) from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and No. 36070N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). Juan Carlos González-Hernández was a CONACYT fellow (127608). The authors thank Dr Salvador Uribe and Dr Edmundo Chávez for critical reading the manuscript and discussion of the data, and Dr Jorge Ramírez and Dr Martha Calahorra for technical assistance.

Abbreviations

DiSC3(3), 3,3'-dipropylthiacarbocyanine; MES, 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid; BICINE, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine; TEA, triethanolamine.

References

- Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Días MC, Ramos J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251–3255.
- Armstrong W, Rothstein A. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J Gen Physiol* **48**: 61–71.
- Bañuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S. 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**: 2749–2758.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A. 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**: 59–64.
- Goffeau A, Slayman CW. 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **639**(3–4): 197–223.
- Gómez MJ, Luyten K, Ramos J. 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **135**(2–3): 157–160.
- González-Hernández JC, Peña A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol* **44**(3–4): 137–156.
- Madrid R, Gómez MJ, Ramos J, Rodríguez-Navarro A. 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**: 1438–1444.
- Norkrans B. 1968. Studies on marine occurring yeasts: respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch Microbiol* **62**: 358–372.
- Norkrans B, Kylin A. 1969. Regulation of potassium to sodium ratio and the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* **100**: 836–845.
- Peña A, Cinco G, Gómez-Puyou A, Tuena M. 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **153**(2): 413–425.
- Peña A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch Biochem Biophys* **167**(2): 397–409.
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Días MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005–4009.
- Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A. 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1029**(2): 211–217.
- Rodríguez-Navarro A. 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1–30.
- Roberts SK, Fischer M, Dixon GK, Sanders D. 1999. Divalent cation block of inward currents and low-affinity K^+ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 291–297.
- Serrano R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem* **105**: 419–424.
- Thomé-Ortiz PE, Peña A, Ramírez J. 1998. Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* **14**: 1355–1371.

PARTE II

ANEXO II

PAPEL FISIOLÓGICO DE LA TREHALOSA EN LAS LEVADURAS

Juan Carlos González-Hernández y Antonio Peña
Departamento de Genética Molecular,
Instituto de Fisiología Celular. UNAM

Autor corresponsal: Juan Carlos González-Hernández. Departamento de Genética y Biología Molecular. Instituto de Fisiología celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado 70-242. 04510. México D. F.

E-mail: jcgonza@ifc.unam.mx

Resumen

El disacárido trehalosa se distribuye extensamente en la naturaleza y se puede encontrar en muchos organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas, invertebrados y mamíferos. Debido a sus características físicas particulares, la trehalosa puede proteger la integridad de la célula contra una variedad de factores ambientales y de limitaciones alimenticias. Existe mucha bibliografía disponible, la cual sugiere un posible papel de la trehalosa en varias especies de bacterias y de levaduras. En estos eucariontes la trehalosa parece jugar una función dual: como compuesto de reserva, almacenado principalmente en células vegetativas de resguardo, estructuras

reproductivas y como metabolito sintetizado en condiciones de estrés. Los resultados recientes también señalan un amplio uso biotecnológico muy importante para la trehalosa.

Palabras claves: Trehalosa, levadura, solutos compatibles, condiciones de estrés, carbohidrato de reserva.

Abstract

The disaccharide trehalose is widely distributed in nature and can be found in many organisms, including bacteria, fungi, plants, invertebrates and mammals. Due to its particular physical features, trehalose is able to protect the integrity of the cell against a variety of environmental injuries and nutritional limitations. In addition, data available on several species of bacteria and yeast suggest specific functions for trehalose in these organisms. In these lower eukaryotes, trehalose appears to play a dual function: as a reserve compound, mainly stored in vegetative resting cells and reproductive structures, and as a stress metabolite. Recent findings also point to important biotechnological applications for trehalose.

Keywords: Trehalose, yeast, compatible solute, stress conditions, reserve carbohydrate.

Introducción

La trehalosa es un disacárido que es ubicuo en la biosfera. Esta compuesto de dos subunidades de glucosa unidas por un enlace tipo α : 1 \rightarrow 1 (α -D-glucopiranososa, α -D-glucopiranososa) y es un azúcar no reductor. La trehalosa se ha aislado y se ha caracterizado en una gran variedad de organismos procarióticos y eucarióticos, bacterias, plantas y mamíferos (1, 2, 3, 4). De hecho, el término original de trehalosa fue introducido al describir la cutícula externa del “trehalamana” un insecto parásito de las plantas (1).

El éxito de la trehalosa en la naturaleza comparada con otros azúcares se puede explicar por su estructura peculiar. Además de ser no reductor, posee varias características físicas únicas, que incluyen alta estabilidad hidrofílica y estabilidad química, la formación de cristales no higroscópicos y la ausencia de la formación interna del enlace del hidrógeno. Estas características explican el papel principal de la producción de la trehalosa como metabolito bajo condiciones de estrés. Una variedad de funciones se ha propuesto para

la trehalosa, estas dependen del sistema biológico analizado. Por lo tanto, en organismos procarióticos, el carbohidrato se puede utilizar como fuente externa de carbón, almacenado como soluto compatible en las bacterias fotosintéticas (5, 6, 4).

En levaduras y hongos filamentosos, la trehalosa se almacena como carbohidrato de reserva y como protector contra condiciones de estrés. Varias especies de insectos contienen trehalosa en el cuerpo graso y la hemolinfa, la cual es rápidamente movilizada durante el vuelo. Las enzimas implicadas en metabolismo de la trehalosa han sido localizadas incluso en animales superiores, aunque su papel exacto no está bien entendido. En seres humanos, la trehalasa enzima que degrada la trehalosa, está localizada en las membranas de la frontera del cepillo de células epiteliales del intestino pequeño y en el túbulo próximo del riñón. La cual puede estar implicada en el transporte del azúcar a través de la membrana y/o en la hidrólisis de la trehalosa ingerida. Sin embargo, el papel fisiológico de la trehalasa en el riñón sigue siendo un misterio, porque la trehalosa no se encuentra en la sangre (7). Los genes que codifican para el metabolismo de la trehalosa en plantas superiores han sido clonados y caracterizados recientemente (8).

Finalmente, la trehalosa aumenta la estabilidad de varios productos inestables, incluyendo las enzimas, alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, durante el almacenaje de éstos productos en condiciones de deshidratación ó congelamiento, como tal, se ha convertido en un preservativo extensamente valorado (9).

Paralelamente a esta gran diversidad de papeles fisiológicos, se han demostrado diferencias considerables entre los organismos procarióticos y eucarióticos con respecto a los sistemas enzimáticos, la organización genética y los mecanismos reguladores implicados en la biosíntesis y/ó hidrólisis de la trehalosa. El objetivo de esta revisión es mencionar las conexiones posibles entre el papel específico de la trehalosa y su camino metabólico en las levaduras. Existen revisiones más específicas que se centran en un análisis genético o la regulación de la expresión de los genes, están disponibles para el lector interesado (3, 4, 10, 11).

Metabolismo de la trehalosa

Mientras que la biosíntesis de la trehalosa sigue el mismo patrón en diversos organismos, dos sistemas enzimáticos son responsables de la hidrólisis de la trehalosa

(Fig. 1). Como regla general, la biosíntesis de la trehalosa ocurre en dos pasos secuenciales: una unidad de glucosa se transfiere inicialmente de la UDP-glucosa a la glucosa 6-fosfato, dando como producto la trehalosa 6-fosfato. Esta reacción es llevada a cabo por una trehalosa 6-fosfato sintasa dependiente de Mg^{2+} . Subsecuentemente existe una de fosforilación por una fosfatasa específica que promueve la formación de la trehalosa libre (Fig. 1). La hidrólisis de la trehalosa es realizada por una trehalasa que rompe este disacárido con una alta especificidad, dando como producto dos moléculas de glucosa (Fig. 1). Varios procariontes y eucariontes contienen una enzima alternativa, la fosforilasa de la trehalosa, que cataliza el rompimiento de la trehalosa en glucosa 1-fosfato y la glucosa. Esta reacción es reversible *in vitro*, aunque *in vivo* el equilibrio de la reacción tiende preferencialmente hacia el paso degradante (Fig. 1) (12).

La trehalosa se produce después de que la glucosa se ha consumido casi totalmente, haciendo uso de la glucosa residual y el etanol producido durante la fermentación del azúcar. En cultivos batch, hay una correlación entre la expresión de los genes que codifican las enzimas del metabolismo de la trehalosa y del glucógeno y del inicio

de la acumulación de éstos compuestos. Cuando se agota toda la fuente de carbón, los almacenes del glucógeno se consumen primero, antes de que el contenido celular de la trehalosa también disminuya, constantemente con un papel de que el glucógeno actúa como compuesto de almacenaje y la trehalosa como agente protector contra el estrés. Cuando la levadura ha acumulado glucógeno, trehalosa y se cambian a un medio rico, el glucógeno y la trehalosa se consumen rápidamente antes de que las células comiencen a proliferar (13).

Trehalosa como un compuesto de reserva

Estudios clásicos en levaduras y hongos han conducido a proponer que la trehalosa juega un papel importante como un componente de reserva. Las células de resguardo en vegetales así como las estructuras inactivas y reproductivas (esporas) pueden almacenar cantidades grandes de trehalosa (del 15 al 20% de la masa total) (1, 2). Sin embargo, esta función postulada para la trehalosa ha dado lugar a la controversia y un amplio número de informes que han dado soporte a lo publicado, así como la refutación de este papel (2, 3, 14, 15).

Según los criterios propuestos por Dawes y Senior (16), la trehalosa se debe sintetizar cuando la energía exógena excede las necesidades celulares del crecimiento, la biosíntesis, degradación y cuando se amenaza la viabilidad de la célula. Por lo tanto, una función de la trehalosa en el sentido estricto de funcionar como un carbohidrato de reserva parece ser dudoso (14, 15). En primer lugar, la trehalosa se sintetiza principalmente en el inicio de los períodos reducidos del crecimiento y no cuando hay un exceso de la fuente de energía exógena, con lo cual provee que la disponibilidad de otros alimentos esenciales no es un factor limitante. En segundo lugar, el almacenaje de la trehalosa sigue siendo intacto y no contribuye a la viabilidad de la célula que se mantiene en estado de latencia (esporas) o en condiciones de ayuno (fase inmóvil), pero el carbohidrato se moviliza rápidamente durante el crecimiento celular o en la germinación temprana de esporas en un nuevo medio de cultivo fresco. Además, la degradación de los compuestos de reserva debe proporcionar energía en una forma fácilmente utilizable por el organismo, de modo que pueda ser una ventaja ecológica sobre otros competidores (16). Sin embargo, la cantidad de glucosa liberada de la movilización intracelular de la trehalosa

proporciona solamente un porcentaje mínimo de la energía real, comparado con las altas concentraciones de la fuente externa de carbón (14, 15). Por otra parte, la germinación de esporas fungicidas se termina solamente en un medio sin la limitación nutriente, aunque esto debe ser admitido que la germinación bajo condiciones naturales es probable y absolutamente diferente a lo que ocurre en el laboratorio, de tal modo, que la trehalosa puede proporcionar el carbono y la fuente de energía suficiente para la germinación de esporas en las situaciones en las cuales los alimentos externos son limitados (3).

En *S. cerevisiae*, los genes que codifican para la trehalosa 6-fosfato sintasa (*TPS1*) y la trehalosa 6-fosfatasa (*TPS2*) han sido clonados y secuenciados (17, 18, 19). Además, otras dos proteínas reguladoras están presentes (*TPS3* y *TSL1*), que parecen ser necesarias para la estabilización y la actividad máxima del complejo de la trehalosa sintasa. Sin relación a la síntesis de la trehalosa, *TPS1p* también desempeña un papel crucial en el control del camino glucolítico (20).

La hidrólisis de la trehalosa en levaduras se lleva exclusivamente en presencia de la enzima trehalasa, la única excepción conocida es en *Pichia fermentans*, la cual

exhibe una actividad de una trehalosa fosforilasa (21).

S. cerevisiae y otras levaduras relacionadas contienen dos diversos tipos de trehalasas según su localización, características catalíticas, función y sistemas reguladores y se han clasificado en: trehalasas neutrales (*NTH1* y *NTH2*) y ácida (*ATH1*) (22). *NTH1* ha sido clonado en *S. cerevisiae* y en *Kluyveromyces lactis* (23, 24); es una enzima citosólica que muestra una actividad máxima a un pH neutral (7.0), misma que se activa por Ca^{2+} ó Mn^{2+} e inhibida por Mg^{2+} (22, 23). *NTH1p* es controlado por la fosforilación de una proteína cinasa dependiente de AMPc y parece ser una enzima implicada directamente en la movilización de la trehalosa que ocurre en respuesta a distintos estímulos fisiológicos (germinación, recuperación ante situaciones de estrés) (2, 3, 11, 13, 25). Muy poco se sabe sobre el papel fisiológico de la trehalasa ácida (*ATH1*) en la levadura; misma que está situada dentro de las vacuolas en *S. cerevisiae* y *Candida utilis* (26). La actividad es máxima a un pH ácido (4.5), no es regulada por la fosforilación de una proteína cinasa dependiente de AMPc y no es afectada por los cationes divalentes (3, 10, 13). Esta enzima no está implicada en la

degradación fisiológica de la trehalosa, está sujeta a la represión catabólica en presencia de glucosa (27). Notablemente, la secuencia de *ATHI* no demuestra ninguna semejanza con el de *NTHI* o con otras secuencias determinadas para las trehalasas ácidas de *E. coli*, insectos ó conejo (28).

Trehalosa en condiciones de estrés

La mayoría de los organismos celulares han desarrollado una capacidad para contrarrestar una variedad de condiciones ambientales adversas (limitación de nutrientes, altas temperaturas, acidificación del medio, estrés osmótico y oxidativo), que obstaculizarían su crecimiento fisiológico normal. Uno de los ejemplos mejor estudiados es la respuesta adaptativa; por medio de este mecanismo, las células que se encuentran en proliferación pueden soportar lesiones potencialmente mortales, previamente sometidas a una exposición suave al tratamiento de estrés. Entre las levaduras, muchas de las señales subyacentes implicadas en la tolerancia al estrés siguen siendo desconocidas. Sin embargo, la acumulación de la trehalosa se ha demostrado convincentemente ser un factor crucial en la respuesta adaptante a una variedad de tipos de estrés, a saber, de las inducidas por la falta de sustratos, estrés

térmico, deshidratación ó estrés oxidativo (14, 15). De hecho, las mutantes que carecen de la actividad funcional de trehalosa 6-fosfato sintasa son deficientes en (por lo menos) condiciones de termotolerancia y halotolerancia adquirida (29, 30). Es del interés el saber que existe una acumulación de trehalosa durante tratamientos de estrés, pero los resultados no permiten explicar la respuesta adaptante. Otros componentes (proteínas de choque térmico) probablemente también están implicados en el mecanismo de la protección celular (11, 31). Sin embargo, la trehalosa en las bacterias, juegan un papel osmoprotector y en levaduras es probablemente menos importante (3).

Las enzimas requeridas para la síntesis y la hidrólisis de la trehalosa en levaduras se comportan como proteínas generales de respuesta al estrés. Esto es particularmente verdad en el caso de *TPS1p* y de *NTH1p*, las cuales contienen un elemento de respuesta al estrés (*STRE*) en su promotor del gene (32, 33). La expresión de *NTH1* es inducida por estrés térmico, oxidativo y productos químicos tóxicos así como por el agotamiento de la glucosa externa en el medio (33).

Alternadamente, la transcripción de los genes de la trehalosa sintasa es estimulada

por el déficit de nutrientes, estrés térmico y osmótico. Sin embargo, la expresión de *TPS1* y de *TPS2* difiere de la conocida inducción de genes en la respuesta al estrés (STRE). En detalle, estos genes son menos sensibles en la regulación de la transcripción durante el crecimiento con la glucosa (32).

Hay también una fuerte correlación entre el contenido de la trehalosa y la resistencia al estrés en la levadura industrial para la fabricación de cerveza, pero solamente en ausencia de la fermentación (34). Diferentes cepas de levadura para la producción de cerveza son deficientes en los genes requeridos para la degradación de la trehalosa en condiciones de bajas temperaturas (35). El contenido de la trehalosa en la levadura para la elaboración de cerveza, también ha sido propuesto como un indicador importante de la viabilidad de las células para optimizar la fermentación en el sector cervecero. De hecho, durante la fermentación en la elaboración de la cerveza, un alto nivel de trehalosa sostiene la viabilidad de las células durante las etapas iniciales, mejora la utilización del carbohidrato y aumenta la producción del alcohol isoamílico y del isobutanol (36).

Debido a las características físicas exclusivas descritas arriba, la trehalosa puede funcionar como una molécula que

previene el daño celular estabilizando las proteínas en su estado nativo durante el choque térmico, así como también suprimiendo la agregación de proteínas desnaturalizadas. Además, el disacárido substituye el agua y une los grupos polares de los fosfolípidos, preservando las características de una membrana hidratada (37). Bajo condiciones de congelación, deshidratación o sequedad inducida, la trehalosa muestra una capacidad excepcional para proteger las enzimas y las membranas biológicas. Además, la hidrólisis rápida de la trehalosa por la trehalasa es necesaria durante la recuperación del estrés para que las estructuras celulares sean liberadas del carbohidrato unido (37). Esto haría accesible a las proteínas y así promover la renaturalización correcta. La energía necesaria para la renaturalización se podría obtener de la hidrólisis de la trehalosa (11). Por lo tanto, el equilibrio entre el almacenaje y la degradación de la trehalosa se debe regular finalmente en respuesta a los cambios de estrés y durante la recuperación subsecuente de la condición de estrés.

Otras funciones de la trehalosa en levaduras

Un inesperado hallazgo demostró que *TPS1p* es requerido para el control

apropiado de la afluencia glucolítica en algunas especies de levadura. Mutantes deficientes en la producción de la trehalosa no pueden crecer en presencia de glucosa ó fructosa debido a un desequilibrio drástico de los metabolitos glucolíticos y a una disminución del contenido de ATP. Aunque no está entendido totalmente, una ligera inhibición de la hexocinasa II causada por la trehalosa 6-fosfato es la explicación más plausible para esta perturbación metabólica. Un modelo alternativo sugiere que la síntesis de la trehalosa podría servir como sistema regulador intermediario, el exceso de la glucosa 6-fosfato acumulada bajo la adición de la glucosa es rápidamente convertida en trehalosa para recuperar el fosfato libre, el cual es requerido posteriormente en el camino glucolítico (22, 38, 39, 40).

La implicación fisiológica de la trehalosa durante procesos (no-reproductivos) celulares de la diferenciación del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia fungosa* (41) y algunas levaduras dimórficas también se ha mencionado. Se ha reportado la presencia de una trehalasa en la levadura no fermentativa *Rhodotorula rubra*, ésta enzima es reprimida por glucosa y no responde a la activación del AMPc dependiente de proteínas cinasas. Aunque la *R. rubra* puede crecer en medios que contienen trehalosa exógena, por ende el

papel fisiológico del carbohidrato sigue siendo confuso en este caso (42).

Conclusiones y perspectivas

A través de la biosfera, el disacárido trehalosa se ha conservado como molécula importante en muchos organismos relacionados distantemente, que la utilizan para diversos procesos fisiológicos. Junto al papel principal que se le ha otorgado como compuesto sintetizado en condiciones de estrés, una variedad de diversas funciones es planteada para la trehalosa en sistemas biológicos específicos. Por lo tanto, las levaduras acumulan cantidades grandes de trehalosa principalmente como un protector de la integridad de la célula contra varias condiciones de estrés y como compuesto de reserva. Significativamente, la trehalosa tiene excelentes perspectivas para su uso industrial. El carbohidrato actualmente se utiliza con éxito como un agente protector en condiciones de baja temperatura, así como un eficiente preservativo en muchos alimentos y productos farmacéuticos. Además, las nuevas líneas de investigación se están dedicando al aislamiento de las enzimas termoestables requeridas para la biosíntesis y la hidrólisis de la trehalosa de bacterias termófilas, así como el estudio del metabolismo de la trehalosa en las levaduras

para la fabricación de cerveza y vino, para mejorar la producción y la calidad de sus productos respectivos.

Nosotros en nuestro laboratorio hemos realizado un estudio comparativo de la producción de la trehalosa en diferentes cepas de la levadura halófila *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae*, en diferentes condiciones de estrés salino encontramos que *D. hansenii* mostró una producción más alta de trehalosa, comparada con las cepas utilizadas de *S. cerevisiae*; sugerimos que la producción elevada de trehalosa en *D. hansenii* desempeña un papel como carbohidrato de reserva, tal y como se ha reportado para otras levaduras (43); nuestros estudios estarán encaminados a evaluar el posible papel de la trehalosa sobre la actividad de las enzimas involucradas en la regulación de la vía glucolítica y metabolismo de carbohidratos en *D. hansenii*.

Agradecimientos

El trabajo realizado en nuestro grupo fue apoyado por el proyecto IN-223999, del PAPIIT, de la Dirección de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, y por el proyecto 36070-N y Beca No. 127608, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Se agradece la obtención del material

bibliográfico a **Javier Gallegos Infante**, Técnico Académico de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Bibliografía

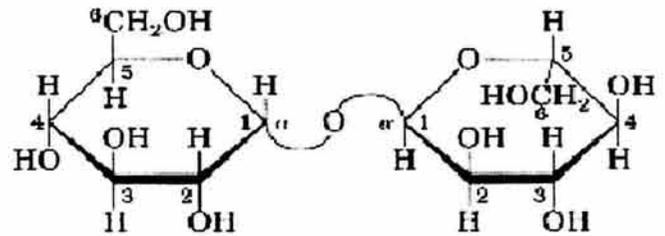
1. Elbein, A. D. 1974. The metabolism of α, α -trehalose. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30: 227–256.
2. Thevelein, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev. 48: 42–59.
3. Thevelein, J. M. 1996. Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Brambl R, Marzluf GA (eds) The mycota, vol 3. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 395–414.
4. Strom, A. R. y Kaasen, I. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. 8: 205–210.
5. Galinski, E. A. y Herzog, R. M. 1990. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). Arch. Microbiol. 153: 607–613.
6. Spargo, B. J., Crowe, L. M., Ionedá, T., Beaman, B. L. y Crowe, J. H. 1991. Cord factor (α, α -trehalose 6,6' dimycolate) inhibits fusion between phospholipid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 737–740.
7. Ishihara, R., Taketani, S., Sasai, M., Kino, M., Tokunaga, R. y Kobayashi, Y. 1997. Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. Gene. 202: 69–74.

8. Müller, J., Wiemken, A. y Aeschbacher, R. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Sci.* 147: 37–47.
9. Colaço, C., Sen, S., Thangevalu, M., Pinder, S. y Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology.* 10: 1007–1011.
10. François, J. M., Blazquez, M. A., Ariño, J. y Gancedo, C. 1997. Yeast sugar metabolism. In: Zimmermann FK, Entian K-D (eds) *Storage carbohydrates in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Technomics, Lancaster, Basel, pp 285–311.
11. Nwaka, S. y Holzer, H. 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58: 199–224.
12. Hohmann, S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 334–361.
13. Francois, J. y Parrou, J. L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 125–145.
14. Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite?. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 201–210.
15. Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Leeuwenhoek.* 58: 209–217.
16. Dawes, E. A. y Senior, P. J. 1973. Energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 10: 136–266.
17. Bell, W., Klaasen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P. y Wiemken, A. 1992. Characterization of the 56 kDa subunit of trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIFI*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* 209: 951–959.
18. De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jëno, B., Boller, T. y Wiemken, A. 1993. Disruption of *TPS2* the gene encoding the 100 kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* 212: 315–323.
19. Vuorio, O. E., Kalkkinen, N. y Londesborough, J. 1993. Cloning of two related genes encoding the 56 kDa and 123 kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 216: 849–861.
20. Thevelein, J. M. y Hohmann, S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 20: 3–10.
21. Schick, I., Haltrich, D. y Kulbe, K. D. 1995. Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1088–1109.
22. Londesborough, J. y Varimo, K. 1984. Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* 219: 511–518.
23. Kopp, M., Müller, H. y Holzer, H. 1993. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 4766–4774.

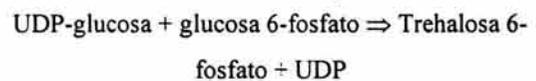
24. Amaral, F. C., Van Dijck, P., Nicoli, J. R. y Thevelein, J. M. 1997. Molecular cloning of the neutral trehalase gene from *Kluyveromyces lactis* and the distinction between neutral and acid trehalases. Arch. Microbiol. 167: 202–208.
25. Argüelles, J. C., Mbonyi, K., Van Aelst, L., Vanhalewyn, J. A.W.H. y Thevelein, J. M. 1990. Absence of glucose-induced cAMP signaling in the *Saccharomyces cerevisiae* mutants *cat1* and *cat3* which are deficient in the derepression of glucose-repressible proteins. Arch. Microbiol. 154: 199–205.
26. d'Enfert, C. y Fontaine, T. 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. Mol. Microbiol. 24: 203–216.
27. San Miguel, P. F. y Argüelles, J. C. 1994. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 1200: 155–160.
28. Destruelle, M., Holzer, H. y Klionsky, D. 1995. Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. Yeast. 11: 1015–1025.
29. Lewis, J. G., Learmonth, R. P. y Watson, K. 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 141: 687–694.
30. Hounsa, C. G., Vincent, E., Thevelein, J. M., Hohmann, S. y Prior, B. A. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiology. 144: 671–680.
31. Argüelles, J. C. 1994. Heat-shock response in a yeast *tps1* mutant deficient in trehalose synthesis. FEBS Lett. 350: 266–270.
32. Winderickx, J., de Winde, J. H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. y Thevelein, J. M. 1996. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? Mol. Gen. Genet. 252: 470–482.
33. Zähringer, H., Thevelein, J. M. y Nwaka, S. 2000. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. Mol. Microbiol. 35: 397–406.
34. Van Dijck, P., Colavizza, D., Smet, P. y Thevelein, J. M. 1995. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. Appl. Environ. Microbiol. 61: 109–115.
35. Shima, J., Hino, A., Yamada, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. y Takano, Y. 1999. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2841–2846.
36. Guldfeldt, L. U. y Arneborg, N. 1998. The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. J. Inst. Brew. 104: 37–39.
37. Singer, M. A. y Lindquist, S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding in vivo and in vitro. Mol. Cell. 1: 639–648.

38. Blazquez, M.A., Stucka, R., Feldmann, H. y Gancedo, C. 1994. Trehalose- 6-P synthase is dispensable for growth on glucose but not for spore germination in *Schizosaccharomyces pombe*. J. Bacteriol. 176: 3895–3902.
39. Luyten, K., De Koning, W., Tesseur, Y., Ruiz, M. C., Ramos, J., Cobbaert, P., Thevelein, J. M. y Hohmann, S. 1993. Disruption of the *Kluyveromyces GGS1* gene causes inability to grow on glucose and fructose and is suppressed by mutations that reduce sugar uptake. Eur. J. Biochem. 217: 701–713.
40. Zaragoza, O., Blazquez, M. A. y Gancedo, C. 1998. Disruption of the *Candida albicans TPS1* gene encoding trehalose-6P-synthase impairs formation of hyphae and decreases infectivity. J. Bacteriol. 180: 3809–3815.
41. Asano, N., Yamaguchi, T., Kameda, Y. y Matsui, K. 1987. Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*. J. Antibiot. 40: 526–532.
42. Mansure, J. J., Silva, J. T. y Panek, A. D. 1992. Characterization of trehalase in *Rhodotorula rubra*. Biochem. Int. 28: 693–700.
43. González-Hernández, J. C. Jiménez-Estrada, M. y Peña, A. (Sometido a revisión). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. Extremophiles (in review).

A



B



Trehalosa 6-fosfato sintasa

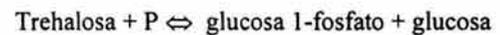


Trehalosa 6-fosfato fosfatasa

C



Trehalasa



Trehalosa fosforilasa

Fig. 1.- Estructura de la trehalosa (A) y los caminos metabólicos generales implicados en la biosíntesis de la trehalosa (B) y la degradación (C) caracterizada en diferentes especies de levaduras.

Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress.

Authors:

González-Hernández, J. C.¹. Jiménez-Estrada, M.². and Peña, A.¹.

Departamento de Genética y Biología Molecular.

Instituto de Fisiología celular¹

Instituto de Química²

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado 70-242

04510 México D. F.

México

Corresponding author:

González-Hernández, J. C.

Telephone: (5255) 5622-5633

Fax: (5255) 5622-5630

E-mail: jcgonza@ifc.unam.mx

Acknowledgements

This work was partially supported by Grant No. 223999 (PAPIIT) from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and No. 36070N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). Juan Carlos González-Hernández was a CONACYT fellow (127608). The authors thank Dr. José Sampedro for critically reading the manuscript and

discussion of the data, and the technical assistance of Dr. Martha Calahorra.

Abstract

The comparative analysis of growth, intracellular content of Na⁺ and K⁺, and the production of trehalose in the halophilic *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* have been determined under saline stress. The yeasts species were studied on the basis of their ability to grow in the absence or presence of 0.6 or 1.0 M NaCl and KCl; *D. hansenii* strains grew better, and accumulated more Na⁺ than *S. cerevisiae* under saline stress (0.6 and 1.0 M of NaCl), compared with *S. cerevisiae* yeasts strains under similar conditions. By two methods we found that *D. hansenii* showed a higher production of trehalose, compared to *S. cerevisiae* yeasts strains; active dry yeast contained more trehalose than a regular commercial strain (La Azteca) under all conditions, except when the cells were grown in the presence of 1.0 M NaCl. We suggest that the elevated production of trehalose in *D. hansenii* plays a role as reserve carbohydrate, as reported for other microorganisms.

Keywords: Trehalose, halophile, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, saline stress, glycerol.

Introduction

It has been previously shown that the halophile yeast *Debaryomyces hansenii* accumulates high levels of intracellular Na^+ and K^+ when grown at high salinity (Norkrans and Kylin, 1969), and that glycerol accumulates intracellularly proportionally to increasing extracellular NaCl concentrations (Gustafsson and Norkrans, 1976). It was also reported that in *D. hansenii*, the intracellular levels of polyols are markedly enhanced by high salinity, the dominant solutes being glycerol in log phase cells and arabinitol in stationary phase cells (Adler and Gustafsson, 1980).

Two different fundamental adaptation strategies exist allowing certain microorganisms to bear osmotic stress due to the presence of a high concentration of salt, as described by González-Hernández and Peña (2002). i) the cells maintain high intracellular concentrations of salt, osmotic or at least equivalent to the external concentration of salt (salt-in strategy), and intracellular systems must adapt to the presence of

high concentrations of salt; ii) the cells maintain lower concentrations of salts in their cytoplasm (compatible-solute strategy). The osmotic pressure of the medium is balanced by compatible solutes, and no special adaptation of the intracellular systems is required (Bayley and Morton 1978).

Under osmotic stress, microorganisms must be able to restore their volume and turgor pressure by increasing the internal osmolarity and many microorganisms respond to such environmental change by accumulating low molecular weight organic solutes (LeRudulier et al. 1984; Higgins et al. 1987). The transfer of growing cells of the salt tolerant yeast *D. hansenii* to media of higher salinity resulted in an increased production and intracellular accumulation of glycerol, proportional to the magnitude of the salinity shift (André et al. 1988).

Jovall et al. (1990), reported the accumulation of organic solutes in *D. hansenii* after transfer to media of increased salinity. Cells were incubated with labelled glucose and the intracellular metabolic processes were assessed by NMR spectroscopy of intact cells or cellular extracts. The analysis of seventeen yeast strains by ^{13}C -NMR

spectroscopy has been reported, confirming the significance of glycerol as the sole osmoregulatory solute under salt-stressed conditions (Meikle et al. 1991). Khroustalyova et al. (2001), reported that the yeast *Debaryomyces hansenii* is highly resistant to dehydration stress and this tolerance was more pronounced for cells taken from the exponential growth phase than from the stationary phase; the growth of *D. hansenii* in medium containing 10% (w v⁻¹) NaCl, resulted in an additional increase in cellular resistance to dehydration, which was most marked for stationary phase cells.

Trehalose is a ubiquitous disaccharide in the biosphere. It has been isolated and characterized from a large variety of both prokaryotic and eukaryotic organisms, ranging from bacteria to plants and mammals (Elbein 1974; Thevelein 1984, 1995; Strom and Kaasen, 1993). A variety of functions have been proposed for trehalose, which depend on the specific biological system analyzed. In some yeast and filamentous fungi, large amounts of trehalose are stored both as a reserve carbohydrate and as protector against stress challenges to cells.

Since *D. hansenii* is one of the salt-resistant species of yeast, its study could

contribute to a better understanding of the phenomenon of halotolerance and osmoregulation in halophiles organisms. The present work is aimed to make a comparative analysis of growth, intracellular content of Na⁺ and K⁺, trehalose production, trying to understand the role of trehalose in this halophilic yeast. In this study we used three different strains of *Debaryomyces hansenii* (Y7426, J26, CBS1793) and two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* (La Azteca, and active dry yeast), these experiments were carried out under different saline stress conditions.

Materials and methods

Yeasts strains, media and culture conditions

D. hansenii, strain Y7426 (US Department of Agriculture, Peoria, IL); *D. hansenii*, strain J26; *D. hansenii*, strain CBS1793; was kindly supplied by L. Adler and H. Sychrová, respectively. *S. cerevisiae* Baker's yeast (*S. c.*) was obtained locally (La Azteca S. A.); *S. cerevisiae* active dry yeast (ADY) was obtained from SIGMA (St. Louis Mo., USA, Cat. No. YSC-2); the rehydration procedure was that reported by Peña et al. (1992). The yeasts were kept in YPD

plates containing 1% yeast extract, 1% bacto-peptone and 2% glucose, plus 2% bactoagar. Liquid cultures were started from a 100 ml inoculum of cells grown in YPD, with or without 0.6, 1.0, 2.0 or 3.0 M of either KCl or NaCl. Inocules were grown at 30 °C for 24 h in a gyrotory shaker at 250 r.p.m. 0.5 l cultures were then grown under similar conditions but during 36 h. The cultured cells were collected by centrifugation and washed twice with water. The final pellets of cells grown in YPD (C), with the addition of 0.6, 1.0, 2.0 and 3.0 M (Na06, Na1, Na2 and Na3, respectively) or with 0.6, 1.0, 2.0 and 3.0 M KCl (K06, K1, K2 and K3, respectively). Finally the cells were resuspended in water to a concentration of 0.5 g/ml (w/v), and kept in ice to be used the same day. Some experiments were carried out too with cells starved by aeration in water during 14 hours.

Determination of intracellular Na⁺ and K⁺ content

To measure the internal Na⁺ and K⁺ content, cells (50 mg, wet weight) were disrupted by incubation with 2 mM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) for 15 min at room temperature. The suspension was centrifuged, and the

cation concentration in the supernatant was determined with a Zeiss PF5 flame photometer. The concentrations of cations were calculated after measuring the internal value of water under the different conditions, determined from the distribution of radioactive isotopes ¹⁴C-Sucrose and ³H₂O in the supernatant obtained from 500 µl of cells (0.5 g/ml); and assuming their uniform distribution within the cell (González-Hernández et al. In press). In *S. cerevisiae*, internal volume was 47% of the wet weight of the cells (Peña et al. 1967).

Growth

Growth was followed by the absorbance changes at 600 nm with a Shimadzu spectrophotometer model UV-160A.

Extraction of samples for trehalose and glycerol determination

Samples (1 ml) were extracted by boiling the cell suspensions at 92 °C in a water bath for 15 min. After centrifugation the supernatant was frozen until analysis. Trehalose and glycerol were measured in adequate dilutions of the supernatant.

Glycerol determination

Glycerol was phosphorylated to glycerol 3-phosphate by ATP in the presence of glycerol kinase. Glycerol 3-phosphate was then converted to dihydroxyacetone phosphate by glycerophosphate dehydrogenase leading to the formation of NADH. The increase in NADH concentration was recorded with a Shimadzu spectrophotometer model UV-160A at 340 nm (Wieland 1965).

Thin-layer chromatography (TLC) method

Standard 0.1 M solutions of pure trehalose, galactose, glucose, mannitol, sorbitol, maltose, sucrose, raffinose and glycerol were prepared. The crystals obtained for the NMR spectra of the samples obtained from *D. hansenii* Y7426 cultivated in absence and in the presence of NaCl or KCl, were used to prepare a 0.1 M stock solution. From the extracts and standards prepared, 10 μ l were taken and diluted with 40 μ l of pyridine; 1 μ l of this mix was taken and spotted onto Silica Gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany), and developed in a closed chamber with 1-

butanol:isopropanol:water (10:5:4 vol/vol) as the mobile phase. The spots were detected by spraying the plates with 5 mg vanillin per ml in concentrated H₂SO₄ and 5% ethanol and heating at 130 °C (modified from Sue and Pringle, 1980).

Assay of trehalose with acid trehalase

Uncoupled assay. The extracts obtained by boiling the cell suspensions at 92 °C in a water bath for 15 min were used. 100 μ l of the extracts plus 25 μ l of trehalase were incubated overnight (14 hours), at 40 °C. The next day, glucose was assayed with glucose oxidase by adding to the spectrophotometer cell (2.0 ml final volumen), the following reagents: 1% *o*-dianisidine, prepared by diluting in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0; digested trehalose sample; peroxidase at a concentration of 200 μ g per ml in distilled water (1.5 units per ml of the assay mixture); glucose oxidase (1 mg per ml in distilled water, diluted to obtain 21 units per ml in 2 ml of the assay mixture). Absorbance changes were measured in the spectrophotometer at 460 nm and 25 °C and compared to a glucose standard curve (modified of Araujo et al. 1989).

NMR spectroscopy

Stationary phase cells (36 hours) were extracted by boiling in a water bath for 15 min and centrifuging to obtain the supernatant; carbohydrates were extracted immediately with 80% (v/v) ethanol (50 ml). After overnight extraction, ethanol was removed by rotary evaporation (Büchi, Heating Bath B-490) and the samples were then desiccated for at least 48 h in a freeze dryer. Dried samples were resuspended in D₂O (Aldrich Chemical Company) and analysed using a NMR spectroscopy. All spectra were obtained with a Bruker spectrometer model, the samples of ¹³C-NMR spectra were obtained at 300 Mhz. The trehalose peak was identified against that of the pure substance.

Viability Determination

Liquid cultures were started from a 100 ml inoculum of cells grown in YPD, with variable concentrations of either KCl or NaCl, and then grown at 30 °C for 24 h in a gyrotory shaker at 250 r.p.m. Immediately after, samples were taken, and successive tenfold dilutions were prepared in sterile water to count the cells (*D. h.* Y7426). Then, 150 cells of each

were spread in duplicate plates containing YPD media without salt, or with 0.6, 1.0, 2.0 or 3.0 M of NaCl or KCl. The plates were incubated for 36 hours (YPD, 0.6 and 1.0 M NaCl or KCl) and 200 hours (2.0 and 3.0 M of NaCl or KCl), at 30 °C. After this time, the colonies were counted to determine viability.

Reproducibility

All assays were repeated at least three times, and the data reported are mean values; however, the number of independent experiments and replicates, are mentioned whenever relevant.

Results

Fig. 1 A shows the influence of NaCl and KCl on the growth of *D. hansenii* Y7426 in YPD without salt (C), or in the presence of 0.6 M (Na06 or K06), 1.0 M (Na1 or K1) of NaCl or KCl. An increased growth rate was observed in the cells grown in Na06 or K06, compared to other concentrations; however, growth rate was similar to the control at 1.0 M of either NaCl or KCl. *D. hansenii* J26 (Fig. 1B), showed a slight reduction in growth at all concentrations of cells, which was more marked after 20 h in Na1 cells. The

D. hansenii CBS1793 strain, grew faster at 0.6 M than all other cells conditions, in this strain the yeast growth order is: K06>Na06>K1>C> Na1. In Figure 1D and E it is shown that *S. cerevisiae* La Azteca (*S. c.*) and active dry yeast (ADY) showed similar growth behavior under all experimental conditions; however, the largest decrease of growth rate was observed with NaCl at all concentrations, particularly at 1.0 M. Table 1 shows the duplicating times; 0.6 M salt produced the highest growth rate, for the *D. h.* Y7426, in agreement with data obtained by González-Hernández et al. (In press); while J26 and CBS1793 practically did not show differences; with *S. cerevisiae* La Azteca and ADY we found an increase of doubling time in the cells cultivated in presence of 0.6 and 1.0 M of each salt (Table 1).

Tables 2A and B show the content of Na⁺ and K⁺ of the different strains from *D. hansenii* and *S. cerevisiae* analyzed in this work under the different experimental conditions; the internal concentrations of Na⁺ and K⁺ in *D. hansenii* Y7426 under different experimental conditions (Table 2A and B) show that C cells contained only a small amount of Na⁺, compared to K⁺. Na06 cells accumulated high

concentrations of Na⁺ with moderate concentrations of K⁺. At both NaCl concentrations in the growth medium, the internal Na⁺ concentration was higher than that of K⁺. The K06 and K1 cells contained a very low concentration of Na⁺, while K⁺ concentrations rose to around 200 mM. In the cells grown in the presence of NaCl (Na06 and Na1); the *D. hansenii* Y7426 strain accumulated almost twice the concentration of Na⁺ in comparison with J26 and CBS1793 strains (Table 2B). *D. hansenii* accumulated K⁺ concentrations varying from 180 to 230 mM, except for the Y7426 strain, which when cultivated in the presence of NaCl accumulated less and less K⁺, depending on the increasing concentrations of Na⁺ in the medium (these data collected for the Y7426 strain agree with the data obtained by González-Hernández et al. (In press). The commercial strain of *S. cerevisiae* in Na06 also accumulated significantly more Na⁺ than ADY; when cultivated in the presence of 1 M of NaCl, also La Azteca strain accumulated more than twice the amount of Na⁺, and significantly more than the ADY strain. *S. cerevisiae* (La Azteca) accumulated the highest concentrations of K⁺, which also

decreased as the concentration of Na⁺ in the medium was increased. A similar behavior was observed with the ADY strain, which, however, accumulated less K⁺ under all conditions tested, even at the highest concentrations of K⁺ in the medium.

Table 3 shows the production of trehalose for the different strains. The *D. hansenii* Y7426 strain accumulated around 425 μM when grown in YPD medium, which decreased as the NaCl concentration in the medium was increased, and at 1.0 M KCl. With the two other strains of *D. hansenii* (J26 and CBS1793), no changes in the content of trehalose were observed when the cells were grown with different NaCl or KCl concentrations. Both *S. cerevisiae* strains, when grown in the presence of salt, showed an increased trehalose content at 0.6 M of NaCl or KCl, and an important decrease at 1.0 M of both salts. It is also interesting that ADY, following a similar pattern respect to the response to salt, always showed a much higher level of trehalose under all conditions, except for the high concentrations of both NaCl and KCl, and that at 1.0 M KCl, the decrease of the trehalose content was much lower than that of the other commercial strain.

Figure 2A shows the resonance spectrum of standard trehalose (Sigma) and Figs. 2B, C and D, the spectra of the cellular extracts obtained at different experimental conditions (C, Na06 and K06 cells). Fig. 2 shows the peak positions (ppm): C₁ = 93.86, C₂ = 73.2, C₃ = 72.79, C₄ = 71.7, C₅ = 70.36 and C₆ = 61.23, which were practically identical for the pure commercial substance, and that obtained from the cell extracts. The same samples used to obtain the spectra were also analyzed by thin-layer chromatography (TLC) (Figure 3); from both results, we concluded that obtained samples were pure trehalose.

Figure 3A shows the spots obtained with the different pure sugars used in the TLC: a) trehalose, b) galactose, c) glucose, d) mannitol, e) sorbitol, f) maltose, g) sucrose, h) raffinose and h) trehalose. Figure 3B shows the spots of the obtained trehalose of *D. hansenii* Y7426 (c-k) and *S. cerevisiae* (b) cultivated under different experimental conditions: a) control trehalose, b) *S. c.* La Azteca cultivated in YPD, c) C, d) Na06, e) Na1, f) Na2, g) Na3, h) K06, i) K1, j) K2, k) K3 and l) control trehalose.

Figure 4 shows the glycerol content of *S. c.* La Azteca grown in YPD (a), and *D.*

hansenii Y7426 (b-j) strain determined under saline stress conditions. A 50 μ M basal content was found, which increased to 100 μ M in presence of high concentration of salt in the growth medium (2.0 and 3.0 M of NaCl or KCl respectively). The same graph presents the production of trehalose under the same conditions of growth; contrary to glycerol, the production of trehalose decreased with the increasing concentrations of salt in the medium.

The possible function of trehalose in the metabolism in *D. hansenii* Y7426 strain was analyzed by determining the possible protective effect of this carbohydrate on the enzymatic activity of alcohol dehydrogenase from cells cultivated under different saline stress conditions. It was found that for this enzyme and under our experimental conditions glycerol and trehalose did not protect against inactivation produced by the addition of different concentrations of salt *in vitro* (data not shown).

The possible participation of trehalose as a reserve carbohydrate in *D. hansenii* and *S. cerevisiae* strains was studied. As Table 4 shows, the trehalose content of cells starved during 14 hours markedly decreased under all conditions tested,

except for those which were already very low at the highest salt concentrations.

The viability of the *D. hansenii* Y7426 cells (Table 5) grown under the different salt concentrations was studied. Moderate saline stress (0.6 and 1.0 M of salt) showed 100% viability; higher salt concentrations of 2.0 and 3.0 M decreased viability, and the negative effect of NaCl was greater than that of KCl.

It has been reported that trehalose plays an important role in thermal stress in bacteria and yeasts (Joao et al. 1997; Argüelles 2000; Rontein et al. 2002). The effect of temperature was explored on the production of trehalose in conditions of thermal stress of *D. hansenii* Y7426 for 30 min (Table 6). In general, the production of the disaccharide decreased as the temperature of incubation increased; it is interesting that at low temperature (8°C), an increase of 100-150 μ M was observed under all conditions, compared to the usual temperature (30 °C). When the cells were incubated at 40 or 50°C, those grown in 1.0 M of NaCl or 0.6 and 1.0 M of KCl showed an increase of 30-100 μ M compared to the control cells (30 °C) (see Table 6).

Discussion

Several groups have confirmed that *D. hansenii* grows well in the presence of moderate salt concentrations (Neves et al. 1997; Prista et al. 1997; Thomé-Ortiz et al. 1998); however, different *D. hansenii* strains have been used; in this study, we found that under most growth conditions, the presence of moderate salt concentrations is necessary for better growth. *D. hansenii* Y7426 and CBS1793 strains grew better than *D. hansenii* J26 strain, and of course, than *S. cerevisiae* strains, which are not salt-tolerant. The results suggest that regarding different strains of *D. hansenii*, this different behavior towards salt, as well as other parameters should be kept in mind.

All strains tested showed the high capacity of *D. hansenii* to accumulate high Na^+ concentrations in comparison to *S. cerevisiae*; however, it is important to note that the capacity of *D. hansenii* Y7426 strain to accumulate this cation was almost twice, as compared to the other two *D. hansenii* strains used. It should be noted, however, that this same strain, which accumulates more Na^+ , also showed the lowest maximum growth (Figs. 1A, B and C). Norkrans and Kylin (1969) explored the capacity of *D.*

hansenii to tolerate high concentrations of NaCl, and found that in its presence, it accumulates high internal concentrations of Na^+ . However, when placed in the presence of K^+ or Rb^+ , or even water, it rapidly extrudes sodium ions, to concentrate K^+ inside if present (Norkrans and Kylin. 1969). Since the net accumulation balance is due to the balance between cation uptake and extrusion (González-Hernández, in press), the differences found with the different species studied may be due to a better Na^+ extrusion and better uptake capacity of K^+ in *D. hansenii*.

The results of this work show the high capacity of *D. hansenii* to produce trehalose, as compared to *S. cerevisiae*, both under basal and moderate salt stress. Our results suggest a possible role of trehalose in the metabolism of *D. hansenii* as a carbohydrate reserve. The main role of trehalose in fungi has been considered as a storage compound (Thevelein, 1984); apparently, in this yeast, it has a similar role. The pure product isolated from the extracts was in fact, trehalose, as demonstrated by comparing the ^{13}C -NMR spectra from the material extracted, and that of the pure sugar, as well as the chromatographic

mobility by TLC. Results from both thin-layer chromatography (TLC) and trehalase assay showed too that concentrations of trehalose diminished under saline stress conditions in *D. hansenii* Y7426 strain.

The protective effects of trehalose are linked to the stabilization of membranes and the preservation of enzyme activity (Crowe et al. 1984; Anchordoguy et al. 1987). The viability and thermal stability of sensitive strains to dehydration can be improved by the addition of certain amounts of disaccharides (trehalose, maltose) to the suspending media in which the cells are to be freeze-dried. Trehalose, like other polyols, could act by replacing water molecules involved in the maintenance of the tertiary structure of proteins through multiple external hydrogen bonds (Arakawa and Timasheff, 1982; Crowe et al., 1984; Anchordoguy et al., 1987; Stambuk et al., 1993); this may be one of the possible role of trehalose found in *D. hansenii* (Y7426) to explain its high viability under moderate saline stress conditions.

It has been reported that exponential cells improve their stress tolerance towards high salinity by producing and accumulating high intracellular glycerol

levels (Adler and Gustafsson, 1980; Larsson, 1990), whereas stationary phase cells improve their dehydration resistance upon exposure to saline growth conditions. During this growth phase, they lack glycerol, but accumulate instead high concentrations of arabinitol; Khroustalyova (2001) found that *D. hansenii* J26 strain cultivated in medium containing 10% (w v⁻¹) NaCl, resulted in an additional increase in cellular resistance to dehydration, which was most marked for stationary phase cells; their results seem to indicate that arabinitol, but not glycerol, might have a protective function in *D. hansenii* J26 strain under dehydration conditions. From our results, we suggest that possibly trehalose was the principal protective disaccharide under dehydration conditions in the Khroustalyova (2001) experiments; this is also in agreement with the data reported by Wiemken (1995), and Panek (1995).

In several yeasts, defense responses to salt stress are based on osmotic adjustment by osmolyte synthesis and cation transport systems for sodium exclusion. Polyols, and especially glycerol, are the major osmolytes produced by yeast (Blomberg and Adler,

1992; Brown 1990). To increase osmolarity in the cell under salt stress, glycerol is produced as the major osmolyte by exponentially growing cells in the yeasts *D. hansenii*, *S. cerevisiae* and *Z. rouxii* (Gustafsson and Norkrans, 1976; Adler et al. 1985; Larsson and Gustafsson, 1987; Blomberg and Adler, 1989; Yagi, 1991). Accumulated glycerol is considered to function as an osmoregulator and an osmoprotector of enzymatic activities under salt stress (Brown and Simpson, 1972; Brown 1978). In *D. hansenii* and *Z. rouxii*, the maximal intracellular glycerol concentration increases approximately in proportion to the NaCl concentration of the growth medium (Gustafsson and Norkrans, 1976; Yagi, 1988). This provides more evidence to support the established opinion about the role of glycerol in cells under salt stress. In our experiments, it was found that *D. hansenii* accumulates more glycerol than trehalose under saline stress (2.0 and 3.0 M of salts). However, under moderate NaCl stress, yeast cells accumulate more trehalose.

The data presented in this comparative analysis might also have biotechnological implications and point to

D. hansenii as an interesting model cell for further investigations of eucaryotic responses to dehydration stress by industries producing active or instant dry yeasts constantly searching for new ways to increase the quality of their products. Further studies of the mechanisms behind this extreme resistance to dehydration might provide new avenues for inducing similar resistance in the yeast *S. cerevisiae*. In addition to osmotic stress, high salinity also leads to ion toxicity effects, but specific responses to this form of stress are quite unknown (Serrano, 1996).

References

1. Adler L, Gustafsson L (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch Microbiol 124:123-130.
2. Adler L, Pedersen A, Tunbland-Johansson I (1982) Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. Physiol Plant 56:139-142.
3. Adler L, Blomberg A, Nilsson A (1985) Glycerol metabolism and

- osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* 162:300–306.
4. André L, Nilsson A, Adler L (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Gen Microbiol* 134:669–677.
 5. Arakawa T, Timasheff SN (1982) Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* 21:6536–6544.
 6. Argüelles JC (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* 174:217–224.
 7. Bayley RM, Morton RA (1978) Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *Crit Rev Microbiol* 6:151–205.
 8. Blomberg A, Adler L, (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171:1087–1092.
 9. Blomberg, A. and Adler, L (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 145–212.
 10. Brown AD (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv Microbiol Physiol* 17:181–242.
 11. Brown AD, Simpson JR (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72:589–591.
 12. Brown AD (1990) Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
 13. Crowe, J. H., Crowe, L. M. and Chapman, D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 223: 701–703.
 14. Anchozdoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987) Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324–331.
 15. Araujo, P. S; Panek, A. C; Ferreira, R. and Panek. A. D (1989) Determination of trehalose in biological samples by a simple and stable trehalase preparation.

- Analytical Biochemistry. 176: 432-436.
16. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM, Anchordguy TJ, Drobnis E (1989) Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 26:76–84.
 17. Crowe LM, Reid DS, Crowe JH (1996) Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J* 71:2087-2093.
 18. Elbein AD (1974) The metabolism of α,α -trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 30:227–256.
 19. González-Hernández JC, Peña A (2002) Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol* 44:137-156.
 20. González-Hernández JC, Cárdenas-Monroy CA, Peña A (In press) Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*
 21. Gustafsson L, Norkrans B (1976) On the mechanism of salt tolerance. Production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* 110:177-183.
 22. Higgins CF, Cairney J, Stirling DA, Sutherland L, Booth IR (1987) Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal. *Trends Biochem Sci* 12:339-344.
 23. João AJ, Polizeli TMML, Thevelein JM, Terenzi HF (1997) Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 154:165-171.
 24. Jovall PA, Tublad-Johansson I, Adler L (1990) ^{13}C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* 154:209-214.
 25. Khroustalyova G, Adler L, Rapoport A (2001) Exponential growth phase cells of the osmotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* are extremely resistant to dehydration stress. *Process Biochemistry* 36:1163-1166.
 26. Larsson C, Gustafsson L (1987) Glycerol production relation to the ATP pool and heat production rate

- of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. Arch Microbiol 147:358–363.
27. Larsson C, Morales C, Gustafsson L (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grow in a chemostat at different salinities. J Bacteriol 172:1769-1774.
 28. LeRudulier D, Strom AR, Dandekar AM, Smith LT, Valentine RC (1984) Molecular biology of osmoregulation. Science 224:1064-1068.
 29. Meikle AJ, Chudek JA, Reed RH, Gadd GM (1991) Natural abundance ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress. FEMS Microbiol Lett. 66:163-167.
 30. Neves ML, Oliveira RP, Lucas CM (1997) Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Microbiology 143:1133–1139.
 31. Norkrans B, Kylin A (1969) Regulation of potassium to sodium ratio and the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. J Bacteriol 100:836-845.
 32. Panek AD (1995) Trehalose metabolism-new horizons in technological applications. Brasil J Med Biologic Res 1995:169-185.
 33. Peña A, Cinco G, García A, Gómez-Puyou A, Tuena M (1967) Effect of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta 148:673-682.
 34. Peña A, Uribe S, Clemente M, Sánchez N (1992) Rehydration temperature is critical for metabolic competence and for membrane integrity in active dry yeast (ADY). Arch Microbiol 158:75-80.
 35. Prista C, Almagro A, Loureiro-Días MC, Ramos J (1997) Physiological basis for the high tolerance of *Debaryomyces*

- hansenii*. Appl Environ Microbiol 63:4005-4009.
36. Rontein D, Basset G, Hanson AD (2002) Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. Metab Eng 4:49-56.
 37. Stambuk BU, Crowe JH, Crowe LM, Panek AD, de Araujo PS (1993) A dependable method for the synthesis of [¹⁴C]trehalose. Anal Biochem 212:150-153.
 38. Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. Int Rev Cytol 165:1-52.
 39. Strom AR, Kaasen I (1993) Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol Microbiol 8:205-210.
 40. Sue HL, Pringle JR (1980) Reserve Carbohydrate metabolism in *Sacharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation. J Bacteriol 143:1384-1394.
 41. Thevelein JM (1984) regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol Rev 48:42-59.
 42. Thevelein JM, Hohmann S (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? Trends Biochem Sci. 20:3-10.
 43. Thomé-Ortiz PE, Peña A, Ramírez J (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. Yeast. 14:1355-1371.
 44. Wieland OH (1965) Glycerol. In Bergmeyer, H. U. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, 3rd edn. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 598-606.
 45. Wiemken A (1995) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. Antonie Van Leeuwenhoek. 58:209-217.
 46. Yagi T (1988) Intracellular levels of glycerol necessary for initiation of growth under salt-stressed conditions in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. FEMS Microbiol Lett 49:25-30.
 47. Yagi T (1991) Effects of increases and decreases in the external salinity on the intracellular glycerol and inorganic ion content

in the salt-tolerant yeast.
Microbios. 68:109–117.

Figure legends:

Figure 1. Growth of *D. hansenii* cells: A) Y7426 strain, B) J26 strain, C) CBS1793 strain; and *S. cerevisiae* cells: D) La Azteca, E) Active Dry Yeast; under different saline stress conditions. □ = without salt (C); ○ = 0.6 M NaCl (Na06); △ = 1.0 M NaCl (Na1); ▽ = 0.6 M KCl (K06); ◇ 1.0 M KCl (K1). Results are the means of three experiments.

Figure 2. Natural abundance ¹³C-NMR spectra of dried samples (trehalose control and cells extracts at the stationary phase) of *D. hansenii* (Y7426) (B-D) grown without and with salt stress. A) Sigma trehalose reagent, B) cells C, C) Na06 cells, D) K06 cells. The 100.0-55.0 ppm region of the spectrum is shown. Trehalose peaks: C₁ = 93.86, C₂ = 73.2, C₃ = 72.79, C₄ = 71.7, C₅ = 70.36 and C₆ = 61.23.

Figure 3. Thin-layer chromatography (TLC): standard sugars (A) and dried samples of cell extracts of stationary

phase (B). **A:** a) trehalose, b) galactose, c) glucose, d) mannitol, e) sorbitol, f) maltose, g) sucrose, h) raffinose and h) trehalose. **B:** a) trehalose control, b) *S. cerevisiae* La Azteca grown in YPD, (c-k) *D. hansenii* (Y7426) grown in different conditions; c) C, d) Na06, e) Na1, f) Na2, g) Na3, h) K06, i) K1, j) K2, k) K3 and l) trehalose control.

Figure 4. Trehalose (empty bars) and glycerol (filled bars) content of *D. hansenii* (Y7426) (b-j), *S. c.* La Azteca cultivated without salt (a); b) C, c) Na06, d) Na1, e) Na2, f) Na3, g) K06, h) K1, i) K2, j) K3. All extracts were obtained at the stationary phase without starvation. Trehalose and glycerol were measured as described under Methods. Results are the means ± SEM (n = 3).

Table 1. Duplicating time of *D. hansenii* and *S. cerevisiae* grown in different media.

	Doubling time (h)				
	Y7426	J26	CBS1793	<i>S. c.</i>	ADY
C	3.2	2.28	2.5	0.76	0.93
Na06	2.75	2.44	2.13	1.89	2.5
Na1	3.17	2.22	2.32	3.33	4.45
K06	2.56	2.37	1.95	1.3	1.68
K1	3.7	1.88	2.63	1.37	1.95

Duplicating time was determined from the exponential phase of the curves. Cells were grown as described under Methods. Results are the means of three experiments.

Table 2. Intracellular concentrations of Na⁺ (A) and K⁺ (B) of cells from different yeast strains grown in the absence or presence of different concentrations of NaCl or KCl.

A	<i>D. hansenii</i>			<i>S. cerevisiae</i>	
	Na ⁺ [mM]				
	Y7426	J26	CBS1793	<i>S. c.</i>	ADY
C	10.24	9.06	10.59	9.56	2.88
Na06	186.39	100.67	113.96	70.59	48.29
Na1	211.78	134.28	118.16	167.63	135.66
K06	3.16	9.34	6.82	6.1	3.02
K1	2.48	5.08	23.33	8.70	1.34

B	<i>D. hansenii</i>			<i>S. cerevisiae</i>	
	K ⁺ [mM]				
	Y7426	J26	CBS1793	<i>S. c.</i>	ADY
C	180.35	196.47	212.17	287.33	132
Na06	111.25	225.42	236.79	198.33	121
Na1	61.43	184.28	193.25	108.5	33
K06	218.73	230.66	233.5	216.16	124.33
K1	198.96	236.80	208.75	225.91	123.33

After growth and twice washing with water, the cells (50 mg) grown for 36 h were disrupted by incubation with 1 ml of 2 mM cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) for 15 min at room temperature; the suspension was centrifuged and adequate dilutions of the supernatant were used to measure Na⁺ and K⁺ in the flame photometer. Results are the means of three experiments.

Table 3. Effect of NaCl and KCl on trehalose content of *D. hansenii* and *S. cerevisiae* cells at the stationary phase without starvation.

	<i>D. hansenii</i>			<i>S. cerevisiae</i>	
	Trehalose [μM]				
	Y7426	J26	CBS1793	<i>S. c.</i>	ADY
C	424.57	427.15	426.29	40.09	95.93
Na06	392.77	414.76	422.57	64.94	326.98
Na1	273.13	432.71	427.21	17.13	15.99
K06	424.46	413.25	422.47	50.33	213.59
K1	301.37	426.67	419.23	7.97	162.71

After growth the cells were disrupted by boiling the cell suspensions at 92 °C in a water bath for 15 min. After centrifugation the supernatant was frozen until analysis. In adequate dilutions of the supernatant, trehalose was measured as described under Methods.

Table 4. Effect of NaCl and KCl on the trehalose content of *D. hansenii* and *S. cerevisiae* cells starved after growing to the stationary phase.

	<i>D. hansenii</i>			<i>S. cerevisiae</i>	
	Trehalose [μM]				
	Y7426	J26	CBS1793	<i>S. c.</i>	ADY
C	120.82	398.91	378.11	22.31	42.12
Na06	140.66	343.24	201.66	58.74	137.44
Na1	74.26	291.13	155.64	2.80	7.07
K06	222.36	337.21	252.76	38.21	63.29
K1	216.22	257.50	140.82	7.81	63.72

After growth the cells were starved for 14 hrs, and disrupted by boiling the cell suspensions at 92 °C in a water bath for 15 min. After centrifugation the supernatant was frozen until analysis. Using adequate dilutions of the supernatants, trehalose was measured as described under Methods.

Table 5. Viability of *D. hansenii* (Y7426) strain grown with different salt concentrations.

	Viabilidad (%)
C	100
Na06	100
Na1	100
Na2	15
Na3	5
K06	100
K1	100
K2	57
K3	5

Data are representative of six experiments performed as described in materials and methods.

Table 6. Effect of incubation for 30 min at different temperatures on trehalose content of *D. hansenii* (Y7426) strain cells grown to the stationary phase without starvation.

	<i>D. hansenii</i> (Y7426) [μM]			
	8° C	30° C	40° C	50° C
C	512.53	424.57	362.60	329.85
Na06	512.37	392.77	348.41	327.42
Na1	424.60	273.13	302.95	278.55
K06	512.37	424.46	489.92	422.0
K1	504.59	301.37	403.53	373.13

After growth of the cells under the different conditions, they were incubated at different temperatures (8, 30, 40 and 50° C) during 30 minutes; cellular extracts were obtained, and trehalose content was determined as described under materials and methods. Results are the means of three experiments.

Figure 1A

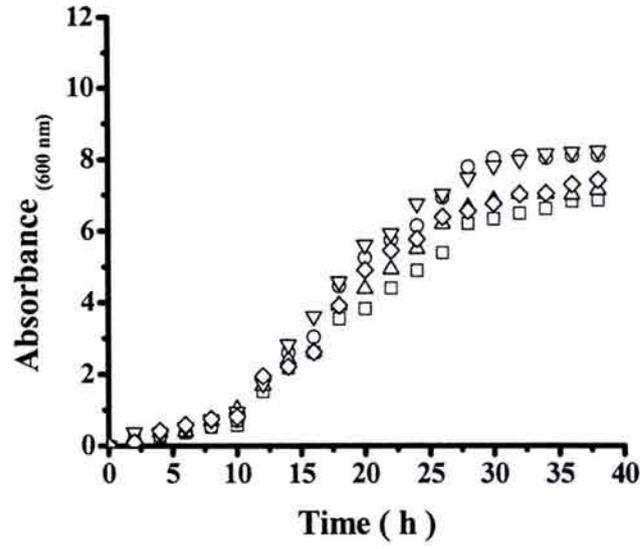


Figure 1B

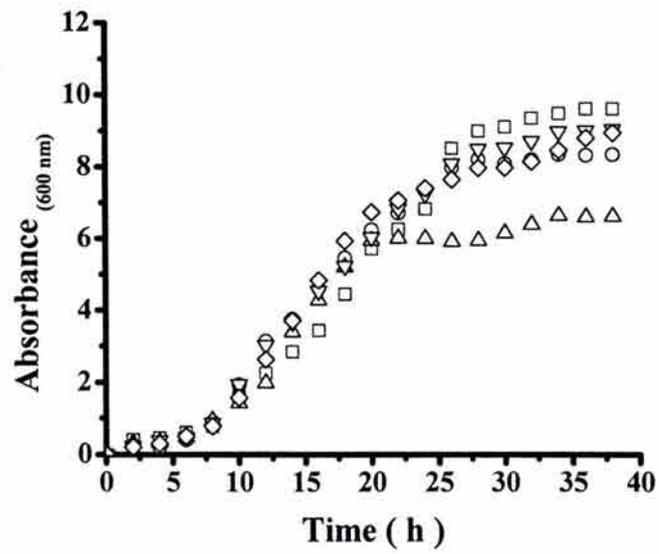


Figure 1C

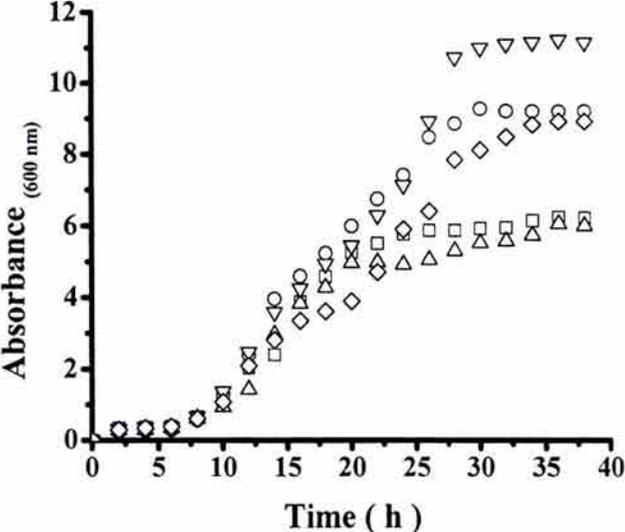


Figure 1D

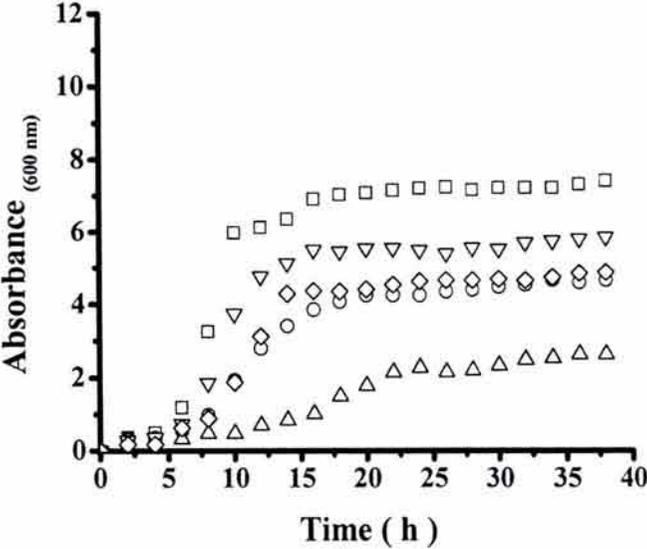


Figure 1E

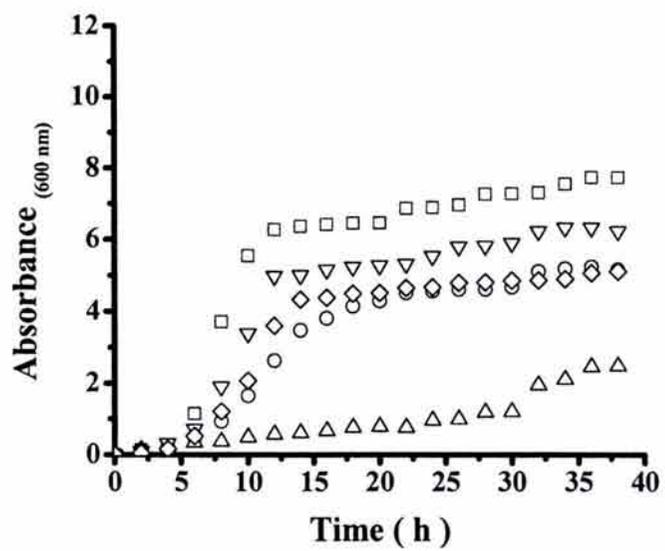


Figure 2

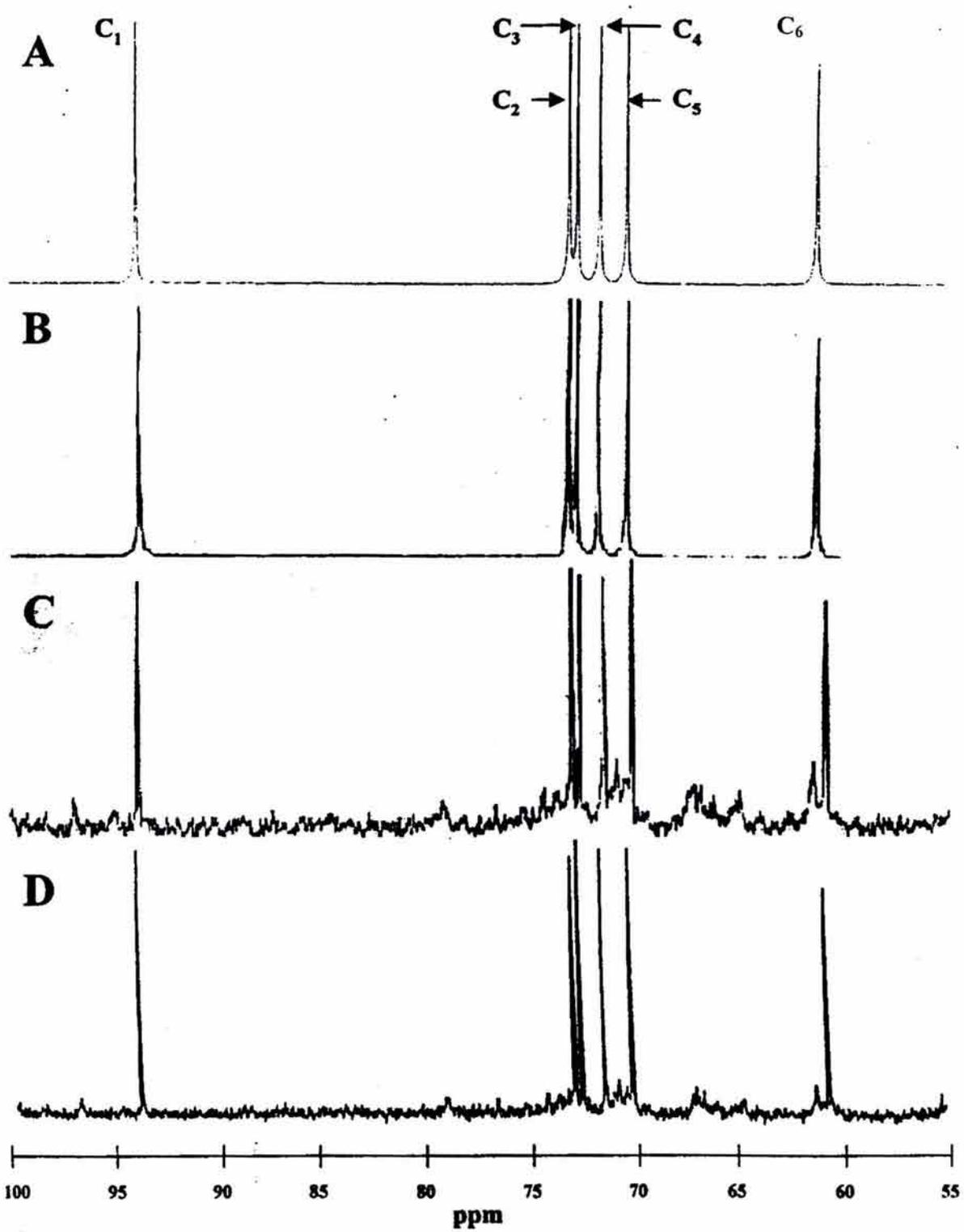


Figure 3

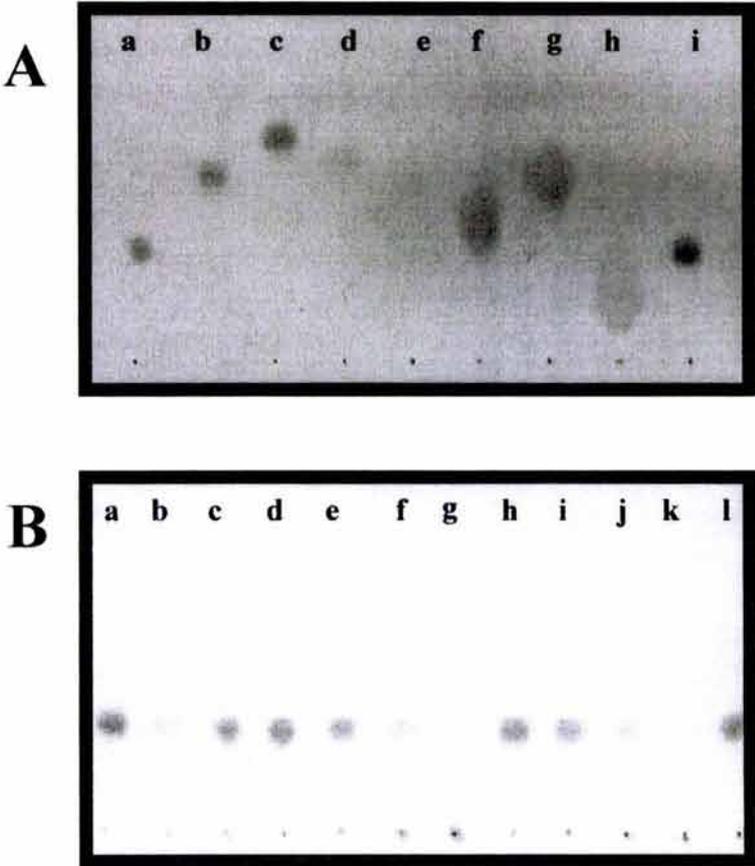


Figure 4.

