



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO DEL pH ELEVADO Y LA SAL SOBRE**

***Debaryomyces hansenii.***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.F.B. NORMA SILVIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA, IFC  
DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ, FACULTAD DE MEDICINA



México, D. F. enero, 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA:**

A mis adorados hijos Andrés y Ana Paulina quienes cambiaron mi sentido por la vida, por todo el apoyo y amor que recibo día a día.

Este logro es de ustedes también. Los amo con todo mi corazón.

A mi abuelita Graciela Ríos quien es una segunda madre para mí, por su amor incondicional.

A mi madre, porque sé que se sentirá orgullosa desde donde esté...

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra Máxima Casa de Estudios, porque pertenecer a ella como alumna, académica y nuevamente como alumna es todo un honor.
- Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por poder cumplir uno más de mis anhelos profesionales con el apoyo de las autoridades.
- Al Dr. Antonio Peña Díaz, mi jefe y Tutor; por creer en mí, por insistirme en continuar mi preparación académica y por apoyarme en ello.
- A los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez por los acertados comentarios y sugerencias durante los exámenes tutoriales.
- A la Dra. Martha Calahorra Fuertes por su apoyo técnico para la realización de esta tesis.
- Al Ing. Juan Manuel Barbosa y a la Ing. Ivette Rosas por el apoyo técnico recibido.
- Al Dr. Jorge Ramírez Salcedo y al M. en IBB. Simón Guzmán León de la Unidad de Microarreglos del IFC, por el apoyo para la realización del microarreglo de *Debaryomyces hansenii*
- A la Dra. Laura Ongay y a la M. en C. Minerva Mora de la Unidad de Biología Molecular del IFC por su ayuda en la realización de los experimentos de citometría de flujo.
- Al Dr. Roberto Arreguín por la lectura crítica del escrito.
- A la Sra. María del Rocío Romualdo Martínez, por su asistencia secretarial.
- Al Sr. René Flores por su apoyo como laboratorista en el lab. 306 oriente del IFC.
- A las fuentes de financiamiento: PAPIIT: IN2008; 11/24 y CONACyT 100547.

### Otras Dedicatorias:

- A mi amiga Martha Calahorra, por todos estos años de amistad y apoyo, ¡mil gracias!
- A mis compañeros de laboratorio y alumnos: Cristy, Omar, Luis y Raúl; es un gusto compartir mi día a día con ustedes.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	13
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo General	15
4.2. Objetivos Particulares	15
5. METODOLOGÍA	
5.1. Medios de cultivo y cepa	16
5.2. Incubaciones a pH constante	16
5.2.1 Equipo	
5.2.2 Medio de incubación	
5.3 Crecimiento y viabilidad	16
5.3.1 Diferencia de densidad óptica	17
5.3.2 Peso húmedo	17
5.3.3 Unidades Formadoras de Colonias (CFU's)	17
5.3.4 Tinción con FUN-1	17
5.3.4.1 Observación al microscopio	17
5.3.4.2 Citometría de flujo	17
5.3.5 Curvas de crecimiento	18
5.4 Determinación del K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> total en las levaduras	18
5.5 Determinación de consumo de oxígeno	18
5.6 Transporte de K <sup>+</sup> y acidificación del medio	18
5.7 pH Interno	19
5.8 Producción de etanol (Fermentación)	19
5.9 Transporte e incorporación de <sup>3</sup> H-Leucina	19

## 6. RESULTADOS

6.1 Acidificación del medio.	
6.1.1 Incubación de 4h_____	21
6.1.2 Incubaciones de 16 h_____	22
6.2. Experimentos para medir el crecimiento de las levaduras_____	22
6.2.1 Diferencia de densidad óptica_____	23
6.2.2 Diferencia en peso húmedo_____	24
6.3 Experimentos de Supervivencia_____	25
6.3.1 Unidades Formadoras de colonias (UFC´s)_____	25
6.3.2 Tinción con FUN-1 (Observación al microscopio)_____	26
6.3.3 Tinción con FUN-1 (Citometría de flujo)_____	28
6.3.4 Curvas de Crecimiento_____	29
6.4 Medida de las funciones celulares_____	33
6.4.1 Contenido de K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> en células incubadas 4 h_____	33
6.4.2 Determinación del Consumo de Oxígeno	
Células incubadas 4 horas_____	34
6.4.3 Determinación de Consumo de Oxígeno.	
Células incubadas 16 horas_____	35
6.4.4 Transporte de K <sup>+</sup> .	
Células incubadas 4 horas_____	38
6.4.5 Transporte de K <sup>+</sup>	
Células incubadas 16 horas_____	39
6.4.6 Bombeo de protones al medio (o capacidad de acidificación) Células incubadas 4 horas_____	40
6.4.7 Bombeo de protones al medio (o capacidad de acidificación) Células incubadas 16 horas_____	41
6.4.8 pH Interno_____	43
6.4.9 Contenido de etanol en los medios de incubación	
4 y 16 h_____	46
6.4.10 Fermentación producida por las células	
incubadas 16 horas_____	47
6.4.11 Transporte e incorporación de <sup>3</sup> H-Leucina_____	48

## 7. DISCUSIÓN

7.1 Crecimiento y sobrevivencia	50
7.2 Contenido de K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> internos	51
7.3 Consumo de Oxígeno	51
7.4 Transporte de K <sup>+</sup>	52
7.5 Acidificación del medio	52
7.6 pH Interno	53
7.7 Producción de etanol durante la incubación y capacidad de fermentación de las células tratadas	54
7.8 Transporte e Incorporación de <sup>3</sup> H-Leucina	54
7.9 Integración de los resultados	54
8. CONCLUSIONES	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. BIBLIOGRAFÍA	58

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CCCP	Carbonilcianuro <i>m</i> -clorofenilhidrazona
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FUN-1	Yoduro de [2-Cloro-4-(2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il) metilendieno)-1-fenilquinolinio]
G	Glucosa
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
MOPS	Ácido (3-[N-morfolino]propanosulfónico
ON	“Overnight” Incubación realizada por 16 h en el pHStat
pH6Na	Incubación en YPD a pH6 con 1 M de NaCl
pH8Na	Incubación en YPD a pH8 con 1 M de NaCl
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> , medio de cultivo
TEA	Trietanolamina



## RESUMEN

*Debaryomyces hansenii* es una levadura que se caracteriza por una alta tolerancia al sodio y al pH alcalino; su halotolerancia resulta de diferentes estrategias de adaptación como la osmorregulación, que involucra la expulsión de sodio, la adaptación de ciertas vías metabólicas y la síntesis de compuestos orgánicos compatibles que favorecen las funciones celulares en presencia de este catión.

En este trabajo se analizó la viabilidad y crecimiento de *D. hansenii*, por diversas metodologías, en presencia o ausencia de 1 M de NaCl y a pH 6 u 8, para evaluar su capacidad de adaptación a ambos tipos de estrés.

Se estudió su capacidad de acidificar el medio; la presencia de sal estimuló la acidificación del medio por la levadura. Se observó asimismo un cambio en el pH interno que depende de la presencia de sal y del pH externo. Se midió la fermentación de las levaduras cultivadas en presencia o ausencia de 1 M de NaCl y pH 6 u 8, reflejando una disminución importante a pH 8 con sal. La capacidad respiratoria y el transporte e incorporación de leucina no cambian en ninguna de las condiciones probadas.

Todos los cambios observados en el metabolismo energético parecen influir en la viabilidad y crecimiento de *D. hansenii*. Esta levadura es capaz de adaptarse a condiciones de estrés salino y alcalino reflejando una disminución en su viabilidad y un retardo en el inicio de la fase logarítmica de crecimiento, sin que ello le resulte letal.

Dado que *D. hansenii*, aunque tolera el pH elevado y la presencia de sal, su comportamiento metabólico y energético es superior a pH 6, concluimos que es una levadura alcali-halotolerante y no halofílica, como proponen algunos autores.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Halofilia y halotolerancia

La vida microbiana se encuentra presente en ambientes con diferentes márgenes de concentración de sal, desde el agua dulce y marina hasta ambientes hipersalinos con concentraciones de NaCl cercanas a la saturación. Hay microorganismos halófilos y halotolerantes pertenecientes a los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*, y pueden colonizar exitosamente todo tipo de ambientes tales como lagos salados o comida salada y pueden alcanzar densidades poblacionales muy altas. Los halófilos se caracterizan por necesitar condiciones salinas para su crecimiento, mientras que los halotolerantes pueden crecer tanto en medios con salinidad elevada como en ausencia de altas concentraciones de sales (Das Sarma y Das Sarma, 2012).

Ya que las membranas biológicas son permeables al agua, cuando la actividad de ésta en el citoplasma de las células es más alta de lo que está en el ambiente salado externo, ocurre una pérdida de agua hacia el exterior. Por ello, cualquier microorganismo que vive en concentraciones elevadas de sal debe mantener su citoplasma al menos isotónico con respecto al ambiente extracelular.

Existen dos estrategias fundamentales en el ambiente microbiano que permiten a los microorganismos contender con el estrés osmótico inherente a la presencia de una concentración elevada de sal: (i) las células mantienen una concentración intracelular alta de sal, al menos osmóticamente equivalente a la concentración externa (la estrategia “salt-in”) y por lo tanto, todos los sistemas intracelulares deben estar adaptados a dicha estrategia; por ejemplo, enzimas tolerantes a la sal con características especiales, como un alto porcentaje de aminoácidos ácidos y pocos aminoácidos hidrofóbicos. (ii) Las células mantienen una baja concentración de sales (la estrategia “salt-out”); la presión osmótica del medio es entonces balanceada con solutos compatibles orgánicos (Oren, 1999). Los solutos compatibles pueden ser sintetizados por el propio microorganismo o pueden ser internalizados del exterior cuando están disponibles. Esta estrategia no requiere de proteínas especialmente adaptadas. Los solutos compatibles se definen como aquellos que a altas concentraciones (en el orden de Molar), permiten el funcionamiento adecuado de las enzimas. La naturaleza química de éstos es variada, desde polioles como el glicerol y arabitol, azúcares como la trehalosa y sacarosa, aminoácidos y aminos cuaternarios como la glicina betaína. La característica común es que son de bajo peso molecular, solubles en agua con o sin carga o zwitteriónicos a pH fisiológico.

Cualquiera que sea la estrategia utilizada, es obvio que la vida en altas concentraciones de sal es muy costosa desde el punto de vista energético. Ya se trate de establecer y mantener un gradiente importante de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana celular o la biosíntesis de grandes cantidades de compuestos orgánicos compatibles, son mecanismos que implican un gasto de energía para la célula.

### 1.1.1. Genes de respuesta a estrés salino en *Saccharomyces cerevisiae*

En *Saccharomyces cerevisiae* se han investigado los genes involucrados en la respuesta al estrés salino (Figura 1). Estos incluyen genes de regulación negativa a la respuesta al estrés salino como *NGR1* y *NGR2*, que se encuentran involucrados en la regulación negativa de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II. Los genes de respuesta a la salinidad hiperosmótica como *RIM101*, que es un factor de transcripción que reprime los genes regulatorios *NGR1* y *SMP1* y un factor de transcripción activado por calcineurina, *CRZ1*, que actúa en el promotor de *ENA1*. También *HOT1*, (High-Osmolarity-induced Transcription), que es un factor de transcripción necesario para la inducción de la biosíntesis de glicerol. Además se requieren unas proteínas de dedos de zinc, *MSN1*, *MSN2* y *MSN4*, para la inducción transcripcional a través del elemento de respuesta a estrés (STRE, por sus siglas en inglés); *USV1* es un gen de respuesta al estrés salino que participa en la activación transcripcional de la ARN polimerasa II durante el crecimiento en medio no fermentable y en presencia de estrés salino (*Saccharomyces* Genome database).

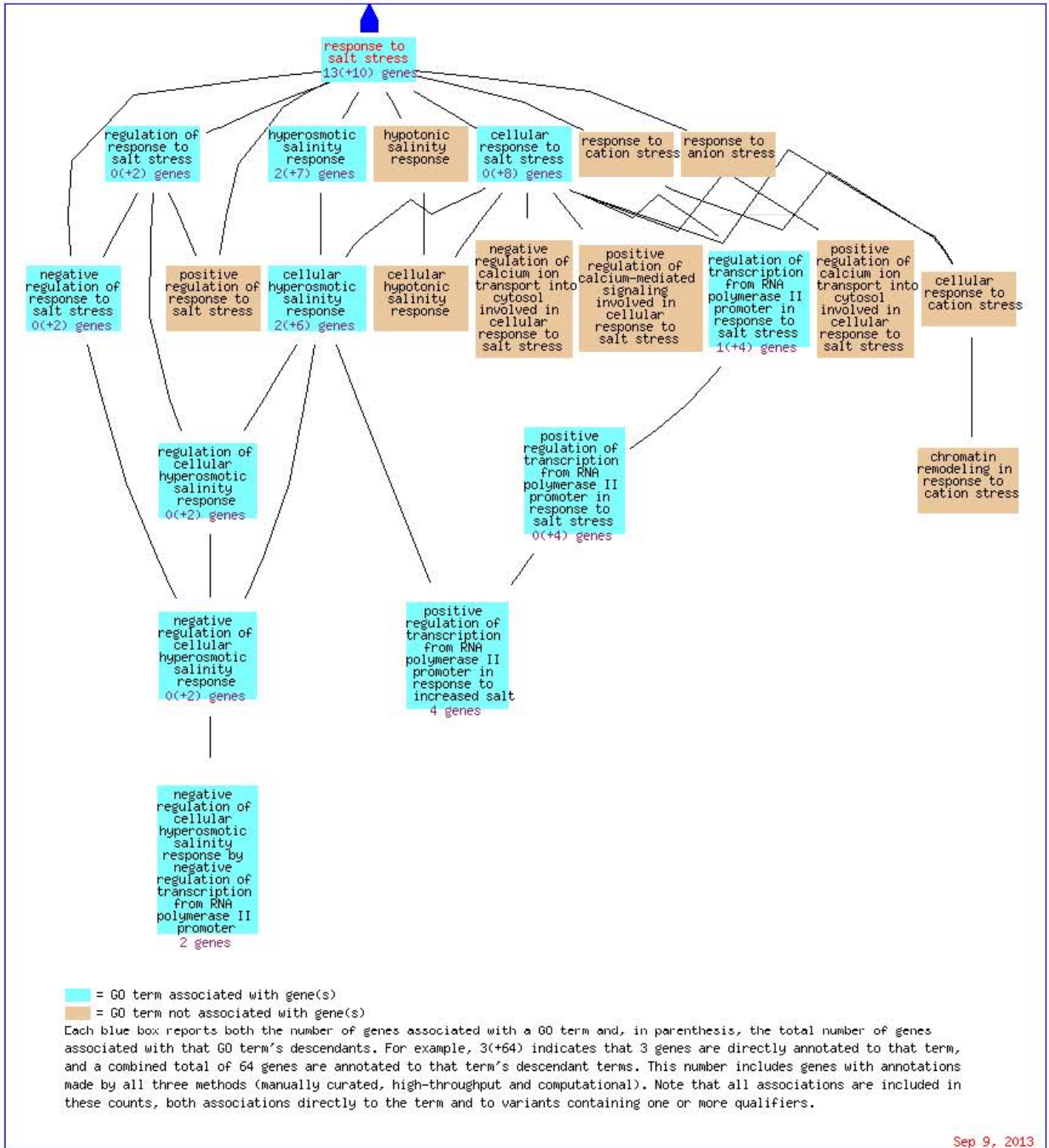
Los genes de los transportadores involucrados en la homeostasis de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se describen más adelante.

## 1.2 Adaptación al pH elevado

Algunos microorganismos exhiben más de un pH óptimo para su crecimiento, dependiendo de las condiciones de cultivo, particularmente los nutrientes, temperatura y la presencia de metales en el medio. Los alcalófilos obligados necesitan un pH comprendido entre 8.5 y 11 para desarrollarse y no crecen o crecen muy poco en pH's cercanos a la neutralidad; mientras que los alcalófilos facultativos pueden cultivarse dentro de límites de pH inferiores a los indicados. Existen microorganismos que aparte de ver favorecido su crecimiento a pHs elevados, pueden tolerar al mismo tiempo altas concentraciones de sal, a éstos se les llama haloalcalófilos y en su mayoría pertenecen a las arqueas.

En general, el margen de pH para el crecimiento de las levaduras es entre 3.0 y 7.6, con un pH óptimo de 5 a 6. Algunas levaduras como *Rhodotorula glutinis* son capaces de crecer a un pH cercano a 9; sin embargo, no hay muchos estudios bioquímicos ni fisiológicos de tolerancia al pH en levaduras, a pesar de la gran cantidad de ellos en bacterias (Kurita y Yamazki, 2002).

La mayoría de los estudios relacionados con la respuesta al estrés alcalino en levaduras se han realizado en *S. cerevisiae*. El mantenimiento de un ambiente ácido se basa primeramente en la extrusión activa de protones que está mediada por la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática codificada por el gen *PMA1*. EL gradiente de potencial electroquímico de protones generado es crítico para la entrada de diferentes nutrientes, incluyendo diversos cationes.



**Figura 1. Genes de respuesta a estrés salino en *Saccharomyces cerevisiae*.** Cada caja azul reporta los genes asociados con el término GO (*Gene Ontology*) y entre paréntesis el número total de genes asociados con los descendientes del término GO. Por ejemplo, 3(+64) indica que 3 genes están directamente anotados en ese término y un total de 64 genes están anotados como relacionados. Este número incluye genes con anotaciones hechas por 3 métodos: manualmente curados, rastreo de alto rendimiento y análisis computacional. Las cajas café son términos de GO no asociados con genes. Para más información, seguir la siguiente liga: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goView.pl?qoid=9651>, revisado el 9 de septiembre de 2013.

La secreción de ácido fue explicada inicialmente por la teoría redox, aunque en esos años ya se conocía que no existían acarreadores respiratorios en la membrana plasmática de la levadura; la teoría más plausible fue propuesta por Peña *et al.* (1972), en la cual el bombeo de protones se podía atribuir a una H<sup>+</sup>-ATPasa. Experimentos posteriores confirmaron esta propuesta (Peña, 1975). Es interesante que a través de otro enfoque, Slayman *et al.* (1973) propusieron una bomba de H<sup>+</sup> similar en *Neurospora crassa*.

Las células tienen diferentes proteínas de transporte, responsables de controlar la composición de iones y solutos tanto del citoplasma como de los organelos. El pH citoplasmático es un parámetro celular particularmente importante, que es crucial en procesos como el control del crecimiento y el metabolismo; en este caso, el pH se encuentra regulado por transportadores tales como los intercambiadores catión/H<sup>+</sup>, mientras que el pH en los compartimentos intracelulares se encuentra regulado por una familia de bombas de protones dependientes de ATP, como la (H<sup>+</sup>)-ATPasas de la vacuola.

Una alcalinización del ambiente extracelular representa una condición de estrés para *S. cerevisiae* (y para otras levaduras también). Para sobrevivir, debe detectar el cambio y reaccionar ante él iniciando una respuesta adaptativa. La respuesta de esta levadura a la alcalinización del ambiente se ha caracterizado con cierto detalle en los últimos años, en muchos casos a través del estudio de mutantes sensibles a condiciones de pH alto y/o la definición de los ajustes transcripcionales después de la exposición a pH's alcalinos (Serrano *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Genes de respuesta a estrés alcalino en *S. cerevisiae*

La respuesta al estrés alcalino está definida como cualquier proceso que resulte en un cambio en el estado o actividad de la célula (en términos de movimiento, secreción, producción de enzimas, expresión génica, etc.) que sea el resultado de un estímulo de pH > 7 (*Saccharomyces* Genome database).

Se han realizado algunos estudios sobre este efecto, fundamentalmente sobre los cambios de expresión de algunos genes. Se ha visto un aumento de expresión al aumentar el pH del medio en genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (*ALD4*, *DLD3*, *SDH4*), en el transporte de fosfatos (*PHO12*, *PHO84*, *PHO89*, etc.), en el transporte de iones y homeostasis (*ENA1*, *CST13*, *FIT12*, *ARN2*, *ARN3*, etc.) e involucrados en la respuesta al estrés (*HSP30*, *PAI1*, *CCP1*, etc.) y principalmente los genes involucrados en el ciclo celular, como *RIM101*, que es un regulador positivo de la meiosis, entre otros (Serrano *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004).

Interesantemente, la respuesta en *S. cerevisiae* es más compleja que en otros hongos, por ejemplo *Aspergillus nidulans*. En este microorganismo, el factor de transcripción PacC de dedos de zinc juega un papel primordial mediando la regulación del pH, activando directamente promotores de respuesta al pH. En *S. cerevisiae* está el gen que codifica para un homólogo de PacC, *RIM101*, que tiene un papel importante en la respuesta o adaptación a pH alcalino, reprimiendo la expresión de represores transcripcionales como *NRG1* (que regula negativamente una variedad de procesos, incluyendo el crecimiento filamentoso y la respuesta a pH alcalino). Además de la vía de *RIM101*, la adaptación a pH externo alto

involucra la activación por calcio de la fosfatasa calcineurina (Serrano *et al.*, 2006). *RIM21* es el sensor membranal del pH (a su vez parte de la vía Rim 101); *RIM8* está involucrado en la activación proteolítica de *RIM101*. Como se mencionó anteriormente, *RIM101* participa también en la respuesta a estrés salino.

El grupo de Ariño ha descrito además que el estrés alcalino activa rápida y transitoriamente a *Slr2*, y que esta activación está mediada por *Wsc1* (un canal sensor membranal putativo de estrés) y que esto resulta en el incremento de la expresión de algunos genes específicos, varios de los cuales son relevantes para la adaptación al estrés alcalino (Serrano *et al.*, 2006). Más recientemente, se describió la participación de la vía PKA en la adaptación al estrés alcalino (Casado *et al.*, 2011).

### 1.3 Levaduras marinas

Las levaduras en el mar pueden provenir de la erosión o acarreo producidos por las corrientes de agua superficiales o también encontrarse asociadas a la fauna y flora acuática de los océanos. En los últimos 40 años, se han reunido suficientes evidencias para establecer que las levaduras que han sido aisladas del medio ambiente marino son parte constitutiva de la población microbiana marina, por lo que se les puede considerar como “Levaduras Marinas”. En ellas se incluyen a todas aquellas capaces de constituir y perpetuar poblaciones en el medio marino, o aquellas cuya reproducción y crecimiento ocurren preferentemente en el mar, o cuyas condiciones óptimas son las concentraciones normales de sales en el mar, entre 2.4 - 4 % de cloruro de sodio (0.41 M a 0.68 M de NaCl), (Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004).

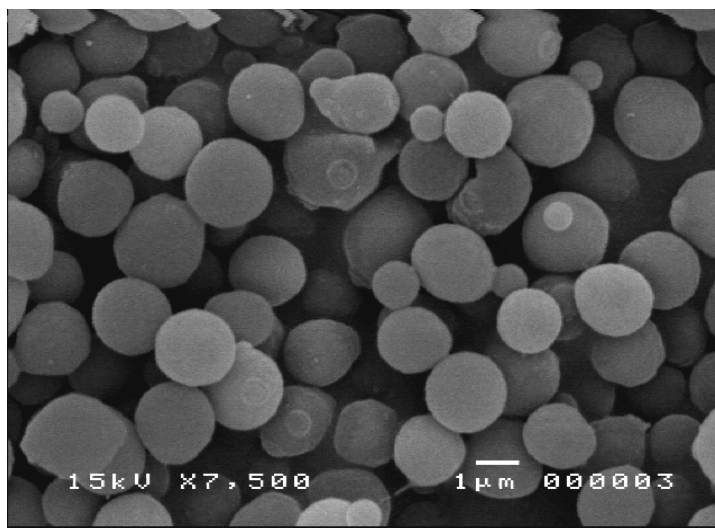
Las especies de levaduras marinas se encuentran asociadas a ambientes ricos en materia orgánica, de donde se han aislado desde la superficie del mar hasta profundidades de 4000 m (Van y Fell, 1968). Pueden asimismo soportar las tres características principales del agua de mar: la salinidad, el pH y la temperatura (Mc Neill, 1979).

La salinidad del agua de mar promedio tiene una composición definida donde sobresalen seis iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ); sin embargo, pueden haber hábitats donde sobresale algún ión, como ocurre en los estuarios, las lagunas salobres, donde el sodio es uno de los principales; en esos hábitats, se presentan los microorganismos halófilos y halotolerantes. Son varios los géneros de levaduras encontrados en el agua de mar, entre los que se pueden mencionar a *Aspergillus*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Exophiala*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Yarrowia*; su importancia ecológica radica, al menos en parte, en que participan en el reciclaje de la materia orgánica en el océano. Además, son útiles como fuentes de reactivos biológicos, proteína unicelular, vitaminas, pigmentos y probióticos y algunas de ellas pueden ser patógenas (Ochoa y Vázquez-Juárez, 2004).

## 1.4 *Debaryomyces hansenii*

### 1.4.1 Generalidades

*Debaryomyces (Toluraspora) hansenii* (Figura 2) es una levadura perteneciente a los ascomicetos; fue aislada por primera vez del océano, pero se encuentra también en alimentos con alto contenido de sal como quesos, embutidos y salmueras (Norkrans, 1966). Es un microorganismo frecuentemente utilizado como modelo de osmotolerancia.



**Figura 2. Microfotografía electrónica de células de *Debaryomyces hansenii*.** Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*D. hansenii* es además criotolerante (resistente a la congelación); puede tolerar concentraciones de sal de hasta 24% (4.1M), características que son de importancia para su papel en algunos procesos agro-alimenticios. Es la especie más común en todos los tipos de quesos, en productos lácteos y en salmueras; es capaz de metabolizar ácidos láctico y cítrico (Seiler y Busse, 1990). *D. hansenii* además provee de la actividad proteolítica y lipolítica que se requiere para la maduración de algunos quesos. De acuerdo con la definición de Das Sarma y Das Sarma (2012), se le puede considerar una levadura halotolerante. Puede producir glicerol y trehalosa como solutos compatibles (González-Hernández *et al.*, 2005).

*D. hansenii* es normalmente considerada como no patogénica; sin embargo, se ha reportado al menos un caso de infección en huesos asociada con esta levadura (Wong *et al.*, 1982), se ha identificado en muestras clínicas de infecciones superficiales, junto con su anamorfo, *Candida famata* (Nishikawa, 1996) y se ha registrado como presente en el 0.2- 2.0% de casos de candidiasis invasivas en sangre sobre todo en pacientes inmuno comprometidos (Beyda *et al.*, 2013).

La mayoría de las especies de *D. hansenii* son haploides, se aparean muy raramente y diploidizan transitoriamente por autogamia para formar un asca que suele contener una espora única (Kreger van Rij y Veenhuis, 1975; van der Walt *et al.*, 1977). Tiene dos plásmidos lineales de ADN cuya estabilidad depende de la

alta presión osmótica (Cong *et al.*, 1994). *D. hansenii* pertenece al gran clado de especies de levaduras que comprenden la mayoría de las especies de *Candida* y *Pichia*; por lo tanto, desde el punto de vista filogenético, está muy relacionada con la patógena *Candida albicans*, con la que comparte ciertas características.

La secuencia del genoma de la cepa tipo de *D. hansenii* CBS76, revela que tiene 7 cromosomas de entre 1.25 Mb y 2.33 Mb con un tamaño total de 12.2 Mb. Tiene la más alta capacidad codificante entre las levaduras, con un total del 79.2 % del genoma con 6906 genes. Además es la levadura con el genoma más redundante, con un aproximado del 49.2% de redundancia.

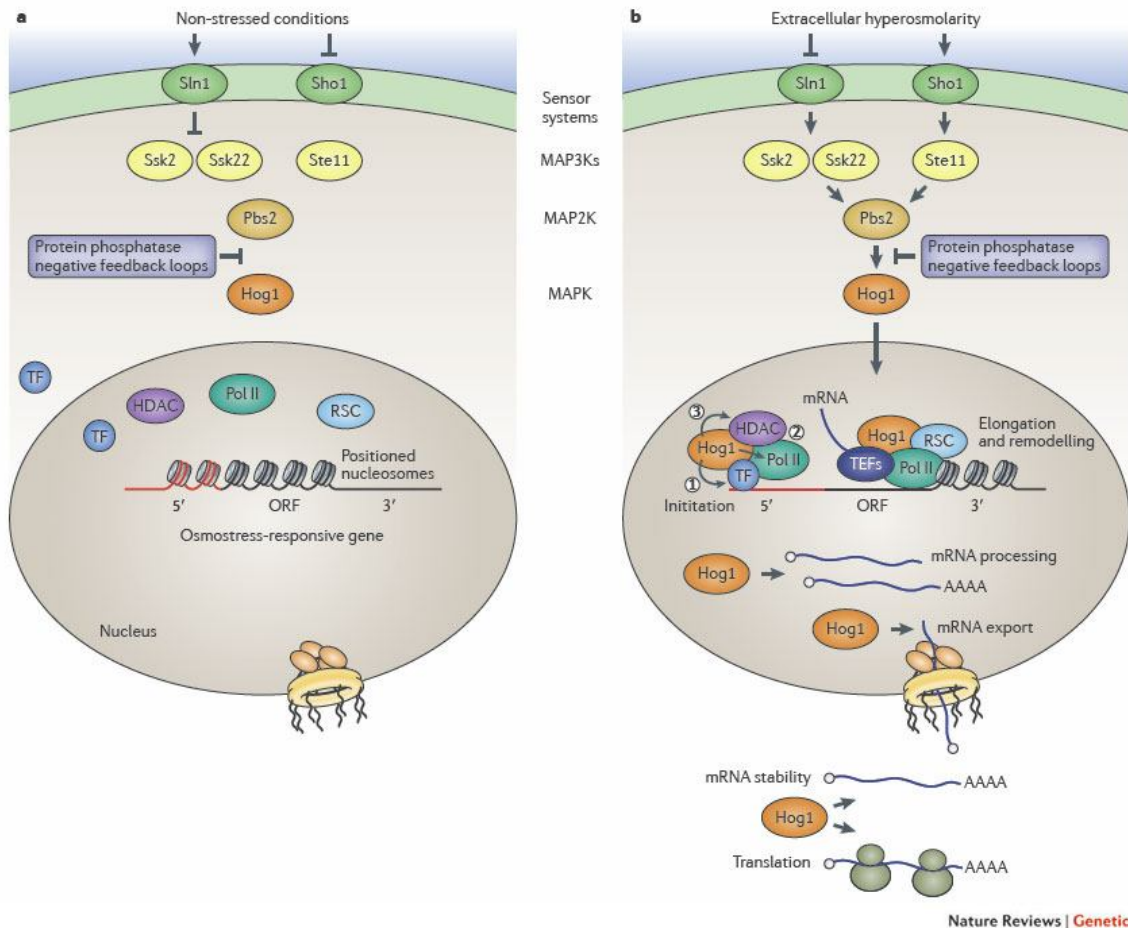
#### 1.4.2 Mecanismos de halotolerancia

La activación de los complejos mecanismos de osmorregulación depende de vías de transducción de señales. En *D. hansenii* se ha propuesto que la acumulación, transporte de iones y la síntesis de solutos compatibles, dependen de la vía HOG (Figura 3) (*High Osmolar Glycerol*). La vía HOG consiste en una cascada de MAP cinasas activadas por mitógenos (MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) que en este caso media la adaptación de las células al estrés hiperosmótico. La activación de esta vía ocasiona la fosforilación transitoria de la MAPK Hog1p. Hog1p fosforilada se transporta rápidamente al núcleo, lo que resulta en la transcripción de genes blanco. Esta vía parece ser ubicua en diferentes géneros de levaduras; en *D. hansenii* se le ha identificado también y se ha reportado que se activa por alta osmolaridad, estrés oxidativo y luz UV, pero no por estrés térmico, manteniendo a Hog1p fosforilada en el citoplasma durante el crecimiento en estas condiciones (Sharma *et al.*, 2005).

Varios grupos han demostrado que el sodio no es tóxico para *D. hansenii*; al cultivarla en altas concentraciones de NaCl ó KCl es capaz de acumular y resistir altas concentraciones de Na<sup>+</sup> (sodio incluyente) ó K<sup>+</sup>, a diferencia de *S. cerevisiae* (sodio excluyente) (Norkrans y Kylin, 1969; Thomé-Ortiz *et al.*, 1998; Prista *et al.*, 1997) y además puede hacer intercambios rápidos de Na<sup>+</sup> por K<sup>+</sup>. El grupo de Lucas estudió el efecto del Na<sup>+</sup> o el K<sup>+</sup> sobre algunos parámetros de crecimiento y la respiración y fermentación, sin encontrar diferencias significativas con ambos iones (Neves *et al.*, 1997). En el mismo año, se reportó que mientras *S. cerevisiae* es inhibida por Na<sup>+</sup> y por Li<sup>+</sup>, *D. hansenii* sólo es afectada por Li<sup>+</sup>; además que concentraciones relativamente altas de NaCl (0.5 M) mejoraron el crecimiento de *D. hansenii* (Prista *et al.*, 1997). Concentraciones más altas de NaCl o KCl (1.5-2.0 M) disminuyen el crecimiento, pero este efecto parece ser más bien debido a un efecto osmótico no específico.

Los niveles de ATP son más altos en células cultivadas en NaCl 1 M que en KCl 1 M (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998), lo que habla de la preferencia por la sal de sodio de esta levadura. Se ha visto que el Na<sup>+</sup> protege de factores de estrés adicionales; mientras que *S. cerevisiae* se comporta mejor a pH ácido o a alta temperatura, *D. hansenii* muestra un mejor comportamiento a pH elevado o temperaturas elevadas en presencia de sal (Almagro *et al.*, 2000).

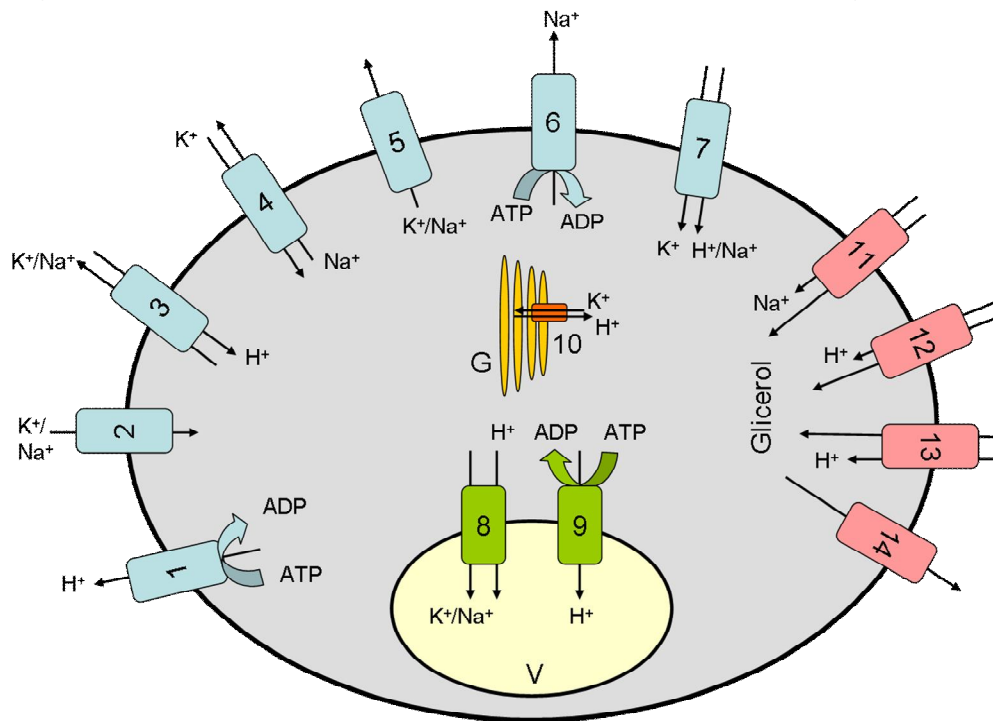




**Figura 3. Vías de cinasas de proteínas activadas por estrés [Stress-activated protein kinases (SAPK)].** La vía HOG es la vía SAPK de levadura. **a.** En condiciones de ausencia de estrés, la vía HOG no está activa y la proteína cinasa activada por mitógeno Hog1 (MAPK) está preferentemente en el citoplasma. No hay expresión de genes de respuesta a estrés. Hog1 permanece desfosforilada e inactiva por la falta de señal, por fosfatasas de proteínas y por las vías reguladoras de retroalimentación negativa. **b.** En respuesta a estrés osmótico, hay dos mecanismos independientes; las ramas Sln1 y Sho que permiten la activación de las MAP3Ks: Ssk2, Ssk22 y Ste11, que a su vez activan a la MAP2K Pbs2. Pbs2 combina ambas señales y activa a Hog1, que se acumula en el núcleo y se une a promotores osmodependientes a través de factores de transcripción específicos. Ahí, Hog1 puede modular la iniciación de la transcripción por fosforilación directa de factores de transcripción específicos de estrés osmótico (1, en la figura), reclutando a la ARN polimerasa (Pol) II y coactivadores de los promotores de osmorespuesta (2, en la figura) y reclutando remodeladores de la cromatina, como la desacetilasa de histonas Rpd3 (HDAC, 3; en la figura). Hog1 también se une a las regiones codificantes de genes de osmorespuesta, actuando como un factor de elongación de la transcripción (TEF) que es específico para estrés. Más aún, Hog1 desplaza nucleosomas por tener como blanco a factores remodeladores de la cromatina como el complejo RSC para esos genes. Hog1 también está involucrado en otros procesos relacionados con la expresión génica como el procesamiento de ARNm o la traducción, en respuesta a estrés. Tomado de: de Nadal *et al.*, 2011.

Una de las razones por las que *D. hansenii* es especialmente resistente a la sal reside en la actividad de sus enzimas. Se ha visto que algunas de ellas se comportan mejor en presencia que en ausencia de sal, por ejemplo la glicerol-fosfato deshidrogenasa purificada duplica su actividad por alto  $\text{Na}^+$  (André *et al.*, 1988); asimismo, la actividad de la glutamato deshidrogenasa  $\text{NADP}^+$ -dependiente se incrementa en cultivos con concentraciones elevadas de  $\text{NaCl}$  y es más sensible a la fuerza iónica que las isoenzimas correspondientes en *S. cerevisiae* (Alba-Lois *et al.*, 2004). Ciertamente, no todas las enzimas de interés se han estudiado.

Esta levadura, además, tiene interesantísimos sistemas de transporte e intercambio de iones (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998): a) una ATPasa funcional que contribuye al bombeo de protones (Pma1) (Fig. 4, No. 1), que genera una diferencia en el potencial de membrana y es aprovechado para transportar  $\text{K}^+$  (ó  $\text{Na}^+$ ) a través de un uniportador (Fig. 4, No. 2), que sería el equivalente a Trk1p de *S. cerevisiae* (Prista *et al.*, 2007); b) un sistema intercambiador de  $\text{K}^+$  ( $\text{Na}^+$ )/ $\text{H}^+$  (Nha1) (Fig. 4, No. 3); c) un posible intercambiador catión/catión (Fig. 4, No. 4).



**Figura 4. Sistemas de transporte de Glicerol,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en *D. hansenii*.** V: vacuola; G: compartimentos pre-vacuolares-aparato de Golgi. Modificada de González-Hernández *et al.*, 2006.

En cultivos con altas concentraciones de cationes monovalentes, se acumulan sales que pueden ser expulsadas al exterior en medios con bajo contenido de sal por la presencia de un canal iónico (Fig. 4, No. 5). Un intercambiador  $\text{K}^+$ / $\text{Na}^+$  no parece ser el mecanismo principal de salida, ya que se observa la extrusión de cationes aún en ausencia del catión opuesto. Además, este canal de cationes propuesto parece no ser específico, ya que promueve la salida de ambos cationes. Aunque no puede eliminarse la existencia de un intercambiador  $\text{H}^+$ /catión, la magnitud de los cambios parece favorecer la existencia de un canal iónico (González-Hernández *et al.*, 2004).

Almagro *et al.* (2000) clonaron y secuenciaron los genes *ENA1* y *ENA2*, que codifican para Na<sup>+</sup>-ATPasas tipo P en *D. hansenii*, que expulsan al Na<sup>+</sup> (Fig. 4, No. 6); su expresión aumenta en concentraciones elevadas de Na<sup>+</sup> y alto pH.

Más recientemente, Martínez *et al.* (2011) describieron que en bajas concentraciones de K<sup>+</sup>, el transportador preferentemente utilizado por *D. hansenii* es *HAK1* (High Affinity for K<sup>+</sup>) y que trabaja como un simportador con H<sup>+</sup>, mientras que en presencia de concentraciones milimolares de Na<sup>+</sup>, puede utilizar a este catión en el cotransporte; pero que en altas concentraciones de K<sup>+</sup>, es *TRK1* el que se expresa funcionando como uniportador (Fig. 4, No. 7).

En *S. cerevisiae* la compartimentalización interna prevacuolar del Na<sup>+</sup> está mediada por un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, codificado por el gen *NHX1* (Fig. 4, No. 8), el cual está energizado por el gradiente de pH desarrollado por una H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar de tipo V, (Fig. 4, No. 9) (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001); se ha propuesto que en *D. hansenii* ocurre el mismo fenómeno de acumulación por un sistema similar al descrito en *S. cerevisiae*, secuestrando el exceso de Na<sup>+</sup> en la vacuola y/o compartimientos prevacuolares, manteniendo una concentración citosólica de Na<sup>+</sup> no tan elevada (Montiel y Ramos, 2007).

En 2007, el grupo de Ramos clonó y expresó heterológicamente el gen *DhKHA1* en *S. cerevisiae*, reportando que tiene una función diferente a su ortólogo *ScKHA1* (descrito como un antiportador intracelular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), ya que su sobreexpresión en *S. cerevisiae* promueve la tolerancia a Na<sup>+</sup>, pero no afecta el crecimiento a alto pH o en presencia de higromicina B (García-Salcedo *et al.*, 2007). Lo clasifican como un transportador intracelular K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Fig. 4 No. 10).

Lucas *et al.* (1990) reportaron que la presencia de sal estimula la acumulación de glicerol a través de un posible simportador Na<sup>+</sup>-glicerol que también puede utilizar K<sup>+</sup> (Fig. 4, No. 11). En *S. cerevisiae* *GUP1* (Fig. 4, No. 12) es un transportador activo de glicerol cuando éste es la única fuente de carbono (Björn *et al.*, 2000). Un simportador de glicerol-H<sup>+</sup> (Fig. 4, No. 13) se expresa cuando las células se someten a un choque osmótico. Luyten *et al.* (1995); sugirieron que el gen *FPS1* en *S. cerevisiae* codifica para un canal que participa en el transporte del glicerol hacia el espacio extracelular, la cual puede controlar su producción y concentración interna (Fig. 4, No. 14) (González-Hernández *et al.*, 2006).

Otros genes importantes para la adecuada sobrevivencia de *D. hansenii* en condiciones de estrés salino son *HAL2* (de Halotolerancia) y *GZF3*.

En *S. cerevisiae* la delección de *ScHAL2* no afecta su capacidad para crecer en sal, pero su sobreexpresión incrementa significativamente su tolerancia a la sal. Hal2p es una nucleotidasa que hidroliza 3'-fosfoadenosina-5'fosfato (PAP) a AMP para reciclar a la adenosina y también está involucrada en la biosíntesis de metionina. En *S. cerevisiae* esta proteína es muy sensible a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> por lo que se considera la enzima blanco de la toxicidad de estos cationes. Se ha identificado y caracterizado en *D. hansenii* y su expresión en *S. cerevisiae* le confiere una halotolerancia aumentada tanto a Na<sup>+</sup> como a Li<sup>+</sup> (Aggarwal *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Mecanismos de tolerancia a estrés alcalino.

Los reportes que sobre este rubro existen en *D. hansenii* son limitados.

En 2002, Kurita y Yamazaki aislaron de salsa de soya una cepa de *D. hansenii* capaz de crecer en valores de pH tan altos como de 10. Esta cepa puede mantener los valores de pH intracelular cercanos a la neutralidad aún con un pH externo elevado. Observaron que en células preacondicionadas a pH 9, se activa la H<sup>+</sup>-ATPasa y se estimula la producción de ácidos orgánicos débiles, como acético y propiónico, que fungen como donadores de H<sup>+</sup> para la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa, regulando así su pH intracelular.

En *S. cerevisiae* y *Zygosaccharomyces mellis*, la tolerancia a la sal está relacionada con la tolerancia al pH alcalino, ya que el estrés hiperosmótico ocasionado por la sal causa una acidificación intracelular y con ello una pérdida de la homeostasis del pH interno (Vindelov y Anrneborg, 2002). En *D. hansenii* se ha observado que los efectos inducidos por el NaCl en el pH interno son primeramente causados por el estrés hiperosmótico y no por el estrés iónico. La regulación del pH interno es importante en cuanto a la habilidad de *D. hansenii* de tolerar el estrés salino por NaCl y esto es dependiente del tipo de cepa. Mientras más tolerante a la sal es una cepa, más eficiente es en mantener su homeostasis del pH interno durante un reto salino (Mortensen *et al.*, 2006).

Hay pocos reportes acerca de la transducción de señales que se observa después de la exposición a pH alcalino en *D. hansenii*; uno de los cuales involucra a la proteína GZF3. En *S. cerevisiae* GZF3 codifica para un factor de transcripción de dedos de zinc de tipo-GATA que juega un papel complejo en la Represión Catabólica por Nitrógeno (NCR). Una búsqueda de los genes de *D. hansenii* que sobreexpresados en *S. cerevisiae* le confieren resistencia a pH elevado dio como resultado a DhGZF3, indicando la importancia de este tipo de factores de transcripción en la tolerancia a pH alcalino (García-Salcedo *et al.*, 2006).

## 2. ANTECEDENTES

En el laboratorio hemos caracterizado fisiológicamente a *D. hansenii*, comparándola con *S. cerevisiae*, encontrando que tiene un metabolismo preferentemente respiratorio y puede fermentar, aunque mucho menos que *S. cerevisiae*, siendo el paso limitante la actividad de la fosfofructocinasa. La respiración y la fermentación, que son más bajas en *D. hansenii*, compiten por la oxidación de los nucleótidos de nicotinamida adenina; esta competencia parece jugar un papel importante en las tasas de fermentación de ambas levaduras. El efecto del CCCP en el consumo de glucosa y la producción de etanol indica también una función importante del ADP en el efecto Pasteur y Crabtree en *S. cerevisiae*, pero no en *D. hansenii*. Además, identificamos a una oxidasa alterna que en nuestros experimentos no parece estar acoplada a la producción de ATP (Sánchez *et al.*, 2006).

Al explorar los cambios fisiológicos que ocurren en *D. hansenii* expuesta a altas concentraciones de sal (0.6 M-1.0 M), observamos una adaptación de su metabolismo respiratorio, manifestado como un incremento en el ciclo del glioxilato, así como de su capacidad respiratoria. La sal estimula el bombeo de protones, que es parcialmente inhibido por CCCP; este desacoplamiento del

bombeo de protones puede contribuir al incremento de la velocidad respiratoria. El incremento en los niveles de ADP producido por el CCCP en células cultivadas con NaCl es similar al observado en células incubadas con o sin sal . En estos efectos, la oxidasa alterna no está involucrada. Reportamos que las sales tienen un efecto “acoplante” en el metabolismo respiratorio de esta levadura (Sánchez *et al.*, 2008).

En concordancia con nuestros datos, Cabrera-Orefice *et al.* en 2010 describieron que en mitocondrias aisladas de *D. hansenii*, los cationes monovalentes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> promueven el cierre del canal inespecífico de permeabilidad mitocondrial, hecho que sólo se ha observado en este organismo. Observaron que estos cationes incrementan el control respiratorio, el potencial transmembranal y la síntesis de ATP, optimizando así la fosforilación oxidativa y corroborando de este modo la eficiencia metabólica de *D. hansenii* en altas concentraciones de sales.

La fermentación también se favorece al cultivar la levadura en presencia de 1.0 M KCl ó NaCl, debido al aumento en las actividades de la alcohol deshidrogenasa y la fosfofructocinasa-1 (Calahorra *et al.*, 2009). La fermentación también se favorece en condiciones donde no hay crecimiento, sólo en incubación con sales.

Los incrementos de la capacidad respiratoria, así como en la fermentación, parecen ser responsables de aportar la energía adicional necesaria para contender con la entrada y/o salida del exceso de cationes en el medio.

El mar tiene un pH entre 7.6 y 8.2, dependiendo de la temperatura, salinidad y materia orgánica disuelta (Mc Neil, 1979), por lo que en este trabajo se estudiaron los cambios metabólicos en presencia de altas concentraciones de sal (NaCl 1.0 M) en medio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”) y manteniendo el pH a 6 (control) u 8 con un pHStat.

### 3. HIPÓTESIS

Al incubar *Debaryomyces hansenii* en medios con pH elevado y alta concentración de NaCl, suponemos que se darán cambios importantes en su metabolismo energético y fisiología en comparación con incubaciones en medios sin sal y pH 6.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Caracterizar metabólica y fisiológicamente a *D. hansenii* en presencia de 1M NaCl y pH 8.

#### 4.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto del pH elevado (pH 8), en presencia o ausencia de 1M NaCl en:
  - La viabilidad y crecimiento
  - La producción de biomasa
  - La acidificación del medio
  - El metabolismo respiratorio
  - El transporte de  $K^+$
  - El contenido de  $K^+$  y  $Na^+$  total en las células
  - La fermentación
  - La capacidad de acidificación máxima iniciando a los dos pHs
  - El pH interno
  - El transporte de aminoácidos marcados radiactivamente

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Medios de cultivo y cepa.

Se utilizó la cepa de *Debaryomyces hansenii* Y7426 donada amablemente por el US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, EUA. La cepa se conserva en YPGal (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% galactosa) + 2M NaCl, solidificado con 2% de agar.

De ese cultivo se siembra una asada de la levadura en 500 mL de medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) y se incuba bajo agitación constante (250 rpm) a 28-30°C por 42h (fase estacionaria temprana).

Se cosecha por centrifugación a aproximadamente 2500 rpm y se lava con agua destilada resuspendiendo el paquete celular al 50% (peso húmedo / volumen) con agua destilada.

### 5.2. Incubaciones a pH constante.

#### 5.2.1 Equipo.

Para mantener el pH constante en el medio de incubación, se utilizó un equipo llamado pHStat (TIM 856, Radiometer Analytical), que adiciona un volumen controlado de una base (NaOH) previamente titulada, para mantener el pH de la cámara de incubación. El pH se programó para ser mantenido a pH 6 o a pH 8. Se realizaron incubaciones a dos diferentes tiempos: 4 y 16 horas.

#### 5.2.2 Medio de incubación.

Las incubaciones se realizaron en YPD con y sin NaCl 1M, en un volumen final de 20 mL. Se agregaron 0.3 mL de levaduras (150 mg de peso húmedo) y se incubaron por 3 a 4 horas. Para los experimentos largos (16h), se agregaron 50 mg de ampicilina y 1 mL de la suspensión de levaduras (500 mg). Se hace lo mismo para pH 6 y para pH 8. Por lo tanto las variables en las incubaciones son: YPD pH 6 sin sal (abreviado en resultados, gráficas y discusión como pH6); YPD pH 6 + 1M NaCl (pH6Na), YPD pH 8 sin sal (pH8) y YPD pH 8 + 1 M NaCl (pH8Na).

Se monitoreó el pH del medio de incubación durante todo el tiempo y el volumen de NaOH agregado para mantenerlo constante, para calcular los mEq de NaOH gastados.

Se centrifugó todo el medio de la cámara de incubación y se conservó el paquete celular (previa anotación del peso húmedo obtenido) para resuspenderlo al 50% (peso húmedo/ volumen) en agua y realizar todos los experimentos.

### 5.3 Crecimiento y viabilidad.

Para este objetivo se realizaron varias metodologías:

### **5.3.1 Diferencia de densidad óptica.**

Después de las incubaciones, se determinó la absorbencia a 600 nm como una medida indirecta del crecimiento celular durante el tiempo de incubación, se utilizó medio YPD como blanco.

### **5.3.2 Peso húmedo.**

Se registró el peso húmedo añadido a las cámaras de incubación y el obtenido después de la incubación para obtener una relación peso final / peso inicial.

### **5.3.3 Unidades Formadoras de Colonias (CFU's).**

Se contó el número de células / mL en la suspensión de una dilución 1:10,000 en la cámara de Neubauer y se plaquearon 100 células de cada condición de incubación en cajas de YPD.

### **5.3.4 Tinción con FUN-1.**

Las células cosechadas después de la incubación por 16 horas en YPD pH6, pH 6 + 1 M NaCl, pH 8 o pH 8 + 1 M NaCl, fueron resuspendidas al 50% (peso: volumen) y utilizadas para teñirlas con el colorante comercial FUN-1 (Molecular Probes, No. de catálogo: F-7030). Se utilizaron como control células cultivadas en YPD por 42 horas.

La tinción se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

En un tubo Eppendorf:

172  $\mu$ L Buffer GH (glucosa 20%, HEPES 10 mM, pH 7.2)

12.5  $\mu$ L FUN-1 200  $\mu$ M

5  $\mu$ L Calcoflúor 0.5 mM (en caso de querer visualizar la pared celular)

10  $\mu$ L de células al 50%

Se incubaron por 30 min a 30 °C en oscuridad. Se centrifugaron 30 segundos en una microfuga a 14000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 20  $\mu$ L de agua.

#### **5.3.4.1 Observación al microscopio.**

Se colocaron 10  $\mu$ L de la suspensión obtenida en el punto anterior entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Se observaron al microscopio a 40 X o con inmersión a 100 X; con lámpara de epifluorescencia utilizando los filtros B-2A ó B-3A (Nikon). En caso de no contar con estos filtros, se requieren aquéllos que permitan una longitud de onda de excitación de 480 nm y una de emisión de 530nm (Millard, *et al.*, 1997).

#### **5.3.4.2 Citometría de flujo.**

Las células teñidas con FUN-1 también se analizaron con la técnica de citometría de flujo; para ello, después de la tinción se lavaron una vez con 500  $\mu$ L de agua y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de líquido de enfoque (*Life Technologies*). Para el



ensayo, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se resuspendieron en 3 mL de líquido de enfoque. Se utilizó un citómetro de flujo de enfoque acústico *Attune* de *Life Technologies*, se tomaron en cuenta 50,000 eventos para cada medición y se observaron los datos con el filtro BL1-A (530 nm/ 30nm).

Se realizó una curva de células vivas/muertas (por ebullición), tiñéndolas bajo las mismas condiciones, para utilizarla como curva patrón.

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces y se muestran resultados representativos.

### **5.3.5 Curvas de crecimiento.**

Después de las incubaciones en el pHStat o con células provenientes de un cultivo en YPD, se realizaron diluciones apropiadas para inocular las células a una absorbancia final de 0.03 (a 600 nm) en los diferentes medios de cultivo (YPD, pH 6, pH 6Na, pH 8 y pH 8Na). Se inocularon placas de 100 pozos con 250  $\mu\text{L}$  cada uno y se utilizó un equipo lector automatizado Bioscreen. Las lecturas se hicieron cada 15 minutos, a 30°C, utilizando el filtro de 600 nm, con agitación constante hasta por 4 días.

### **5.4 Determinación del $\text{K}^+$ y $\text{Na}^+$ total en las levaduras.**

Para medir el contenido interno de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ , se colocaron en un baño en ebullición 100  $\mu\text{L}$  de células al 50% en 3.9 mL de agua durante 20 min, se enfriaron en hielo por 15 minutos y se centrifugaron a 2500 rpm. Se utilizó el sobrenadante para determinar la concentración de cationes en un flamómetro, utilizando un estándar de KCl 1mM o de NaCl 1mM.

### **5.5 Determinación de consumo de oxígeno.**

Se realizó mediante un electrodo tipo Clark con un monitor de oxígeno conectado a un sistema digitalizador por medio de un voltímetro y una computadora, y la medida del consumo de oxígeno se hizo en una cámara cerrada conteniendo:

10 mM MES – TEA pH6  
20 mM Glucosa  
25 mg de células  
Volumen total: 5 mL

Los trazos se realizaron en presencia o ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de CCCP.

### **5.6 Transporte de $\text{K}^+$ y acidificación del medio.**

Se utilizaron electrodos selectivos para  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ , conectados a potenciómetros individuales que por medio de un sistema digitalizador están conectados a una computadora. Se realizaron los experimentos con las células provenientes de las incubaciones a pH constante con o sin NaCl en el siguiente medio:

2 mM MES – TEA pH6  
20 mM Glucosa  
50 mg de células  
Volumen total: 10 mL

### 5.7 pH Interno.

El pH interno se midió por los cambios de fluorescencia de la piranina introducida a las células por electroporación, descrito por Calahorra *et al.* (1998).

Brevemente, se electroporaron 350  $\mu$ L de levaduras al 50% con 10  $\mu$ L de piranina 100 mM en una celda previamente colocada en hielo a 1.5 V. Se utilizó un electroporador Bio-Rad Gen-Pulse II. Después de electroporar, se dejaron reposar las células en hielo por 10 min. y se lavaron en un tubo Eppendorf tres veces con agua resuspendiéndolas al final nuevamente al 50% (peso: volumen).

Se utilizó un fluorómetro (SLM-Olis) con portacelda con agitación constante y temperatura controlada a 30°C.

En la celda:

	MES 0.1M TEA pH6	_____	0.2 mL (10mM final)
	Glucosa 1M	_____	50 $\mu$ L (25 mM final)
	H <sub>2</sub> O	_____	1.7 mL
a los 10 seg.	Células al 50%	_____	50 $\mu$ L (25 mg finales)
a los 350 seg.	KCl 2M	_____	10 $\mu$ L (10 mM final)

Se siguió la fluorescencia a 460 nm de excitación y 520 nm de emisión.

### 5.8 Producción de etanol (Fermentación).

Se mide el contenido de etanol por un método enzimático con aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa (Calahorra *et al.*, 2009) en una alícuota de 10  $\mu$ L de los sobrenadantes obtenidos por la centrifugación de las células en los diferentes incubados en YPD, pH 6, pH6 Na, pH 8 y pH 8Na. Además, las células obtenidas de las diferentes incubaciones (20 mg, peso húmedo) se pusieron a fermentar en 10 mM MES (TEA, pH6) ó 10 mM Bicina (TEA, pH 8) con 40 mM de glucosa y en presencia o ausencia de 1 M de NaCl. Se incubaron a 30°C por 15 minutos y se midió el contenido de etanol en 30  $\mu$ L del sobrenadante.

### 5.9 Transporte de <sup>3</sup>H-Leucina.

Se utilizaron células control, provenientes de un cultivo en YPD de 42 horas, resuspendidas al 50% en agua (peso: volumen). Se incubaron en el pH Stat en las diferentes condiciones: pH 6, pH 6Na, pH 8 y pH 8Na, adicionados de 20 mM de glucosa en un volumen final de 10 mL. El transporte de leucina se midió según el siguiente protocolo, por triplicado:

Tiempo:	
0 min	Añadir 1 mL de levadura al 50%
40 min	Añadir 200 $\mu$ L de leucina 10 mM más 50 $\mu$ L de $^3$ H-leucina
50 min	Tomar 400 $\mu$ L y filtrarlos a través de filtros de 0.45 $\mu$ m de poro
60 min	Tomar 400 $\mu$ L y agregarlos a 400 $\mu$ L de ácido tricloroacético al 10% en hielo; filtrar.
Al finalizar,	Tomar 50 $\mu$ L y colocarlos en un vial de centelleo (totales)

Los filtros se colocan en viales de vidrio y se dejan secar; se agrega líquido de centelleo y se cuentan en un contador de centelleo (Perkin Elmer, Tri-Carb 2910 TR).

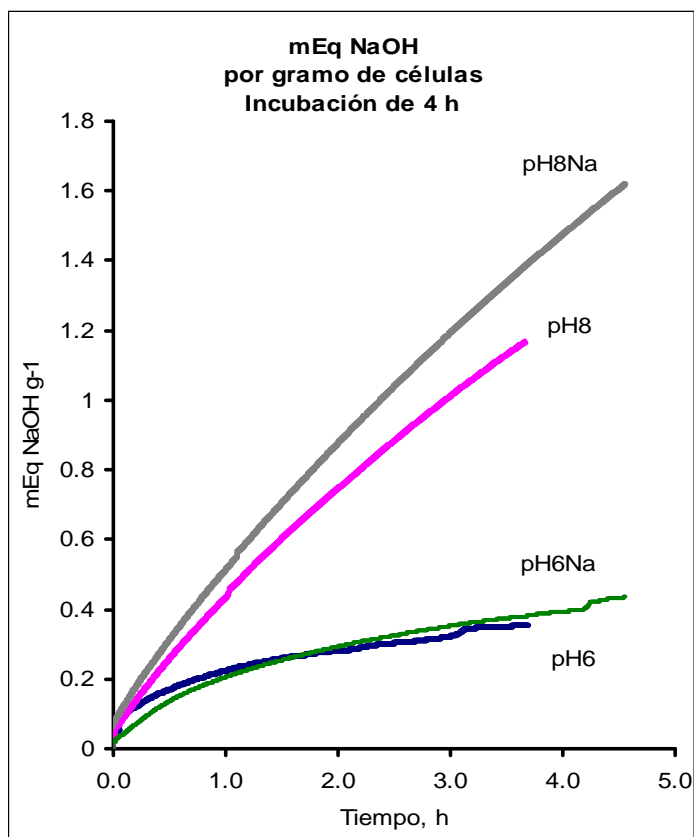
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Acidificación del medio

Las levaduras crecen acidificando el medio como resultado de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática (Peña, 1972). Una manera indirecta de medir la actividad de esta enzima membranar en las diferentes condiciones de incubación es registrando la cantidad de NaOH que se requiere para mantener el pH del medio que se desea en el pHStat.

#### 6.1.1 Incubación de 4 h

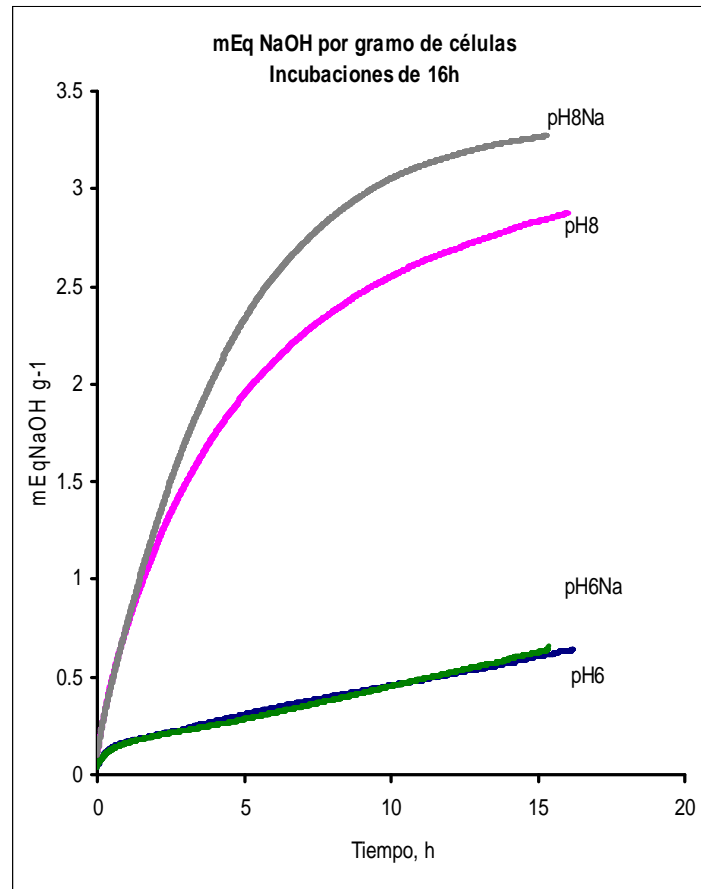
Al incubar la suspensión de levaduras en un medio rico como el YPD durante 4 horas, el gasto de NaOH necesario para mantener el pH fue menor para pH de 6, y no se apreció una diferencia significativa entre la incubación con NaCl 1 M y en ausencia de la sal. Como era de esperarse, se requirió mayor cantidad de NaOH para mantener el pH 8, y sí se observó una ligera diferencia entre el incubado en presencia de sal y en ausencia de la misma, lo que indica una mayor acidificación del medio por las levaduras en presencia de sal (Figura 5).



**Figura 5. Acidificación del medio.** mEq de NaOH requeridos para mantener un pH constante de 6 u 8 en incubaciones de 4 h. Se utilizó un pHStat como se describe en Metodología. Los datos se normalizaron por gramo de peso húmedo de levaduras. Se muestra un experimento representativo de 4 diferentes repeticiones.

### 6.1.2 Incubaciones de 16 h

A tiempos largos, de 16 horas, no hubo diferencia importante en la capacidad de acidificación entre las incubaciones a pH 6 con NaCl y sin sal. Como en el experimento anterior, se requirió más NaOH para mantener el pH de 8 en las incubadas en presencia de NaCl (Figura 6).



**Figura 6. Acidificación del medio.** mEq de NaOH requerido para mantener un pH constante de 6 u 8 en incubaciones de 16 h. Se utilizó un pHStat. Los datos se normalizaron por gramo de peso húmedo de levaduras. Se muestra el promedio de 9 repeticiones.

## 6.2. Experimentos para medir el crecimiento de las levaduras

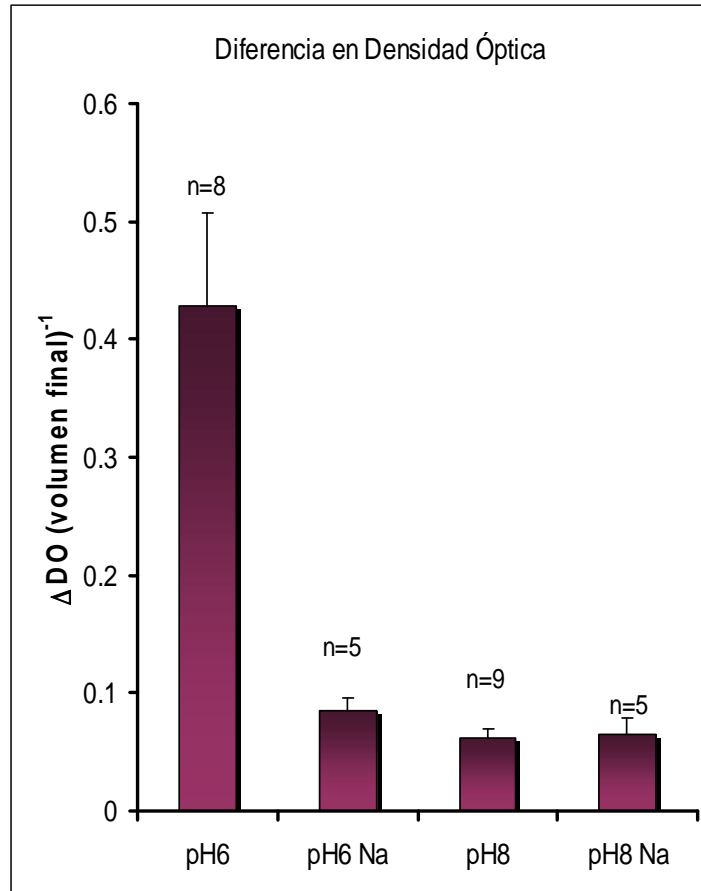
Es importante conocer cómo afectan las condiciones del medio al crecimiento y viabilidad de las levaduras.

Se decidió realizar este tipo de estudios únicamente en las incubaciones de 16 horas, debido a que en 4 horas *D. hansenii* no es capaz de duplicarse. Esta levadura tiene un período de retardo largo, como se verá más adelante en las curvas de crecimiento.

### 6.2.1 Diferencia de densidad óptica

Se midió la densidad óptica a 600 nm al final de la incubación de 16 horas, como un indicador de la reproducción de las células (por aumento de la turbidez).

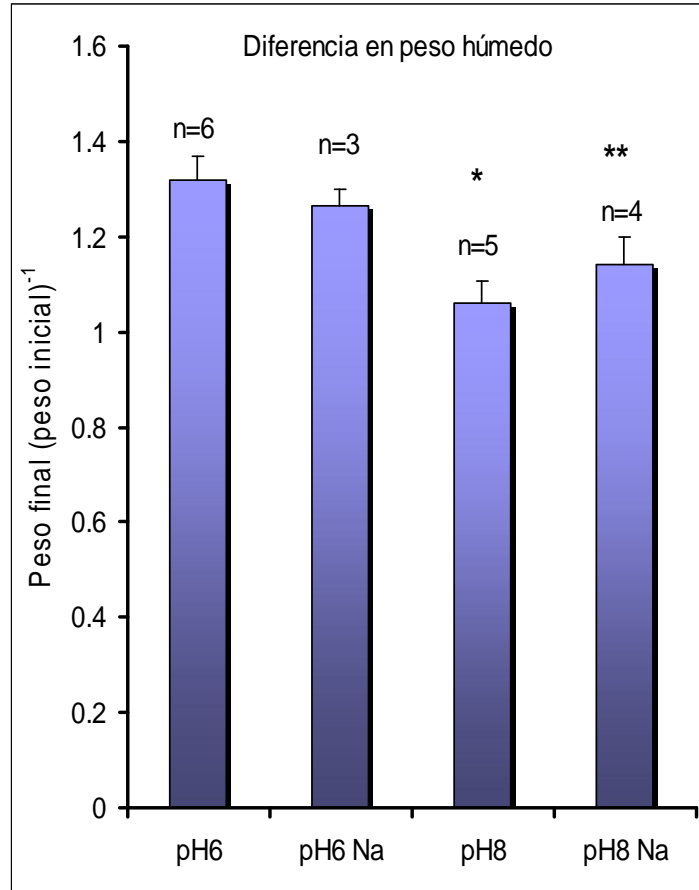
Se corrigió por el volumen alcanzado al final de la incubación, ya que el pHStat adiciona NaOH para mantener el pH deseado y en cada caso es diferente. Después de 16 horas de incubación y de haber agregado 0.5 g de células al medio, con los datos de absorbencia se observó que el crecimiento se inhibió al agregar 1 M de NaCl al medio YPD en pH 6 y al cultivar a las células a pH 8, independientemente de la presencia de NaCl (Figura 7).



**Figura 7. Crecimiento de las levaduras en incubaciones a 16 horas.** Medido como diferencia de densidad óptica/mL finales de medio de incubación. Promedios ± D.S de n repeticiones.

### 6.2.2 Diferencia en peso húmedo

Se registró el peso húmedo de las células obtenido al final de cada incubación de 16 horas y se obtuvo la diferencia relacionándolo con el peso húmedo de las células añadido al iniciar la incubación. Los datos de peso húmedo también muestran que se afecta el crecimiento a pH de 8 en ausencia o presencia de sal (Figura 8).



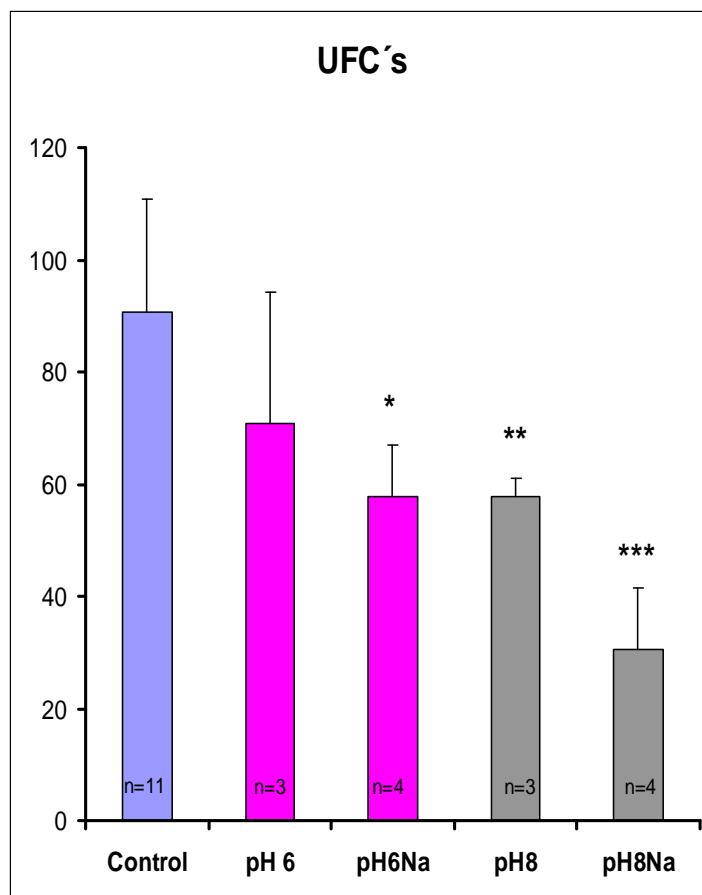
**Figura 8. Crecimiento de las levaduras en incubaciones a 16 horas.** Medido como el cociente del peso húmedo obtenido al final de la incubación entre el peso inicial añadido a la cámara de incubación. Promedios  $\pm$  D.S de n repeticiones. \* PRUEBA T,  $p < 0.00001$  vs. pH6, \*\* $p < 0.02$  vs. pH6Na.

## 6.3 Experimentos de Supervivencia

Se realizaron otros experimentos para verificar si las células mueren por el tratamiento de incubación por 16 horas a pH 6 ó 8 con o sin NaCl.

### 6.3.1 Unidades Formadoras de colonias (UFC's)

Para este tipo de experimento, se manejaron las células en el pHStat en las condiciones más estériles posibles, así como para su cosecha y resiembra. En la figura 9 se observa que la incubación a pH6 + 1M NaCl, pH8 y pH8 + 1M NaCl provocó un descenso en el número de UFC's que es estadísticamente significativo comparando con las células controles recién cosechadas de un medio YPD.



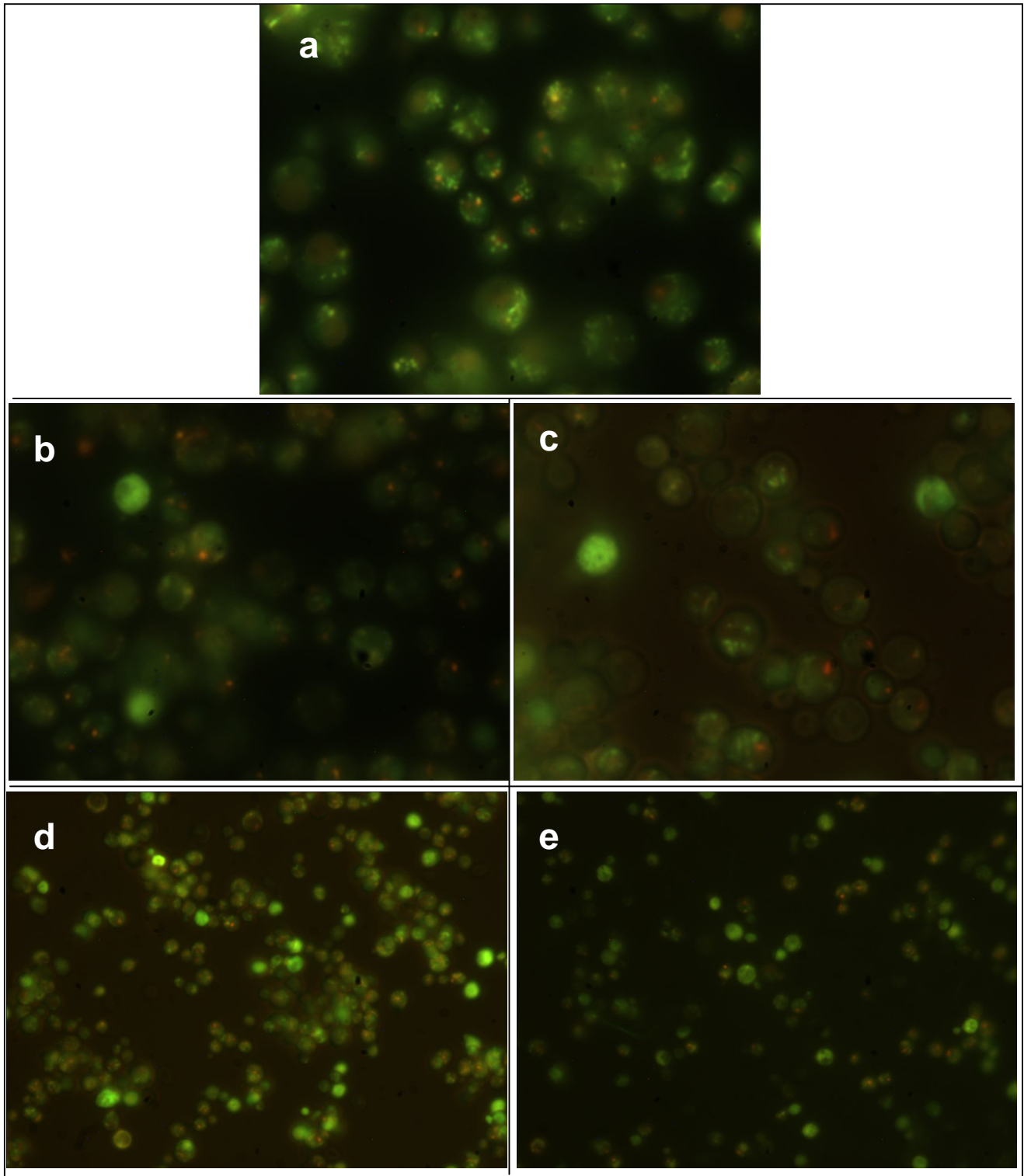
**Figura 9. Unidades Formadoras de Colonias** de células recién cosechadas (Control) y células sometidas a incubaciones de 16 horas en el pHStat bajo los diferentes tratamientos señalados. Se muestran promedios  $\pm$  desviación estándar de n repeticiones. \*  $p < 0.0006$ ; \*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*  $p < 0.00002$  comparando con las células control.



### **6.3.2 Tinción con FUN-1 (Observación al microscopio)**

También se utilizó el colorante FUN-1® de Molecular Probes para comprobar la viabilidad de las células. En las células metabólicamente activas, FUN-1 cambia de una tinción difusa intracelular de color verde a estructuras intravacuolares naranja-rojizas o amarillo-naranjas. Se requiere para ello la integridad de la membrana plasmática y capacidad metabólica. Las células muertas se observan con una fluorescencia verde intensa brillante. Los resultados se muestran en la Figura 10 en la siguiente página.

Con esta metodología, se pudieron observar en todos los casos tres poblaciones de células: las que presentan fluorescencia verde intracitoplásmica intensa correspondiente a células muertas; células con fluorescencia verde difusa que son consideradas como células vivas y otras con estructuras intravacuolares naranja-rojizas que son las metabólicamente activas. En el microscopio no se observó una diferencia importante entre las células control y las sometidas a los diferentes tratamientos de incubación de 16 horas.



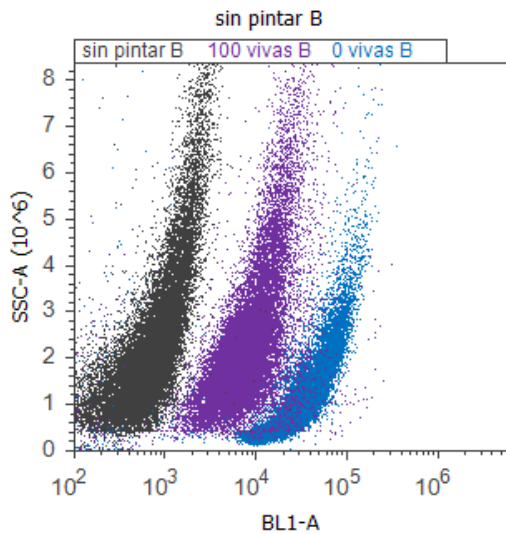
**Figura 10.** Tinción con FUN-1. Las células metabólicamente activas exhiben cuerpos intravacuolares de color naranja-rojizo. Las células muertas se observan con una fluorescencia verde intensa. a: Células control; b-e: Incubaciones a 16 horas en el pHStat. b: pH6; c: pH6 + 1M NaCl; d: pH8; e: pH8 + 1M NaCl. Fotos representativas de al menos 3 experimentos.

### 6.3.3 Tinción con FUN-1 (Citometría de flujo)

Se realizaron experimentos de citometría de flujo con el objetivo de poder visualizar mejor los efectos de las diferentes incubaciones en las células teñidas con FUN-1 y eventualmente poder cuantificar el porcentaje de células vivas en cada condición.

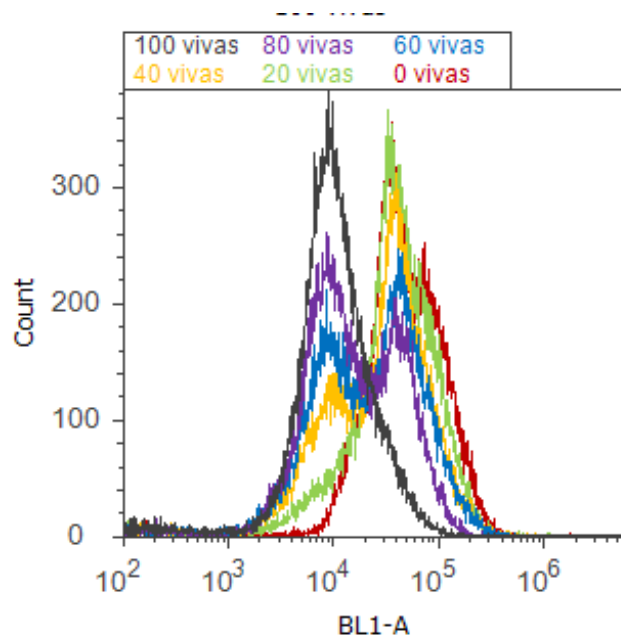
Fue necesario modificar las condiciones del método propuesto por Molecular Probes, observando las células al microscopio e inclusive realizando varias pruebas en el fluorómetro hasta llegar al ensayo descrito en el capítulo de Metodología.

En la figura 11 se muestra la gráfica de puntos (Dot plot) conteniendo la imagen de células sin teñir (negro), células 100% vivas (morado) y células 100% muertas por ebullición (azul).



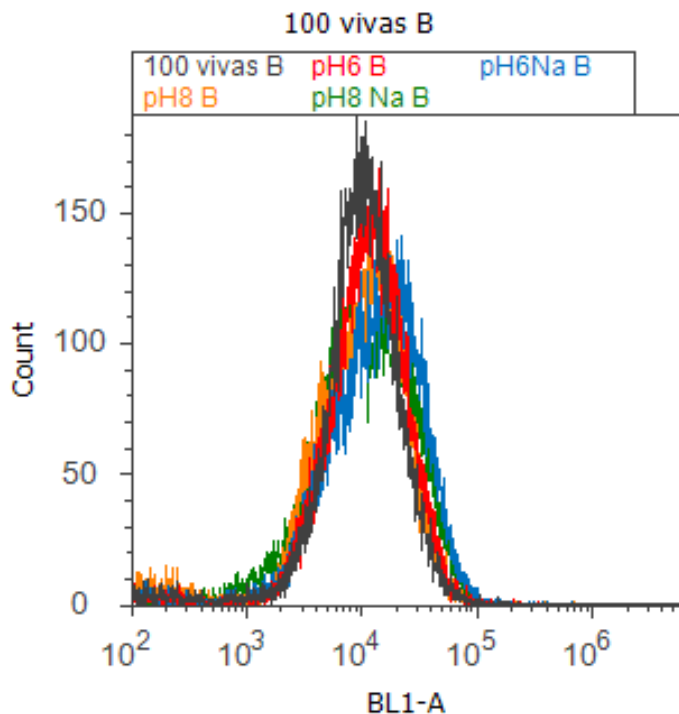
**Figura 11. Fluorescencia vs. granularidad** en muestras de levaduras sin teñir (negro), 100% de levaduras vivas (morado) y 100% de levaduras muertas (azul). Filtro BL1-A.

Al comprobar que se podían obtener diferencias en el citómetro de flujo en estas condiciones, se realizó una curva patrón variando el contenido de células vivas y muertas para poder obtener lo mostrado en la figura 12.



**Figura 12. Histograma de fluorescencia de la curva patrón de levaduras vivas y muertas.** En la parte superior de la gráfica se define el código de colores.

Al analizar las muestras provenientes de las diferentes incubaciones por 16 horas (figura 13), se observa, en una gráfica representativa, que las incubadas a pH 6 presentan la mayor viabilidad, después las de pH 8, luego las de pH6 Na y al final con la menor viabilidad las de pH 8Na. Seguimos con experimentos en curso para terminar de definir cuantitativamente estas tendencias.

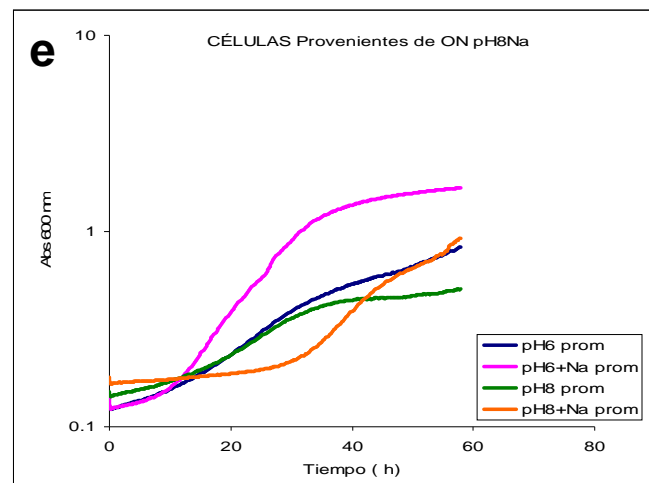
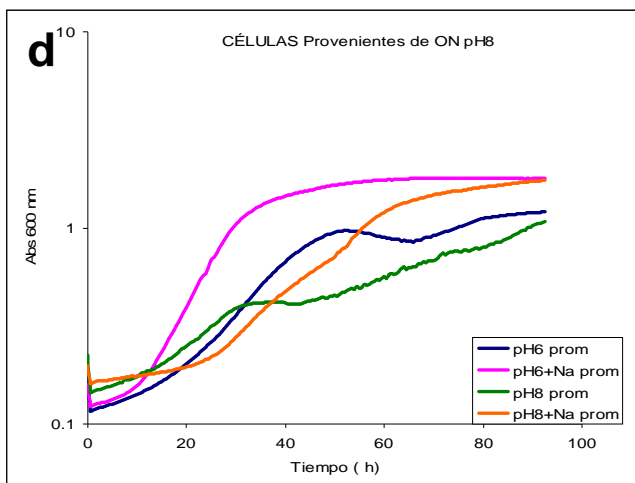
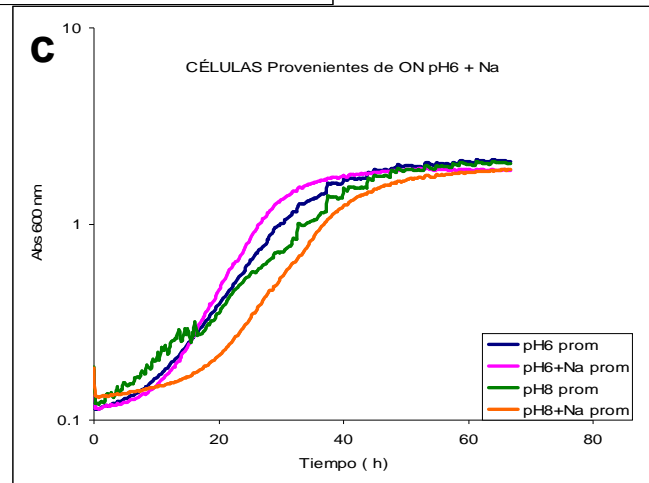
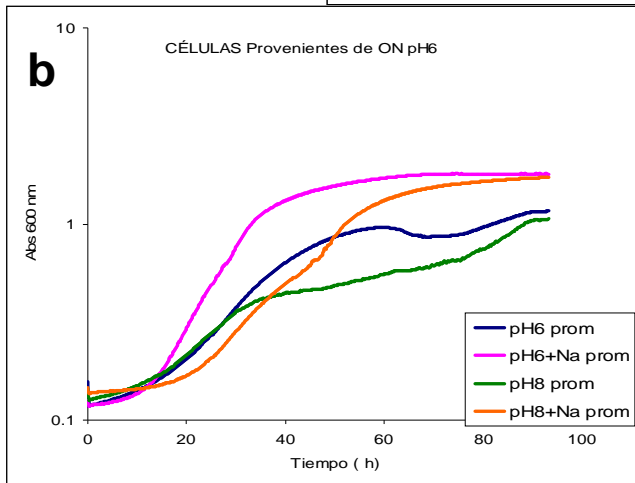
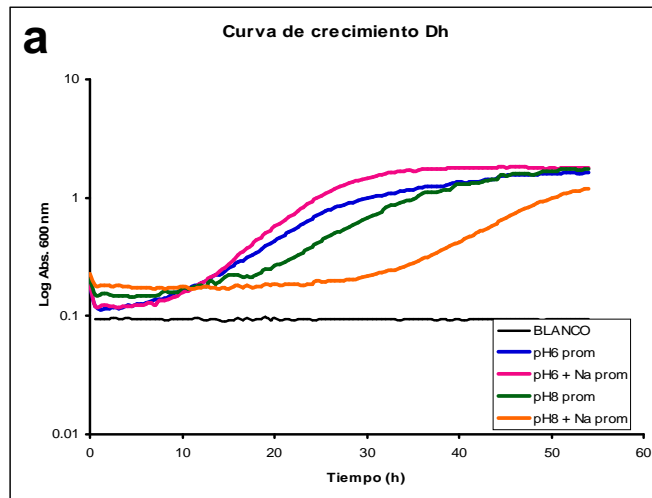


**Figura 13. Histograma de fluorescencia de las células obtenidas después de las diferentes incubaciones.** En la parte superior de la gráfica está el código de colores que corresponde a cada variable experimental. La letra “B” indica un duplicado experimental que se hizo ese día. Se realizaron 3 experimentos diferentes con duplicados y se muestra una gráfica representativa.

#### 6.3.4 Curvas de Crecimiento.

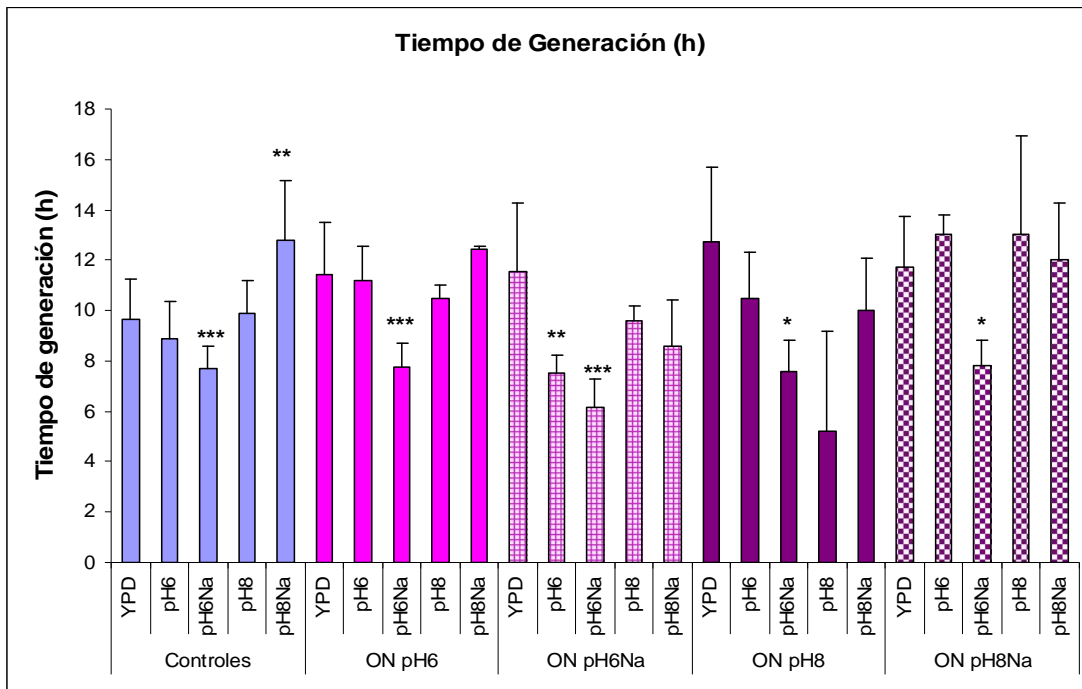
Otra metodología utilizada para comprobar la viabilidad de las células sometidas a incubaciones de 16 horas en el pHStat fue la realización de Curvas de crecimiento. Como controles se utilizaron células recién cosechadas de medio YPD y se probaron las células salidas de las diferentes incubaciones a 16 horas. Se realizaron las curvas de crecimiento en medio YPD, YPD pH 6, YPD pH 6 + 1M NaCl; YPD pH 8 y YPD pH 8 + 1M NaCl. Para mantener el pH6 se utilizó MES 50 mM ajustado con TEA y para el pH 8 bicina 50 mM ajustada con TEA.

En la Figura 14 se observan curvas representativas de cada condición.



**Figura 14. Curvas de Crecimiento.** Las curvas se realizaron en un equipo automatizado lector de placas de 100 pozos Bioscreen. a: Células control; b-e: células provenientes de incubaciones a 16 horas en el pHStat. b: pH 6; c: pH 6 + 1 M NaCl; d: pH 8; e: pH 8 + 1 M NaCl. Los medios utilizados se señalan en cada gráfica. Promedios de 3 a 11 repeticiones de 8 pozos cada una.

A partir de las curvas de crecimiento, se calcularon los tiempos de generación (Figura 15) y el inicio de la fase logarítmica para cada condición (Figura 16).



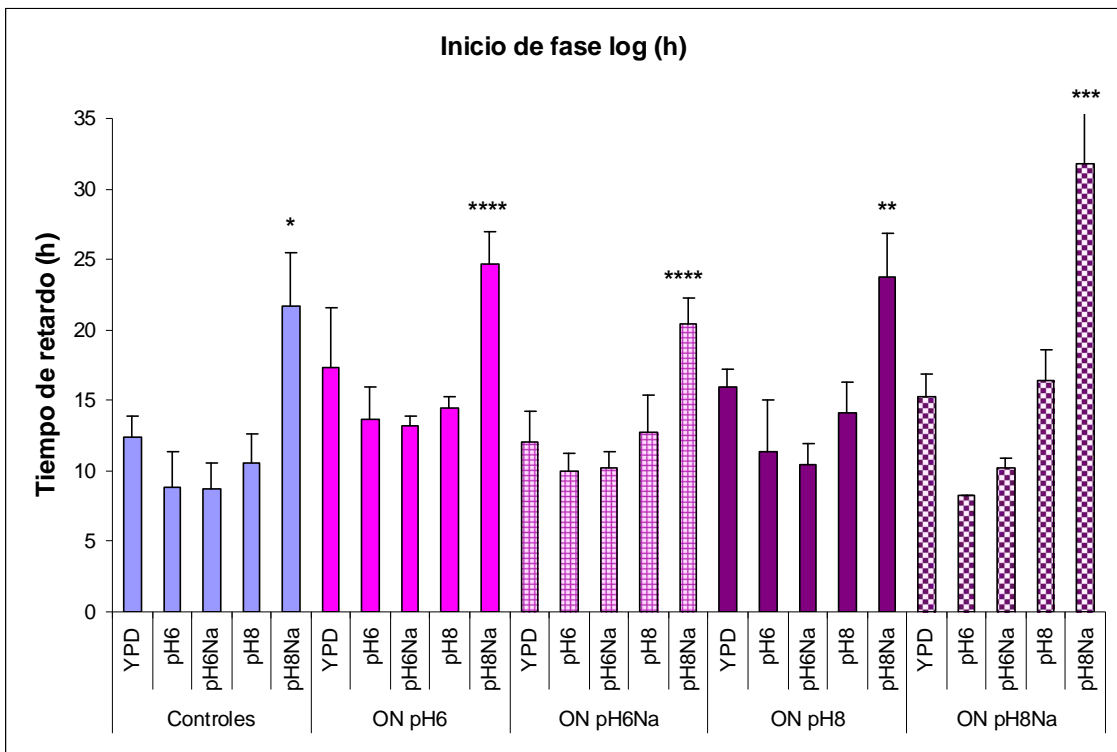
**Figura 15. Tiempos de generación** de células Control y células después de incubación de 16h en el pHStat bajo los diferentes tratamientos. Promedios  $\pm$  desviación estándar.

\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.02$ ; \*\*\*  $p < 0.05$  comparadas vs. su control en YPD. (ON=Overnight). n de 3 a 11.

En este experimento se puede observar que los tiempos de generación de las células incubadas por 16 horas en el pHStat no son muy diferentes de los de las células controles, por lo que se puede concluir que no se ven muy afectadas por el tratamiento, es decir, no mueren.

Además, se puede observar que al agregar 1 M de NaCl al medio de pH 6 se optimiza el crecimiento de las células tanto en las células controles (recién cosechadas de YPD) como las provenientes de las incubaciones a 16 horas en sus distintos tratamientos.

Para las células control, el cultivarlas en pH 8 con 1 M de NaCl, incrementa su tiempo de generación, es decir, afecta su crecimiento.



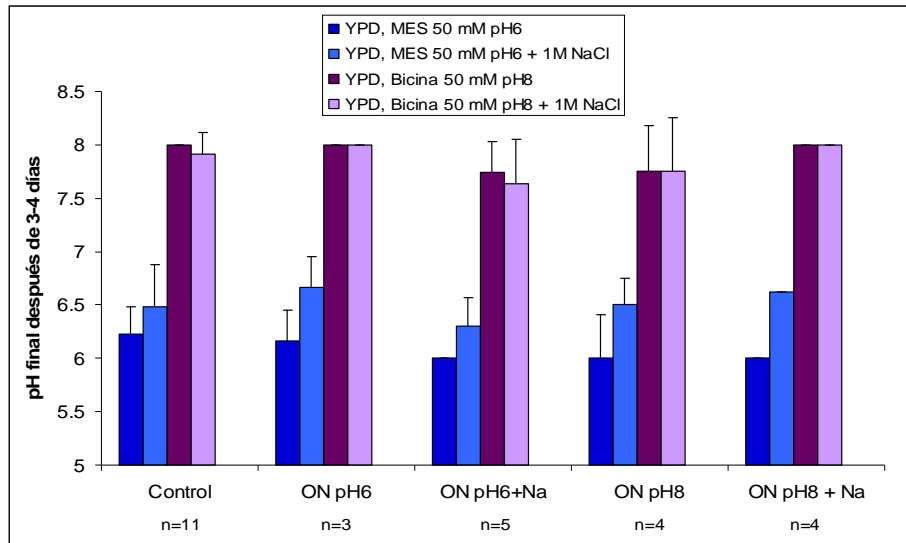
**Figura 16. Tiempo de Inicio de Fase logarítmica.** Se calculó a partir de las Curvas de crecimiento realizadas para las células control y para las sometidas a 16h en los distintos medios de cultivo indicados en la figura.

\*  $p < 0.0005$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.02$ ; \*\*\*\*  $p < 0.05$  comparados con sus controles en YPD. (ON=Overnight). n de 3 a 11.

El tiempo de inicio de la fase logarítmica se afectó sólo a pH 8 con 1 M de NaCl en todos los casos, en comparación con las células cultivadas en YPD. Es de destacar la capacidad de las células de adaptarse a los diferentes medios y condiciones sin afectar su crecimiento.

Debido a que para estos experimentos se utilizaron amortiguadores en los medios de cultivo, se midió el pH final de los distintos medios de cultivo al final de las curvas de crecimiento (3 o 4 días después) en experimentos simultáneos realizados en tubos de ensayo Falcon.

Los resultados mostrados en la figura 17 indican que estos medios amortiguados con MES o con Bicina 50 mM son adecuados para mantener el pH que se desea aún a tiempos muy largos de cultivo.



**Figura 17. pH final de los medios de cultivo amortiguados con MES 50 mM (pH6) o Bicina 50 mM (pH8).** Se realizaron simultáneamente con los inóculos utilizados para las curvas de crecimiento pero se incubaron en tubos Falcon en un tambor rotatorio a 30°C durante 3 a 4 días. (ON=Overnight).

## 6.4 Medida de las funciones celulares

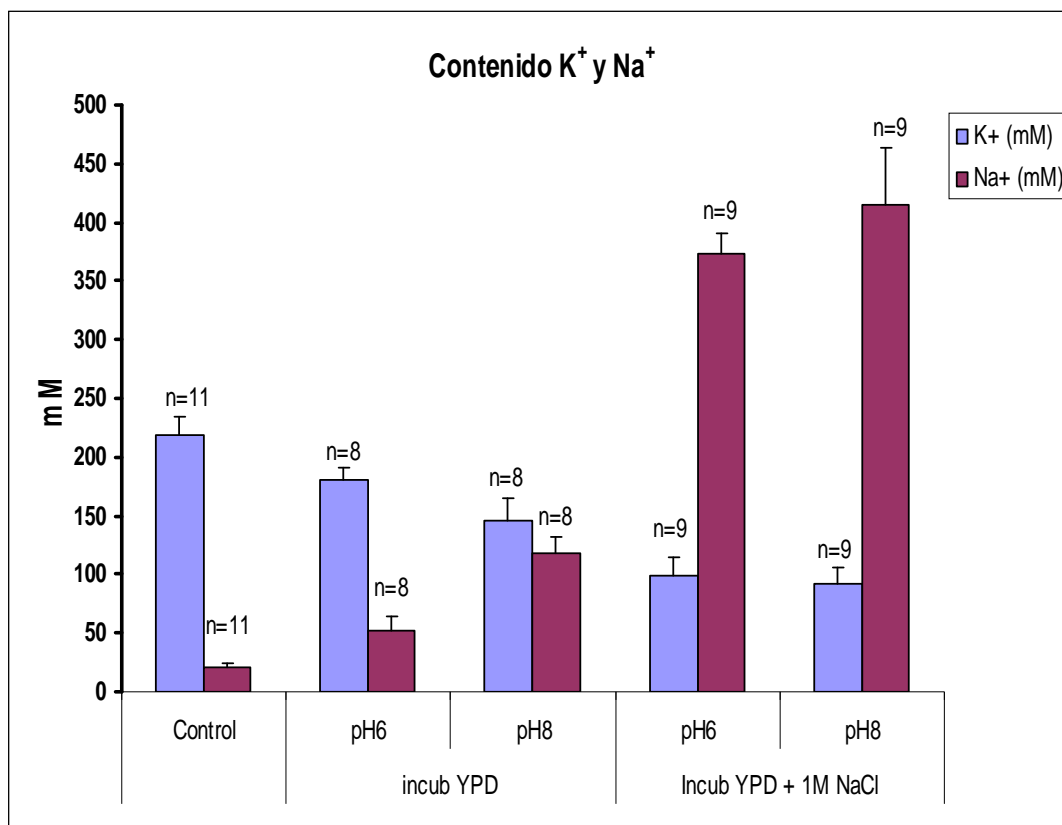
Al incubar las células en las distintas condiciones con y sin sal y en pH 6 ú 8, requieren adaptar su metabolismo a las nuevas circunstancias del medio. Para conocer el resultado de este cambio, se midieron varias funciones celulares,

### 6.4.1 Contenido de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> en células incubadas 4 h

En vista de que las células fueron sometidas a medios con o sin NaCl 1M y que además para lograr mantener el pH de 6 ú 8 se requirió agregar NaOH por medio del pHStat, era de esperarse que el contenido interno de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> cambiara.

En las células incubadas en YPD a pH 6 u 8 disminuyó ligeramente su contenido de potasio interno, comparadas con los controles sin incubar, tal como salen del cultivo, mientras que las incubadas con 1 M de NaCl aumentan su contenido de sodio, más evidentemente las de pH 8. Como era de esperarse, las incubadas en YPD + 1 M NaCl, llegan a acumular en su interior más de 350 mM de Na<sup>+</sup> para las de pH 6 y 400 mM para las de pH 8 (Figura 18).



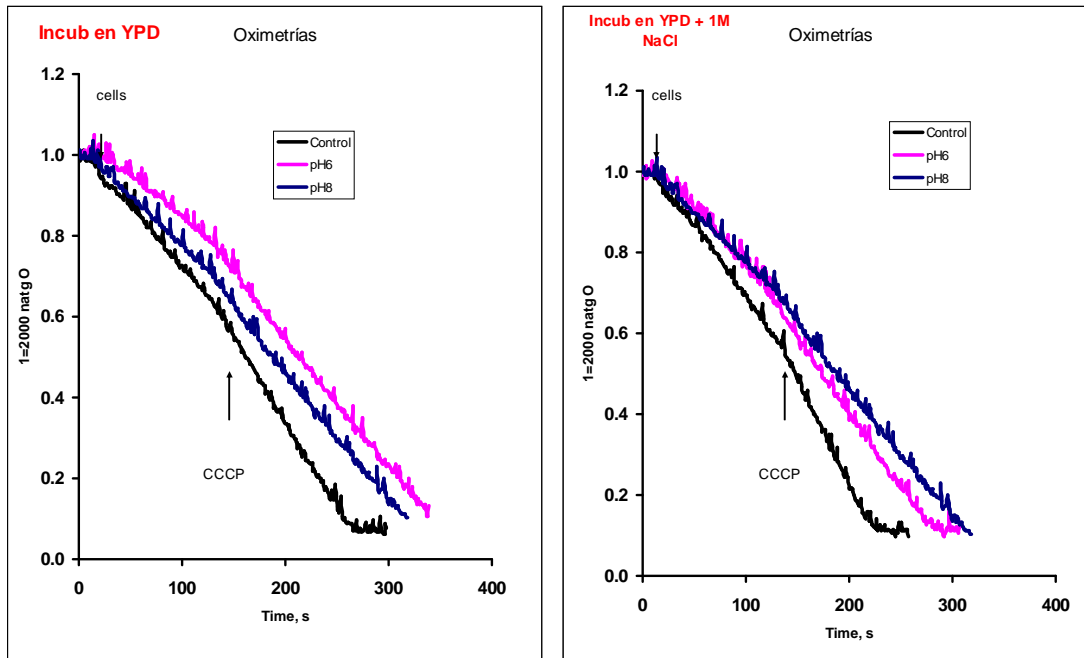


**Figura 18. Contenido interno de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en células sujetas a incubaciones durante 4 h.** Después de la incubación, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% y medir por flamometría los cationes tal como se explica en Metodología. Se muestran los promedios ± desviación estándar.

#### 6.4.2 Determinación del Consumo de Oxígeno. Células incubadas 4 horas.

Una de las funciones metabólicas más importantes en las levaduras es la fosforilación oxidativa. Anteriormente reportamos que *D. hansenii*, es más respiratoria que fermentativa (Sánchez *et al.*, 2006), por lo que era importante conocer el efecto de las distintas incubaciones en esta función celular.

En cuanto al consumo de oxígeno, se observó que las células no incubadas presentan una mejor capacidad respiratoria, comparadas con las que fueron sometidas a los diferentes tratamientos. Después de agregar CCCP se obtuvo la capacidad respiratoria máxima. En las incubaciones con YPD a pH 8 se obtuvo el mejor acoplamiento respiratorio y en las incubaciones en YPD + NaCl a pH 6 se obtuvo un cociente desacoplado/ estado basal (representativo de lo que ocurre en la mitocondria) más alto (Figura 19 y Tabla 1).



**Figura 19. Consumo de oxígeno en células incubadas durante 4 h.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de oximetría como se explica en Materiales y Métodos. Gráficas representativas de 3 experimentos.

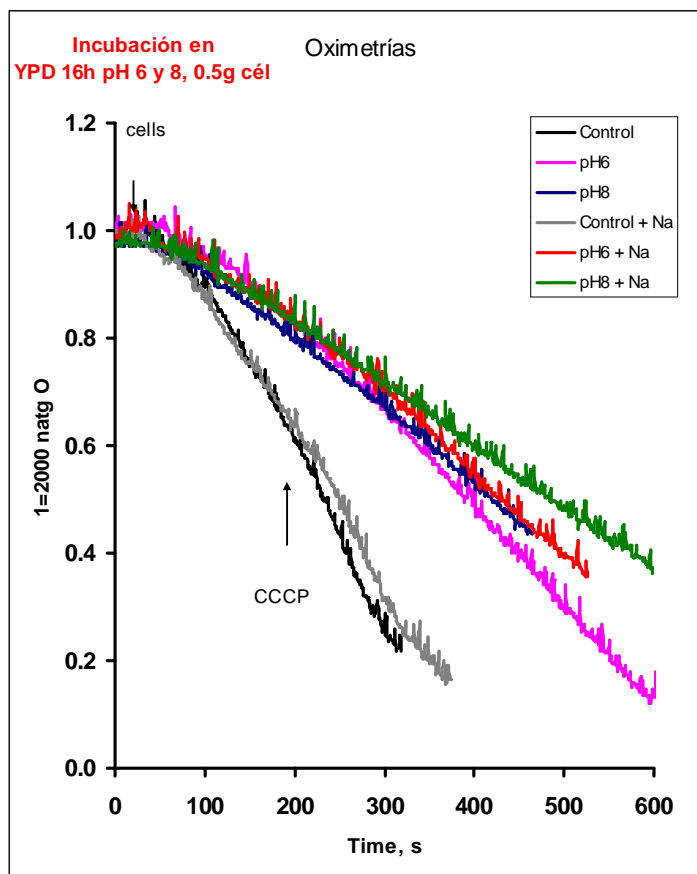
	YPD	YPD + 1M NaCl
Control	1.435 ± 0.15	
pH6	1.354± 0.07	1.343±0.13
pH8	1.54± 0.13	1.285± 0.01

**Tabla 1.** Cocientes estado desacoplado/ estado basal de las oximetrías realizadas en células incubadas 4h en las diferentes condiciones. Se muestran los promedios ± desviación estándar. Datos provenientes de 3 experimentos.

### 6.4.3 Determinación de Consumo de Oxígeno. Células incubadas 16 horas.

Se realizaron experimentos también con células incubadas 16 horas. Nuevamente se observó que las células no expuestas a la incubación presentan una mayor respiración, comparadas con las sometidas a los diferentes tratamientos. Después

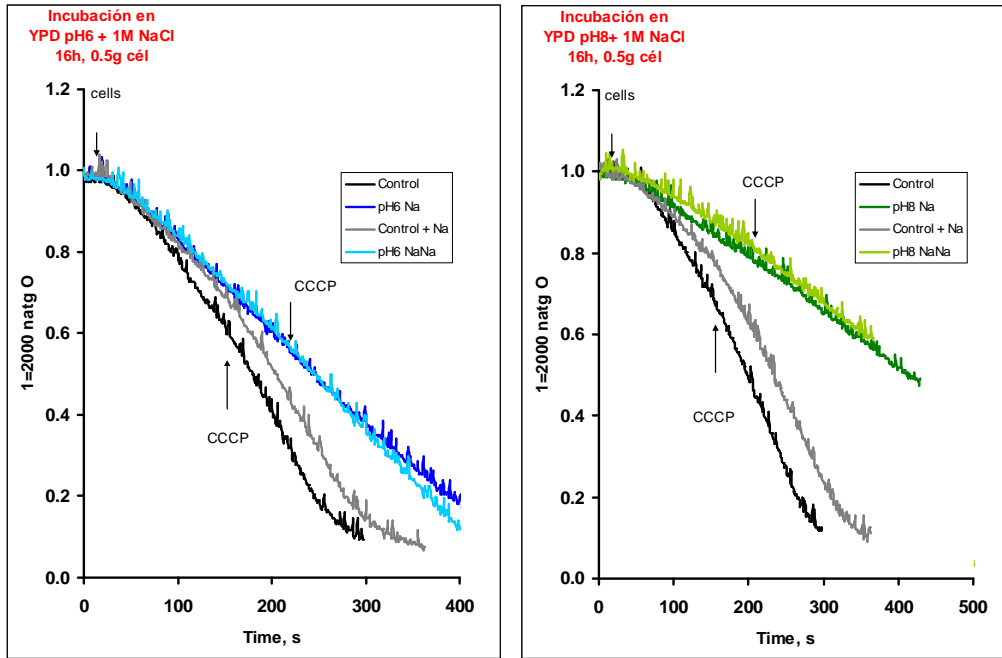
de agregar CCCP se obtuvo la capacidad respiratoria máxima. Esta vez se incluyeron experimentos en los cuales se adicionó 1 M de NaCl al ensayo.



**Figura 20. Consumo de oxígeno en células sujetas a incubaciones en YPD pH 6 ó 8 durante 16 h. Donde se indica, se añadió 1 M de NaCl al ensayo.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de oximetría. Gráfica representativa de 2 a 3 experimentos.

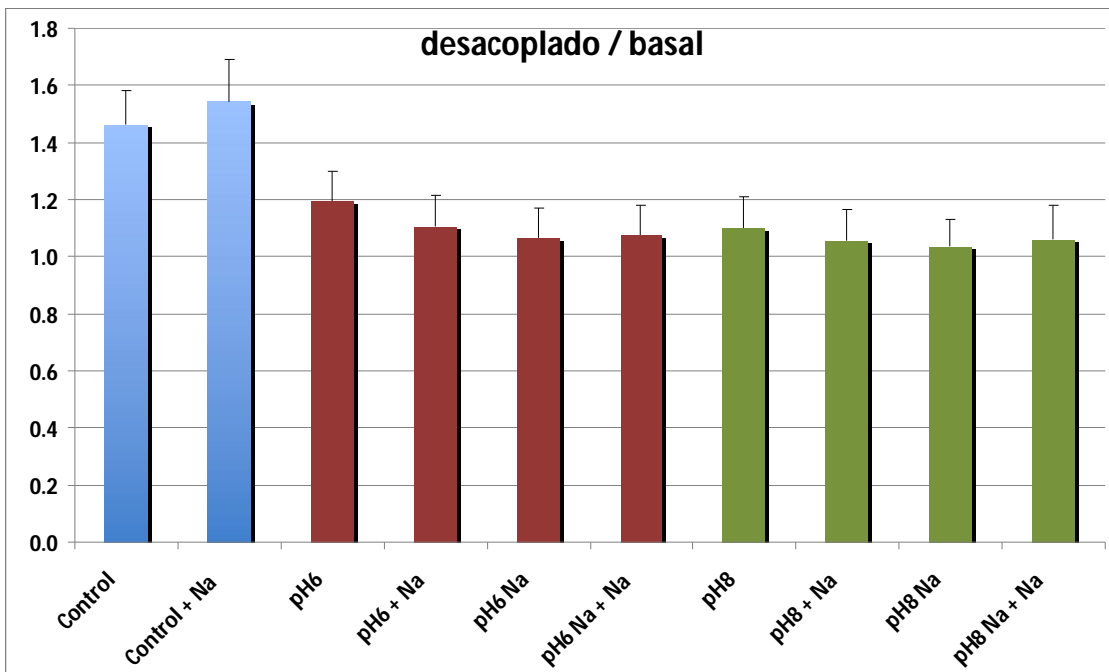
En las incubaciones con YPD a pH 6 la sal disminuye el acoplamiento, tanto si las células provienen de una incubación en su presencia como si se añadió al ensayo. En las incubaciones a pH 8, la presencia de sal en la incubación mejora un poco el acoplamiento, pero no mucho más agregándola al ensayo. Gráficas representativas en las figuras 20 y 21.



**Figura 21. Consumo de oxígeno en células previamente incubadas en YPD + 1 M de NaCl pH 6 ó 8 durante 16 h. Donde se indica se añadió 1 M de NaCl al ensayo.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de oximetría. Se adicionó 1 M de NaCl en los casos que se indica. Gráficas representativas de 2 a 3 experimentos.

Graficando los promedios de los cocientes desacoplado/ basal de varias repeticiones:



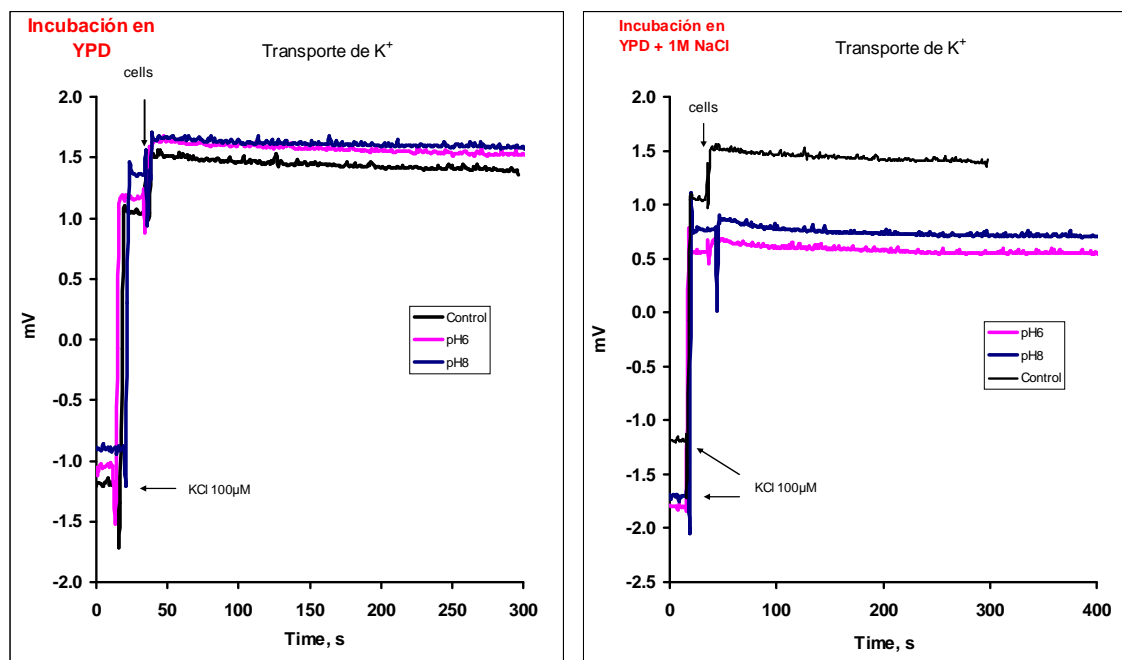
**Figura 22. Cociente estado desacoplado/estado basal. Promedio ± Desviación estándar. n: de 7 a 29.**

Se observó que las incubaciones a 16 horas disminuyen la capacidad respiratoria de las células sometidas a cualquiera de los tratamientos. No se detectó diferencia significativa con 1 M de NaCl; ni presente en las incubaciones, ni si se adiciona al ensayo. Para las células control, únicamente se aprecia una tendencia de estimulación de la capacidad respiratoria por la sal adicionada en el ensayo.

#### 6.4.4 Transporte de $K^+$ . Células incubadas 4 horas

Al ser el potasio el principal catión intracelular y dado que las medidas de  $Na^+$  y  $K^+$  intracelulares mostraron diferencias significativas en las diferentes incubaciones, se decidió medir el transporte de  $K^+$ .

Sorprendentemente, las células que no fueron incubadas presentaron un transporte de potasio deficiente, igual que en cualquiera de las condiciones de incubación (Figura 23). Las diferentes condiciones de incubación no modificaron el comportamiento observado en el transporte de potasio comparadas con el control sin incubar.

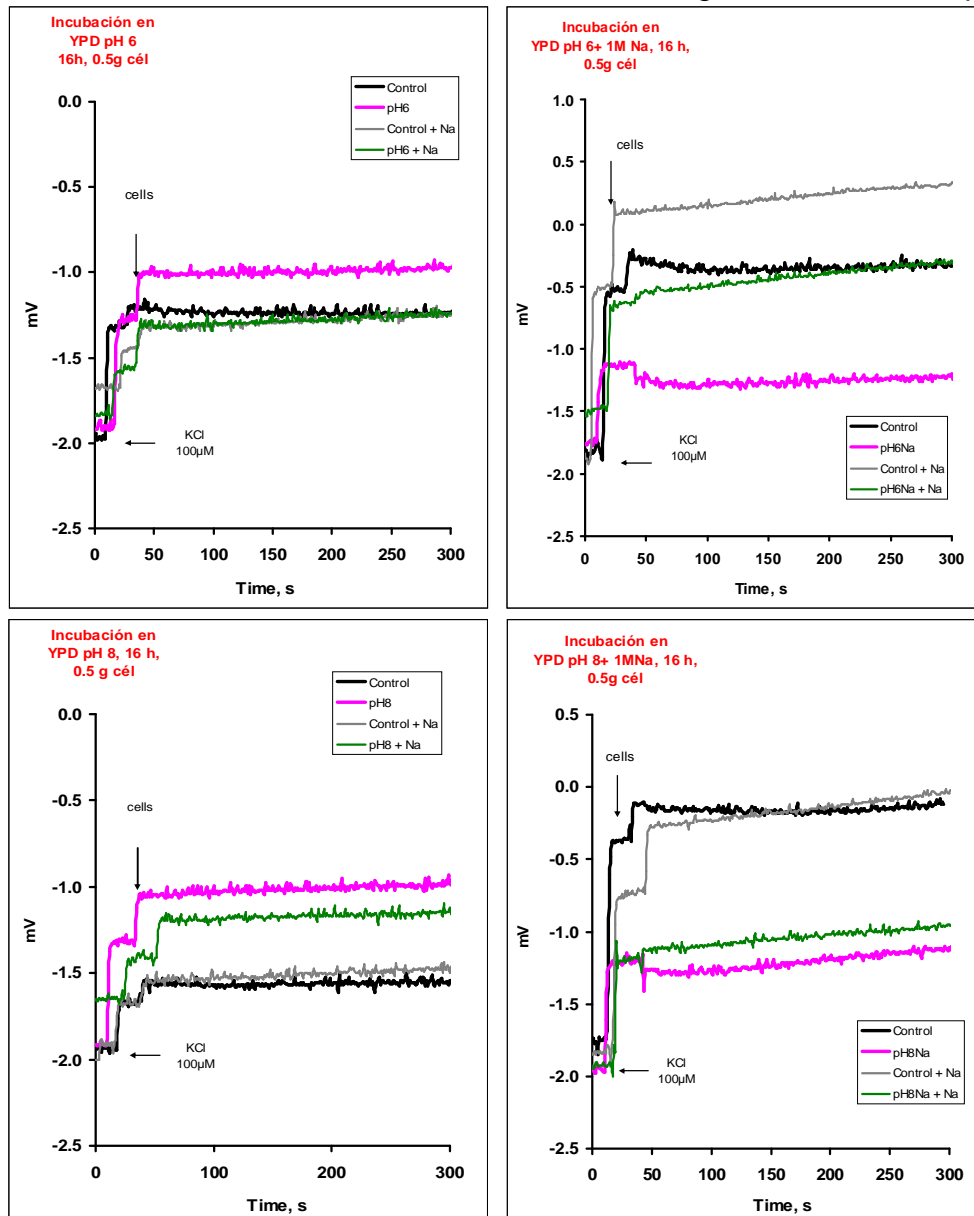


**Figura 23. Transporte de potasio en células sujetas a incubaciones durante 4 h.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de transporte de potasio como se explica en Metodología. Gráficas representativas de 4 experimentos.

### 6.4.5 Transporte de K<sup>+</sup> Células incubadas 16 horas

Se ensayó el transporte de potasio tanto en las células que no fueron expuestas a incubación, como en las incubadas por 16 horas. Nuevamente, las que no fueron incubadas presentaron un transporte de potasio deficiente y lo mismo sucede con cualquiera de las condiciones de incubación (Figura 24). Las diferentes condiciones de incubación no modificaron el comportamiento observado en el transporte de potasio comparadas con el control sin incubarse. La presencia de 1 M NaCl en el medio de ensayo no modificó sustancialmente el comportamiento. En el caso de los trazos de controles más bien se observó una ligera salida del ión potasio.



**Figura 24. Transporte de potasio en células sujetas a incubaciones durante 16 h.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de transporte de

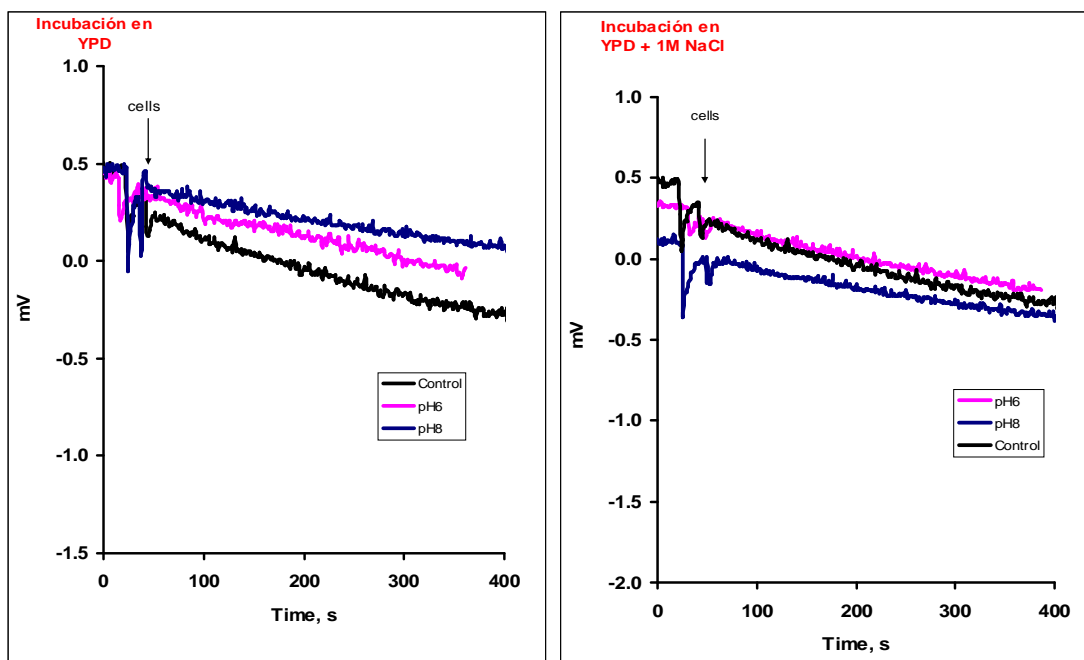
potasio como se explica en Metodología. Se adicionó 1 M de NaCl en los casos que se indica. Gráficas representativas de 2 a 4 experimentos.

### 6.4.6 Bombeo de protones al medio (o capacidad de acidificación) Células incubadas 4 horas

Otra estrategia para conocer la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática es conocer la capacidad de acidificación de las levaduras consumiendo glucosa y por medio de un electrodo de pH.

Se hicieron ensayos con las células provenientes de cultivos control y con las que fueron incubadas 4 o 16 horas en las diferentes condiciones.

El bombeo de protones disminuyó en las células incubadas 4 horas en YPD, tanto a pH 6 como pH 8, mientras que en las que fueron incubadas con 1 M NaCl, se observó una estimulación de la acidificación del medio a pH 6. Los cambios son discretos pero significativos (figura 25 y tabla 2).



**Figura 25. Acidificación del medio en células sujetas a incubaciones durante 4 h.**

Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de acidificación como se explica en Metodología. Gráficas representativas de 4 experimentos.

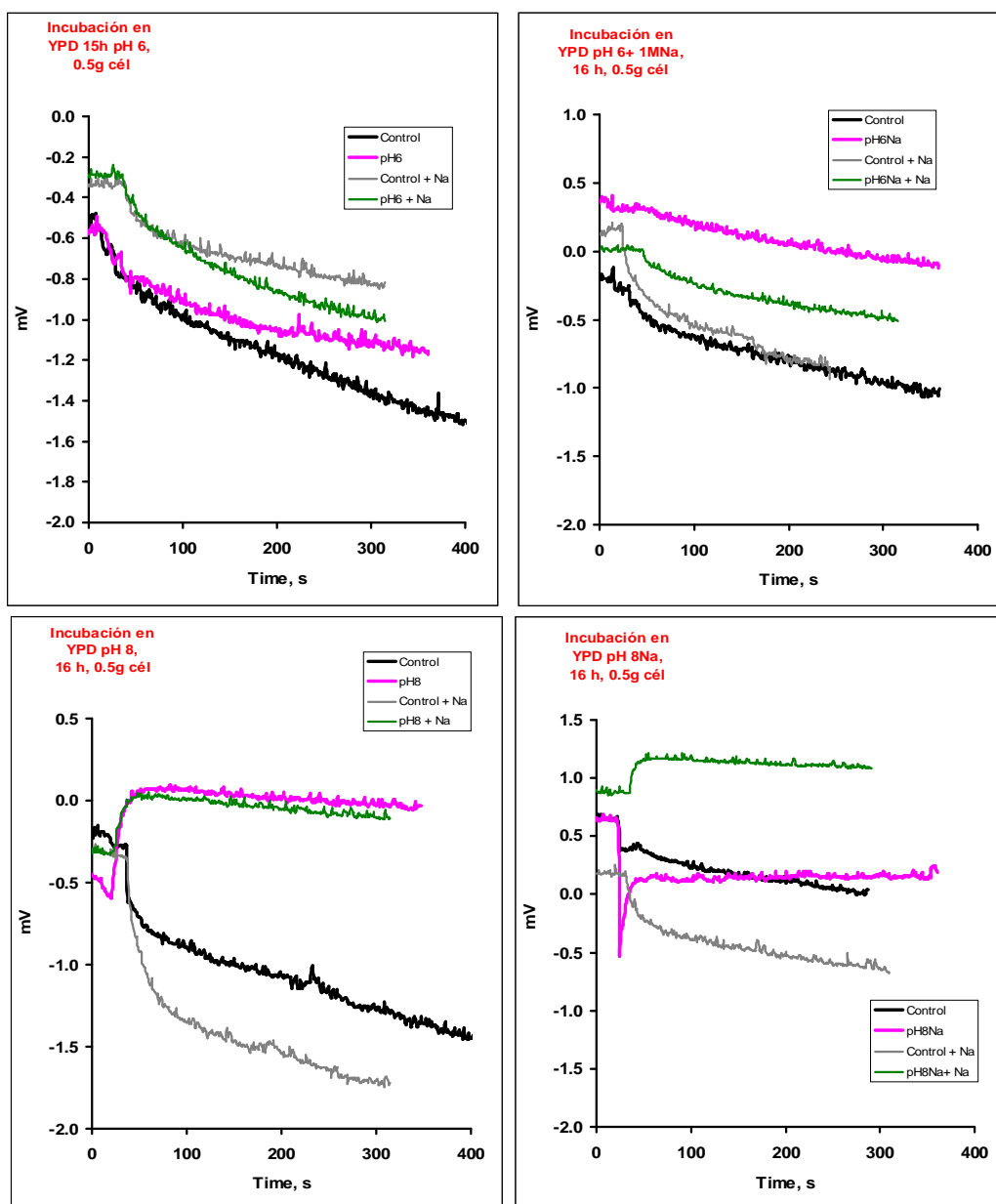
Pendientes acidificación ( $\times 1 \times 10^{-3}$ )

	YPD	YPD + 1M NaCl
Control	1.38 $\pm$ 0.1	
pH6	1.2 $\pm$ 0	1.4 $\pm$ 0.4
pH8	0.8 $\pm$ 0	0.9 $\pm$ 0.1

**Tabla 2.** Pendientes de los trazos de acidificación de los experimentos realizados en células incubadas 4 h en las diferentes condiciones. Se muestran Promedios  $\pm$  Desviación estándar. Datos provenientes de 3 experimentos ( $\times -1 \times 10^{-3}$ ).

### 6.4.7 Bombeo de protones al medio (o capacidad de acidificación) Células incubadas 16 horas

Las células incubadas 16 horas en YPD, a pH 6 en ausencia como en presencia de sal acidifican el medio. Sin embargo, las que fueron incubadas a pH 8 en vez de acidificar, lo alcalinizan. Al incubarlas en pH 8 + 1 M NaCl, la alcalinización disminuyó. Al añadir NaCl al ensayo, se estimuló la acidificación, sobre todo a pH 6, y en algunos casos en las células control (figura 26).

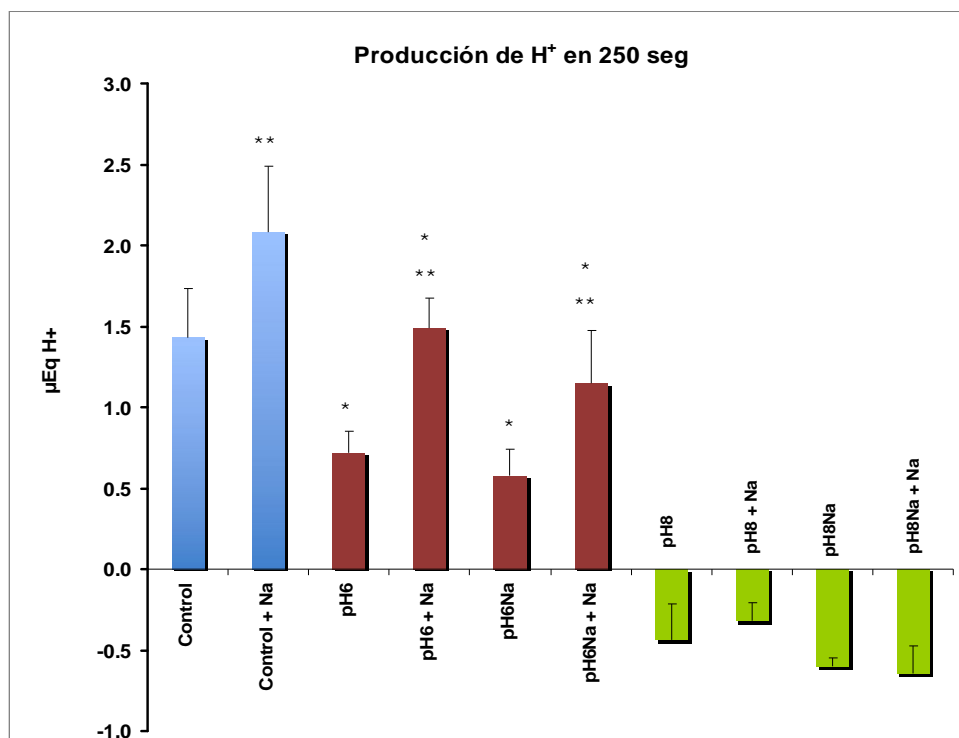


**Figura 26. Acidificación del medio en células sujetas a incubaciones durante 16 h.** Después de las incubaciones, los medios se centrifugaron y las células se lavaron una vez con agua para resuspenderlas al 50% (peso/volumen) y realizar los experimentos de acidificación como se explica en Metodología. Se adicionó 1 M de NaCl al ensayo en los casos que se indica. Gráficas representativas de al menos 2 experimentos.



Para poder visualizar las acidificaciones llevadas a cabo por las levaduras de un modo más práctico, se analizaron los resultados obtenidos transformando las gráficas de mV a  $\mu\text{Eq H}^+$  utilizando curvas patrón con HCl 100 mM, realizadas en cada experimento.

Habiendo efectuado todas las conversiones a  $\mu\text{Eq}$  de  $\text{H}^+$  generados en 250 segundos por cada condición, se realizó la gráfica comparativa de las distintas incubaciones (Figura 27).

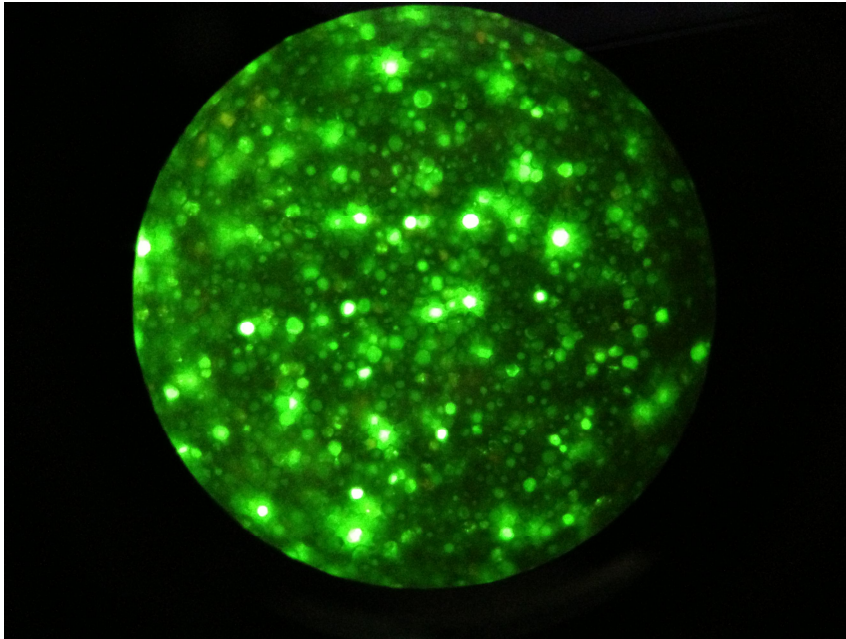


**Figura 27. Velocidades de acidificación** de los experimentos realizados en células incubadas 16 horas en las diferentes condiciones. Se muestran Promedios  $\pm$  Desviación estándar. Datos provenientes de n= 6 a 26 experimentos diferentes.

Observamos que el sodio presente en el ensayo estimula la acidificación de las células sin incubar (control) y de las que han estado 16 h en incubación a pH 6 de manera significativa. Las células incubadas a pH 8 alcalinizan el medio. Comparando pH 6 con pH 6Na, no hay una diferencia importante en la capacidad de bombeo de protones de ambos tipos de células, pero sí es menor comparándolas con las células control recién cosechadas.

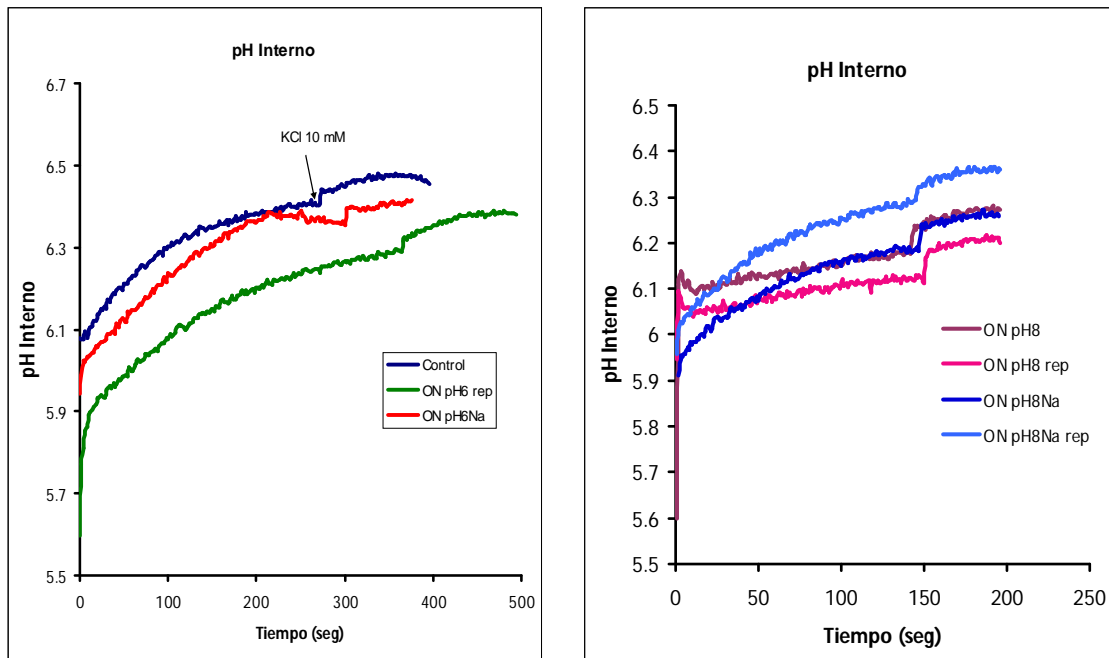
### 6.4.8 pH Interno

Uno de los objetivos particulares fue medir el pH interno de las células. Era interesante conocer si al incubar las células a distintos pHs el pH interno también cambiaba. Para esto, se logró montar la técnica de electroporación de *D. hansenii* con piranina (colorante fluorescente sensible a pH) para poder estimar el pH interno (Figura 28).



**Figura 28.** *Debaryomyces hansenii* electroporada con piranina. Microscopía de fluorescencia, Filtro B-2A, 40X.

Se electroporaron células control y células provenientes de las incubaciones a 16 horas en todos los tratamientos. Se observaron al microscopio para corroborar que efectivamente se hubieran electroporado adecuadamente y posteriormente se hicieron los experimentos en el fluorómetro.

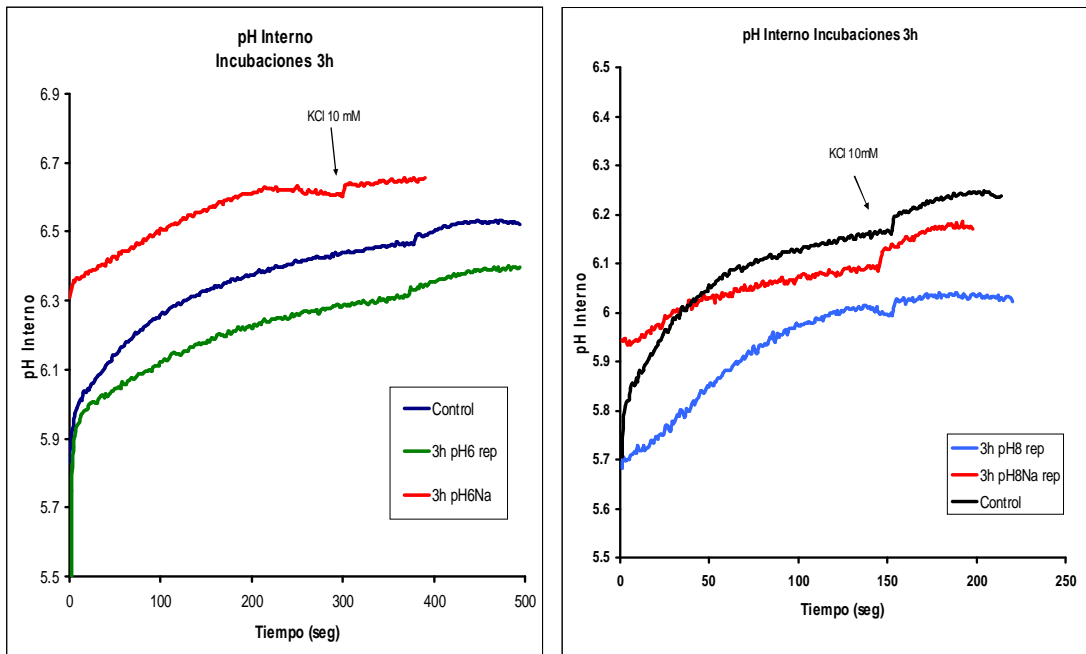


**Figura 29.** pH Interno de Células control y de células provenientes de Incubaciones de 16 h a pH 6, pH 6Na, pH 8 y pH 8Na. ON: "Overnight"; rep: repetición.

En la figura 29 observamos que las células incubadas por 16 horas en el pHStat son capaces de alcanzar un pH interno parecido a las células control, aunque en estas últimas el pH es más alto, en concordancia con los experimentos ya descritos de acidificación donde las células control tienen una mayor capacidad de bombeo de  $H^+$ .

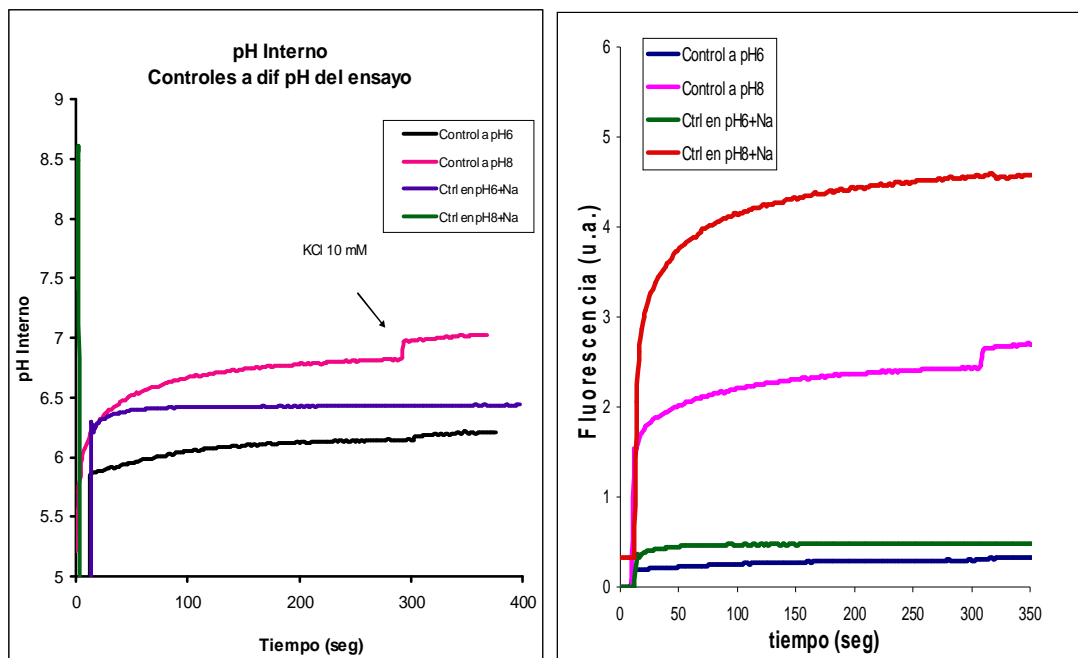
En cuanto a las incubaciones de 16 h, observamos que en las células que fueron incubadas con 1 M de NaCl, ya sea a pH 6 o a pH 8, se alcanza un pH interno más alto, coincidiendo también con los experimentos previos de acidificación.

Se realizaron incubaciones de 3 h en el pHStat a pH 6, pH 6Na, pH 8 y pH 8Na para electroporar las células y medirles el pH interno. En la figura 30 podemos ver que al incubar las células por 3 h a pH 6 con 1 M de NaCl, aumentó el pH interno por arriba de las células controles. Sorprendentemente, incubando las células 3 h a pH 8 o a pH 8Na, el pH interno no alcanzó a subir tanto como en las células controles. Pero es importante que la presencia de  $Na^+$  en la incubación siempre resulta en un pH interno más elevado.



**Figura 30.** pH Interno de Células control y de células provenientes de Incubaciones de 3h a pH6, pH6Na, pH8 y pH8Na. rep: repetición.

Si se mide el pH interno de células control a diferentes pHs del medio de ensayo, se puede comprobar que efectivamente el pH interno sube conforme el pH exterior es más alto (Figura 31). Si además en el ensayo se adiciona 1M de NaCl, el pH interno sube otro poco. En el caso del ensayo a pH 8 con sal, la fluorescencia aumentó tanto que no fue posible calcular el pH interno, pero se incluye la gráfica de la fluorescencia en unidades arbitrarias para visualizar este efecto.

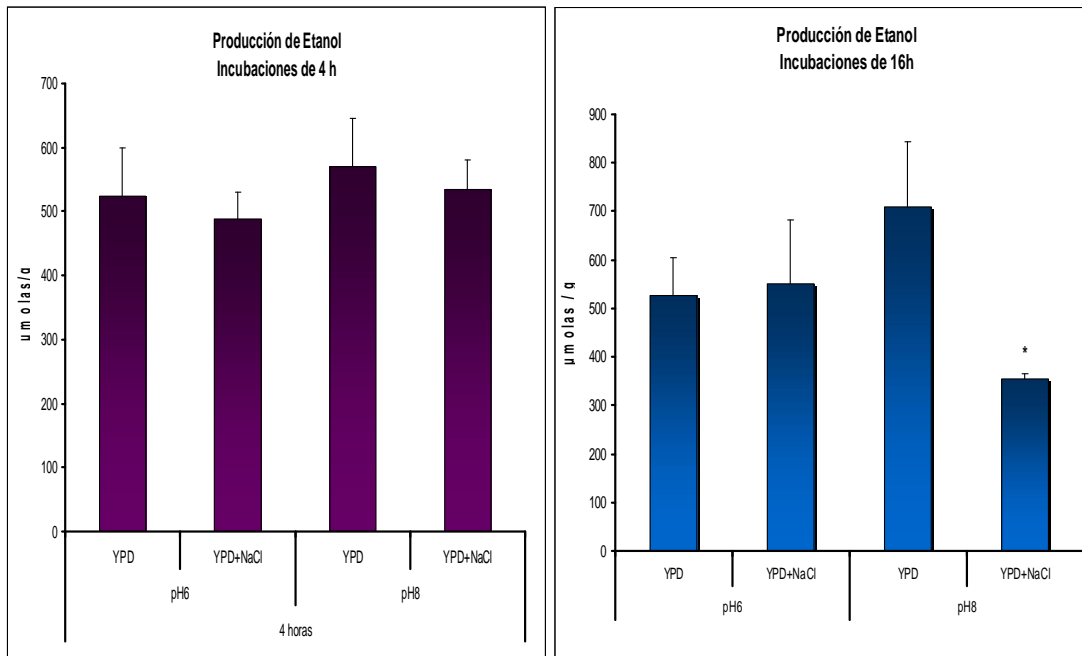


**Figura 31.** Izq. pH Interno de células control medido a diferentes pHs del ensayo. La gráfica de la derecha son solo las fluorescencias registradas.

#### 6.4.9 Contenido de etanol en los medios de incubación 4 y 16 h

Otra de las funciones metabólicas muy importantes en las levaduras es la fermentación. La fermentación provee a la célula de energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato. *D. hansenii* aunque es una levadura preferentemente respiratoria, tiene capacidad de fermentar (Sánchez *et al.*, 2006). Al medir el contenido de etanol en los medios de incubación podemos saber el efecto que sobre esta función celular tienen las distintas condiciones de los medios utilizados.

Después de las distintas incubaciones, se midió el contenido de etanol en una alícuota de los sobrenadantes de las diferentes condiciones de incubación tanto a tiempos cortos (4 h), como a tiempos largos (16 h). Los resultados para las incubaciones de 4 horas (Figura 32) no mostraron diferencia significativa en la capacidad fermentativa; pero la incubación a pH 8 indujo una ligera tendencia a aumentar la fermentación.



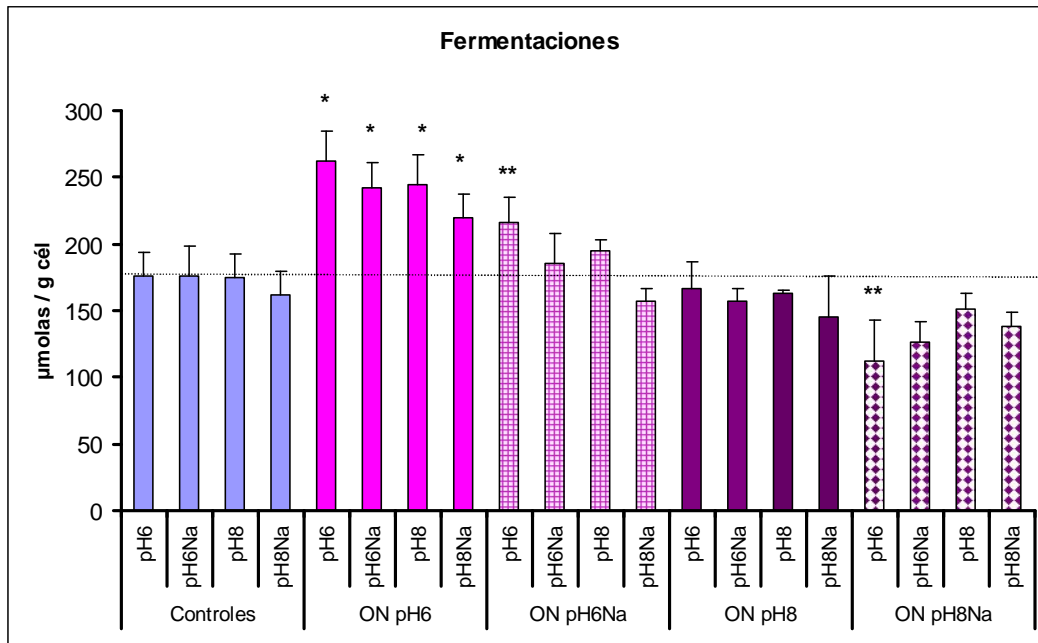
**Figura 32. Contenido de etanol ( $\mu\text{mol/g}$ ) de los sobrenadantes de las diferentes condiciones de incubación a 4 y 16 h. Se muestran promedios  $\pm$  desviación estándar de 5 o 6 muestras diferentes. \*  $p < 0.01$**

Las incubaciones de 16 horas (Figura 32) no mostraron diferencia significativa en la capacidad fermentativa entre las incubaciones a pH 6 y pH 6 con sodio; sin embargo, a 16 h de incubación a pH 8 + 1M NaCl, el contenido de etanol en el sobrenadante disminuyó significativamente.

#### **6.4.10 Fermentación producida por las células incubadas 16 horas.**

Se utilizaron las células que estuvieron 16 horas en el pHStat para medirles la capacidad de fermentación como una prueba más de que los tratamientos largos no les afectan a las células.

Después de las distintas incubaciones a 16 horas, se realizaron los experimentos de fermentación también a los distintos pHs y contenido de sal comparándolas con células control.



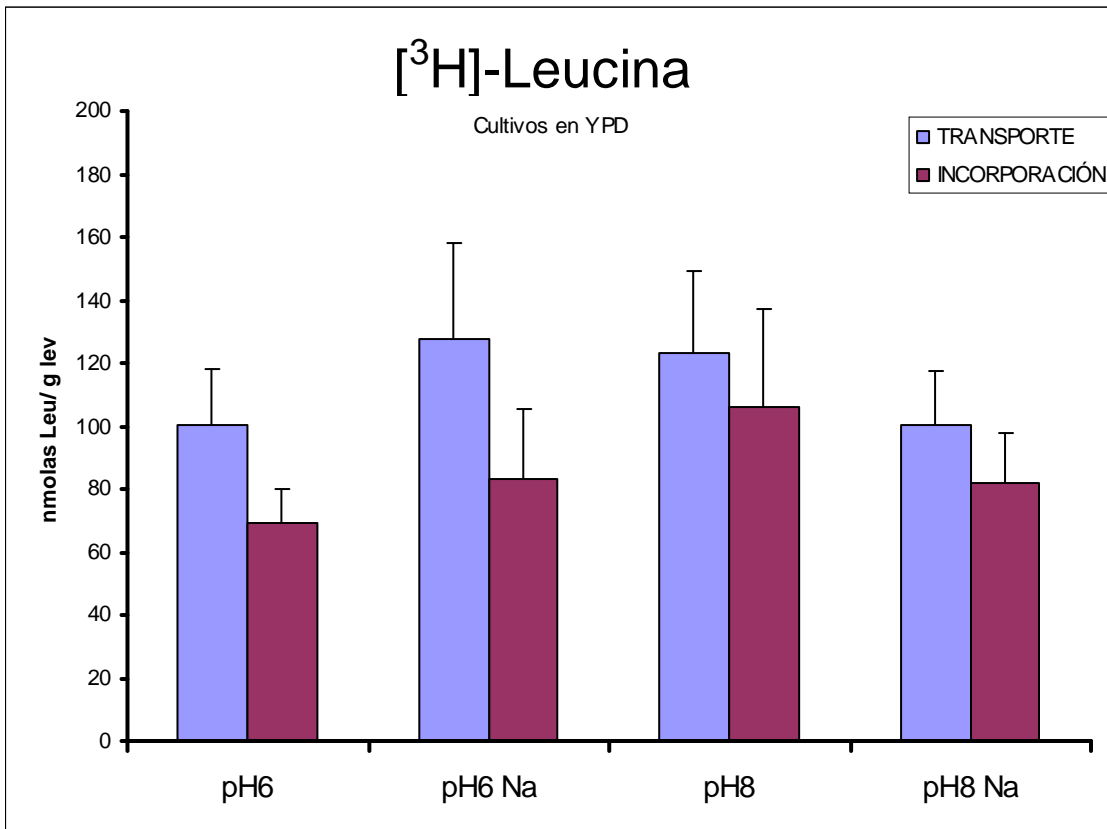
**Figura 33. Etanol producido (µmol/g) por células control y células provenientes de incubaciones a 16 horas.** Se muestran promedios ± desviación estándar de 5 o 6 muestras diferentes. n=10 para las células control; n=4 para las células de ON. \* p< 0.005; \*\* p<0.01 comparado con su control en el mismo medio. (ON=Overnight).

Los resultados (Figura 33) mostraron que las células provenientes de la incubación de 16 h a pH 6 tienen la mayor capacidad fermentativa de todas. Les siguen las de ON pH 6Na; las de ON pH 8 tienen una capacidad fermentativa parecida a las células control y las incubadas en pH 8Na tienen la menor capacidad fermentativa, en concordancia con los resultados de la sección anterior.

En cuanto a las diferentes condiciones del ensayo, no se modificó la cantidad de etanol producido por las células a los distintos pHs y adición de sal.

#### 6.4.11. Transporte e incorporación de <sup>3</sup>H-Leucina.

Una forma adicional de evaluar el efecto de los distintos medios consistió en medir el transporte y la incorporación de un aminoácido marcado radiactivamente. En la Figura 34 se muestra que no hubo diferencias significativas entre el transporte ni en la incorporación de <sup>3</sup>H-Leucina debidas a las diferencias de los medios de incubación.



**Figura 34.** Transporte e incorporación de <sup>3</sup>H-leucina. Células cultivadas en YPD. Después de una incubación de 40 min en el pHStat en los distintos medios, el transporte del aminoácido fue evaluado a los 10 min y la incorporación a los 20 min. n=6.



## 7. DISCUSIÓN

*D. hansenii* es un microorganismo halotolerante, excelente modelo eucariótico en el estudio del estrés salino. Al no haber suficientes reportes sobre su comportamiento a pH elevado (estrés alcalino), ni sobre el efecto adicional de la sal, fue objeto de este estudio investigar sobre el efecto de ambos tipos de estrés, solos o combinados, en el crecimiento, viabilidad, metabolismo energético y capacidades de transporte de esta levadura.

### 7.1 Crecimiento y sobrevida.

En las incubaciones a tiempos largos de 16 h, se observó una ligera disminución en el crecimiento de *D. hansenii* cuando se incubaba a pH 6 con sal y a pH 8 con y sin sal, comparándola con pH 6. Lo anterior se ve tanto en los experimentos determinando el aumento de la absorbencia a 600 nm, como determinando el peso húmedo obtenido al final de las incubaciones.

Los efectos observados están en contra de lo reportado previamente en la literatura, en cuanto a que la sal estimula el crecimiento de *D. hansenii* (Almagro *et al.*, 2000; González-Hernández *et al.*, 2005); sin embargo, nuestras condiciones de cultivo son distintas, puesto que en los trabajos anteriores no se controló el pH externo para mantenerlo en un valor constante; el principal factor a considerar es tal vez el aumento de las concentraciones de Na<sup>+</sup>, por la adición de NaOH necesaria para mantener el pH constante.

Los cambios del pH externo y su efecto sobre el crecimiento indican únicamente que *D. hansenii* es capaz de crecer a pH alto, pero fueron realizados en presencia de altas concentraciones de amortiguador o en ensayos de gota en placa, lo cual puede influir en el crecimiento, sin la seguridad de que se mantenga constante el pH (Almagro *et al.*, 2000; Ramos, 2005).

El crecimiento disminuye, pero muy lejos de cero; es decir, *D. hansenii* es capaz de crecer a pH 8 y con sal en este tipo de experimentos con el pH controlado en ausencia de un exceso de amortiguador.

En las incubaciones en presencia de sal y en las que se controla el pH en 8; la concentración extracelular de Na<sup>+</sup> (Figura 18) produce una disminución del volumen de las células, como hemos reportado con anterioridad (Sánchez *et al.*, 2008); por ello se decidió analizar la viabilidad de las células con diversas metodologías.

La viabilidad de las células en los experimentos de Unidades Formadoras de Colonias permitió observar que a pH 6 no cambió la sobrevivencia de las células y sí disminuyó un poco a pH 8 con y sin sal, pero sin que el pH alto o la presencia de sal afecte sobremanera su crecimiento.

Las tinciones realizadas con FUN-1 también permitieron comprobar que la viabilidad de las distintas condiciones de incubación a tiempos largos es comparable con las células control. Por ahora, tenemos los datos cualitativos y observamos que la condición en donde se ve más comprometida la viabilidad es a pH 8Na. Será interesante conocer cuantitativamente estos resultados, ya que

tenemos suficientes repeticiones de los experimentos, y se están afinando algunos detalles en el software del equipo para ello.

Las curvas de crecimiento aportan un poco más de información. Aunque realizadas en presencia de amortiguadores para mantener el pH, las células previamente sometidas a incubación de 16 horas fueron capaces de retomar su crecimiento como los controles. En general, de acuerdo con la bibliografía mencionada, a pH 6 la sal favorece la duplicación celular en todos los casos, disminuyendo el tiempo de generación. A pH 8, el  $\text{Na}^+$  1 M la retarda para las células control y para las que no tuvieron NaCl en la incubación de 16 h.

El inicio de la fase logarítmica se retarda en pH8Na para todos los casos. Será interesante verificar en los datos que se tienen de microarreglos si está disminuida la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. También puede ser interesante estudiar los patrones de expresión en tiempos más largos que los que hasta ahora hemos utilizado, previendo los cambios que resulten de la adaptación a los dos tipos de estrés en las etapas tardías de la curva.

Es necesario señalar que se verificó el pH del medio de cultivo al final de las curvas de crecimiento y se observó que los amortiguadores utilizados fueron lo suficientemente eficaces para mantener el pH de 6 ó 8. Es así que se pudiera pensar a futuro realizar los experimentos en cultivos en matraz con medios amortiguados y no en el pHStat que además implica una carga extra de sodio.

## 7.2 Contenido de $\text{K}^+$ y $\text{Na}^+$ internos.

Es interesante observar que en las incubaciones con YPD aumentó el contenido de  $\text{Na}^+$  y disminuyó el de  $\text{K}^+$  a pH 6 y más importantemente a pH 8, lo que pudiera estar sugiriendo, sobre todo a pH 8, que la estimulación de la  $\text{H}^+$ -ATPasa proporciona mayor impulso a la entrada de  $\text{Na}^+$ , ya sea a través de algún simportador, como el reportado con glicerol (Lucas *et al.*, 1990) o por lo sugerido anteriormente por nuestro grupo: a) un uniportador estimulado por potencial generado por la propia  $\text{H}^+$ -ATPasa, cuya actividad de bombeo claramente aumentó al pH alto; b) un sistema intercambiador  $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ , o c) un posible intercambiador catión/catión (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998).

Este efecto es aún más evidente en las incubaciones en presencia de NaCl 1 M, donde el nivel de  $\text{Na}^+$  alcanzó 370 mM a pH 6, y a 415 mM a pH 8, confirmando que se trata de una levadura “sodio incluyente” (Prista *et al.*, 1997). Es indudable que las altas concentraciones intracelulares alcanzadas de  $\text{Na}^+$ , aunque más que razonablemente toleradas por *D. hansenii*, no dejan de representar un estrés importante para las células.

## 7.3 Consumo de Oxígeno

Al obtener el cociente de la respiración en presencia de un desacoplante sobre la observada en su ausencia, podemos por una parte conocer la capacidad respiratoria máxima de las células en las diferentes condiciones, pero también tener una idea sobre la disponibilidad de ADP en el estado basal.

Las levaduras control, como salen del cultivo, sin incubación a pH controlado, tienen una mayor capacidad respiratoria que las expuestas antes a un pH fijo; sin embargo, no se pierde el acoplamiento en ninguna de ellas.

A tiempos cortos (4 h), los resultados muestran que las incubaciones a pH 8 mejoraron el acoplamiento, y en presencia de NaCl están mejor acopladas a pH 6, en congruencia con lo reportado previamente por nuestro grupo (Calahorra, *et. al.*, 2009).

En las células obtenidas después de incubar 16 horas, es notoria la disminución de los valores del consumo de oxígeno con y sin desacoplante, así como del acoplamiento, en comparación con las recién salidas del cultivo, pero también en comparación con las incubadas durante 4 horas.

Éste en cierto modo, es un efecto inesperado, ya que habíamos reportado con anterioridad que el NaCl ocasiona una especie de “acoplamiento” de la cadena respiratoria mitocondrial en *D. hansenii* (Sánchez *et. al.*, 2008), pero ese reporte correspondió a células en cultivos de 42 h (al inicio de la fase estacionaria), en ausencia o presencia de 1 M de NaCl, donde ya están adaptadas a las condiciones de cultivo.

En general, las células incubadas 16 horas en cualquier tratamiento respiran; es decir, obtienen energía a través de la fosforilación oxidativa; sin embargo, como ya se mencionó, respiraron menos que después de 4 horas y no mostraron un acoplamiento tan eficiente como las recién cosechadas.

#### 7.4 Transporte de K<sup>+</sup>

Intentos previos nuestros con *D. hansenii* mostraron que esta levadura no resiste el ayuno. Su incapacidad para tomar el K<sup>+</sup> del medio puede entonces deberse a que durante el crecimiento ha acumulado suficiente y no requiere acumular más. El sodio añadido al ensayo no tiene un efecto apreciable sobre lo observado. De hecho, en la misma *S. cerevisiae* se observa también que la acumulación neta de este catión es mucho menor cuando las células no han sido ayunadas.

#### 7.5 Acidificación del medio

La acidificación del medio se debe a una H<sup>+</sup>-ATPasa presente en la membrana plasmática que ha sido ampliamente documentada en *S. cerevisiae* (Peña *et al.*, 1972) y que funciona de la misma manera en *D. hansenii* (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998). Monitoreamos la acidificación del medio por dos metodologías diferentes: a) el gasto en mEq de NaOH por el pHStat y b) en las células luego de las incubaciones, utilizando un electrodo de pH. Es necesario señalar que la capacidad de acidificación de *D. hansenii* es mucho menor que la de *S. cerevisiae* (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998).

A tiempos cortos, la estimulación de la acidificación en las dos metodologías y a los dos pHs probados, sugiere que la H<sup>+</sup>-ATPasa se estimula con NaCl. En *S. cerevisiae* este hecho ya ha sido reportado desde 1972 (Peña *et al.*, 1972) y ahora lo observamos en *D. hansenii*. A tiempos largos, el efecto es evidente a pH 8, el cual por sí mismo estaría estimulando a una H<sup>+</sup>-ATPasa, por la disminución de la concentración de H<sup>+</sup> en el exterior. Sin embargo, las células que terminan una incubación larga de 16 horas a pH 8, con o sin sal, disminuyen notablemente su capacidad para acidificar “in vitro”; en algunos casos inclusive se observa una alcalinización del medio. Probablemente se deba al incremento en el pH interno, y

al colocarlas en un pH de 6, se establece un equilibrio del pH externo con el interno.

Es importante hacer una comparación con *S. cerevisiae*, que no es ni halófila ni alcalófila. En esta levadura, el gasto de NaOH para mantener un pH de 6 o el pH 8 en presencia de NaCl (0.6 M) muestra una disminución considerable, lo que nos muestra su poca tolerancia a la sal (Figura 35).

El sistema de acidificación de *D. hansenii* en ausencia o en presencia de sal no es tan eficiente como el de *S. cerevisiae*. Esto en parte se debe a que la primera no permite el ayuno, pero también a que tiene una menor capacidad para acidificar el medio como se ha reportado previamente (Thomé-Ortiz *et al.*, 1998).

La Figura siguiente muestra los resultados que se obtienen con *S. cerevisiae*, cuya capacidad de acidificación es mucho mayor que la de *D. hansenii*, y que la presencia de Na<sup>+</sup> disminuye notablemente la capacidad de acidificación a los dos pHs utilizados (comparar con los datos de la Figura 5).

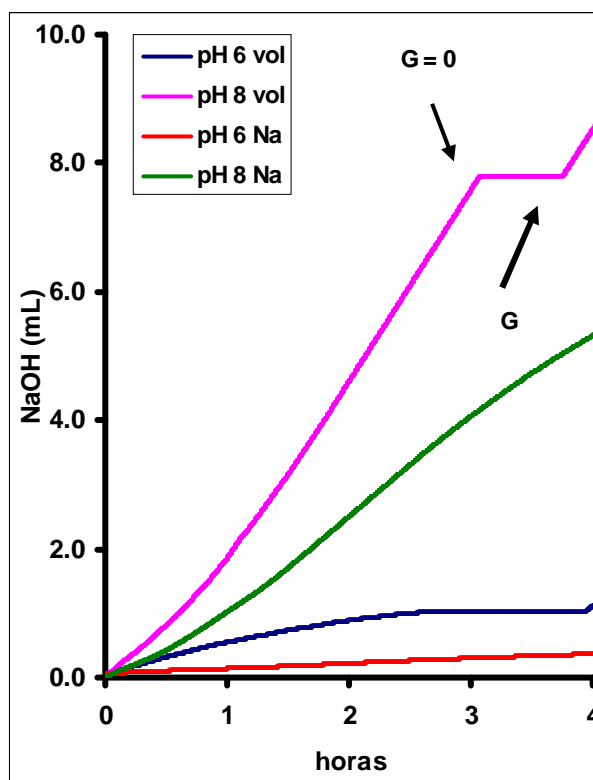


Figura 35. Volumen de NaOH gastados en un pHStat por *S. cerevisiae* para mantener el pH a 6 o a 8 en ausencia o presencia de NaCl 0.6M. El experimento se hizo como en la figura 5 de la sección de Resultados.

### 7.6 pH Interno

Comprobamos que en las células incubadas 16 horas a pH 6Na o pH 8Na, se alcanza un mayor pH intracelular que en las que no tuvieron sodio durante su incubación. Este dato apoya lo antes propuesto, que la presencia de Na<sup>+</sup> aumenta el bombeo de protones.

En las incubaciones a 3 horas, se corroboró que el sodio incrementa la alcalinización interna, tanto a pH 6 como a pH 8. En las células control son muy claros los efectos del pH y la sal externos en el pH interno. A mayor pH externo, mayor pH interno; la presencia de NaCl en el ensayo lo incrementa de manera adicional.

### **7.7 Producción de etanol durante la incubación y capacidad de fermentación de las células tratadas.**

Fue inesperado que la presencia de sal en el medio de incubación no aumentara el contenido de etanol en los sobrenadantes, de acuerdo con lo reportado previamente por nuestro grupo (Calahorra *et al.*, 2009); sin embargo, hay que considerar el tiempo tan largo de incubación y las condiciones en que son realizadas, en una cámara abierta que bien pudiera influir en la evaporación del etanol. En cuanto al efecto del pH 8, es un resultado novedoso ver que el contenido de etanol es menor en presencia de NaCl a tiempos largos.

Los experimentos sobre la capacidad fermentativa de las células incubadas 16 horas reflejan una estimulación en la producción de etanol para las sometidas a pH 6 por 16 horas y sólo parcialmente para las de pH6Na. Esto pudiera explicarse porque para mantener el pH de 6 se requirió cierta cantidad de NaOH que ingresó Na<sup>+</sup> al interior de las células y ello se refleja en un aumento en la capacidad fermentativa (Calahorra *et al.*, 2009).

En este tipo de experimentos comprobamos que las células expuestas a pH8Na por 16 horas tienen la menor capacidad fermentativa de todas las variantes experimentales, aunque sin dejar de fermentar.

### **7.8 Transporte e Incorporación de <sup>3</sup>H-Leucina**

La leucina es un aminoácido del tipo hidrofóbico cuyo transporte se ha estudiado extensamente en *S. cerevisiae*. Puede ingresar a la célula por dos sistemas específicos de transporte, el VII o el VIII, o por el sistema general GAP1 (Horák, 1986). Como para la mayoría de los aminoácidos, su entrada se realiza por medio de un transporte de tipo activo. La fuente de energía es la diferencia de potencial electroquímico de iones (en este caso, los H<sup>+</sup>), por lo que se pudiera predecir que el transporte e incorporación de leucina disminuyera a pH 8 o a pH 8 con NaCl; sin embargo, no fue así.

Este resultado inesperado invita a estudiar con más detalle el mecanismo del transporte de los aminoácidos, que pudiera ser diferente al de *S. cerevisiae*.

De cualquier manera, no habiendo obtenido diferencias significativas en el transporte ni en la incorporación de leucina con los diferentes tratamientos, podemos concluir que este tipo de función metabólica no se encuentra comprometida por el estrés salino o alcalino en *D. hansenii*.

### **7.9 Integración de los resultados**

Tomando los resultados en conjunto, podemos argumentar que *D. hansenii*, aunque con cierta dificultad, puede soportar el estrés salino y/o el alcalino. Podemos en este sentido decir que es tolerante al pH elevado, pero prefiere vivir

en valores más bajos. También podemos afirmar que es tolerante a la sal, mucho más que *S. cerevisiae*, pero de por sí prefiere vivir en su ausencia.

Aunque se trata de una levadura con poca capacidad fermentativa (Sánchez *et al.*, 2006), debe estar obteniendo parte de su energía de este modo ya que vimos su capacidad respiratoria afectada. Claramente, la relación respiración/ fermentación disminuye ante el estrés alcalino o salino.

Pareciera que la presencia de sodio fuera responsable, al menos en parte, de una disminución de la capacidad respiratoria. Fue claro que los valores del consumo de oxígeno, en especial después de la adición del CCCP, que nos indica la capacidad máxima, son mucho menores mientras más larga ha sido la incubación (Figuras 19 y 20).

La disminución en la fermentación a pH8Na no sería suficiente para explicar la disminución en el crecimiento y viabilidad de *D. hansenii*. Se verá a futuro qué sucede a nivel de ciclo celular. Hay que considerar también que a pH8Na, al juntarse los dos tipos de estrés, se requiere un gasto energético mayor para la célula, para expulsar por medio de la Na<sup>+</sup>-ATPasa (ENA1-2) el exceso de Na<sup>+</sup> que ingresa a la célula y para bombear H<sup>+</sup> por la H<sup>+</sup>-ATPasa (PMA1), efecto que corroboramos se ve estimulado por la sal y el pH elevado. El gasto de energía en estos procesos, seguramente resta su capacidad para continuar creciendo.

Todos los resultados hasta aquí obtenidos a tiempos largos: respiración, capacidad de acidificación y fermentación, concuerdan con los de un menor crecimiento a pH 8 con sal; es decir, en las células incubadas por 16 horas se afectan sus capacidades metabólicas de tal manera que ello se refleja en un menor crecimiento; sin embargo, es de hacerse notar que puede seguir creciendo, aunque más lento. A *S. cerevisiae*, le es mucho más difícil contender con ello, sobre todo a pH8 + NaCl.

## 8. CONCLUSIONES

*D. hansenii* es una levadura capaz de crecer y sobrevivir en condiciones de estrés salino y estrés alcalino. Esto es válido si estas condiciones de estrés están presentes de manera conjunta o separada.

En incubaciones a pH 8 y en presencia de 1 M de NaCl, su capacidad de crecimiento disminuye en forma de un retardo en el inicio de la fase logarítmica de crecimiento y un aumento del tiempo de generación.

La producción de etanol disminuye también si se le incuba a pH 8 con NaCl, pero esto no es suficiente para explicar las diferencias en crecimiento y viabilidad. El gasto energético que supone el contender con el estrés salino y alcalino, seguramente compromete su crecimiento.

Dado que *D. hansenii*, de cualquier forma, crece y mantiene mejor sus funciones a pH 6 y en ausencia de sodio, concluimos que es una levadura alcali-halotolerante, y no halofílica, como proponen otros autores.

## 9. PERSPECTIVAS

Se pretende medir el transporte de  $^{86}\text{Rb}$  en células provenientes de las diferentes condiciones de incubación durante 16 horas. Ésto nos permitirá verificar si realmente están transportando  $\text{K}^+$ . Es posible que no estemos detectando la entrada por medio del electrodo por encontrarse en un estado de equilibrio rápido entre la entrada y la salida, que impida observar la primera.

Será interesante conocer el estado del Potencial transmembranal en las células obtenidas de las diferentes incubaciones y si ésto de alguna manera está influenciando también la capacidad de duplicación. Para ello, ya se tiene estandarizado en el laboratorio una metodología de estimación de la diferencia del potencial eléctrico de la membrana, utilizando la Cianina DiSC<sub>3</sub>(3), un colorante fluorescente (Peña *et al.*, 2010).

Al haber encontrado diferencias en el crecimiento de las células debido a las distintas condiciones de incubación, someteremos las células a los diferentes tratamientos y al término de 16 horas, realizaremos experimentos de citometría de flujo, utilizando SYTOX GREEN® (Molecular Probes) para analizar el estado del ciclo celular para cada condición.

Ya contamos con los archivos de resultados de los experimentos de microarreglos. Ahora se pretende analizar los resultados obtenidos para observar las tendencias de los genes que incrementan o disminuyen su expresión como resultado de la incubación en sal y pH elevado. Ello será confirmado con los respectivos experimentos de RT-PCR para los genes que resulten de interés.

Los genes que se analizarán son: *PMA1*, *ENA1-2*, aquéllos involucrados en la homeostasis catiónica, los genes involucrados en el ciclo celular, *HOG1*, y otros relacionados con la respuesta al estrés salino y/o alcalino ya reportados para *S. cerevisiae*.

Más adelante, se pretenden definir las vías de transducción de señales relacionadas con el estrés salino en *D. hansenii*.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alba-Lois L., Segal C., Rodarte B., Valdés-López V., De Luna A. and Cárdenas R. (2004). NADP<sup>+</sup>-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Current Microbiology*. 48: 68–72.
- Aggarwal, M., Bansal, P.K. and Mondal, A.K. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 22:457–470.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J. and Loureiro-Dias, MC. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 56:191–197
- André, L., Nilsson, A. and Adler, L. (1988). The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of General Microbiology*. 134:669-677.
- Beyda, N.D., Chuang, S.H., Alam, M.J., Shah, D.N., Ng, T.M., McCaskey, L. and Garey, K.W. (2013). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68 (2): 438-443.
- Björn, H., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C. and Kielland-Brandt, M. C. (2000). *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 37:108-124.
- Cabrera-Orefice A., Guerrero-Castillo S., Luévano-Martínez L.A., Peña A., Uribe-Carvajal S. (2010). Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 42(1):11-9.
- Calahorra, M., Martínez, G.A., Hernández-Cruz, A. and Peña, A. (1998). Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast*. 14: 501–515.
- Calahorra, M., Sánchez, N.S. and Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*. 9:1293–1301.
- Casado, C., González, A., Platara, M., Ruiz, A. and Ariño, J. (2011). The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochemical Journal*. 438, 523–533.
- Cong, Y.S., Yarrow, D., Li, Y.Y. and Fukuhara, H. (1994) *Microbiology*. 140: 1327-35.
- Das Sarma S. and Das Sarma P. 2012. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub3
- de Nadal, E., Ammerer, G and Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics* 12, 833-845.
- García-Salcedo, R., Casamayor, A., Ruiz, A., González, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., Ramos, J. and Ariño, J. (2006). Heterologous Expression Implicates a GATA Factor in Regulation of Nitrogen Metabolic Genes and Ion Homeostasis in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Eukariotic Cell*. 5(8):1388-1398.
- García-Salcedo, R., Montiel, V., Calero, F. and Ramos, J. (2007). Characterization of *DhKHA1*, a gene coding for a putative Na<sup>+</sup> transporter from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*. 7:905–911.

- González-Hernández, J. C., Cárdenas-Monroy, C. A. and Peña, A. (2004). Sodium and potassium transport in halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 21: 403-412.
- González-Hernández, J. C., Jiménez-Estrada, M. and Peña, A., (2005). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles*. 9:7–16.
- González-Hernández, J. C., Peña, A., Sánchez, N. S. y Calahorra, M. (2006) Fisiología y Metabolismo Celular de *Debaryomyces hansenii*. Ciencia Nicolaita. Revista de la Coordinación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. No. 44: 63-74.
- Horák, J. (1986). Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 864: 223-256.
- Kreger van Rij, N.J. and Veenhuis, M. (1975). *Journal of General Microbiology*. 89: 256-64.
- Kurita, O. and Yamazaki, E. (2002). Growth under alkaline conditions of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* IFO 10939. *Current Microbiology*. 45:277-280.
- Lucas, C., da Costa, M. and van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 6: 187-191.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO Journal*. 14:1360-1371.
- Martínez, J.L., Sychrova, H. and Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*. 48:177–184.
- Mc Neil, J. (1979). *Sea Microbes*. Ed. Oxford.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Truong Thi, H.P., Yue, S.T. and Haugland, R. P. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability of yeasts. (1997). *Applied and Environmental Microbiology*. 63:2897-2905.
- Montiel, V., and Ramos, J. (2007). Intracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Research*. 7: 102–109
- Mortensen, H.D., Gori, K., Siegumfeldt, H., Nissen, P., Jespersen, L. and Arneborg, N. Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hansenii* strains. (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:713-719.
- 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.
- Nishikawa, A., Tomomatsu, H., Sugita, T., Ikeda, R. and Shinoda, T. (1996) *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 34: 411-9.
- Norkrans B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv für Mikrobiologie*. 54: 374–392.
- Norkrans B. and Kylin A. (1969). Regulation of potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of Bacteriology* 100: 836–845.
- Ochoa, J.L. y Vázquez- Juárez R. Las Levaduras Marinas como Herramientas Científica y Biotecnológica, 2004. [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia). Número Especial I: 39-50
- Oren, A. (1999). Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:334-348.

- Peña, A. (1975). Studies on the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 167: 397-409.
- Peña, A. Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972). Effect of the pH of incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 153: 413-425.
- Peña, A., Sánchez, N.S., and Calahorra, M. (2010). Estimation of the electric plasma membrane potential difference in yeast with fluorescent dyes: comparative study of methods. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 42:419-432.
- Prista C., Almagro A., Loureiro-Dias M.C. and Ramos J. (1997). Physiological basis for the high tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 4005–4009.
- Prista, C., González-Hernández, J.C., Ramos, J. and Loureiro-Dias, M.C. (2007) Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*. 153: 3034–3043
- Ramos, J. Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. En: N. Gunde-Cimerman *et al.* (eds.), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, 441-451. ©2005 Springer. Printed in the Netherlands.
- *Saccharomyces* Genome Database. <http://www.yeastgenome.org/>
- Sánchez, N. S., Arreguín, R., Calahorra, M. and Peña, A., (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*. 8: 1303-1312.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C. and A. Peña, (2006). The glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23: 361-374.
- Schmitt, M.E., Brown, T. A. and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Research*. 18: 3091-3092.
- Seiler, H. and Busse, M. (1990). The yeasts of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology*. 11: 289-303.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A. and Ariño, J. (2006). Signaling Alkaline pH Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 Cell Surface Sensor and the Sit2 MAPK Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(52): 39785–39795,
- Serrano, R. and Rodríguez-Navarro, A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. 13: 399-404.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, R. and Ariño J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for calcium mediated signaling. *Molecular Microbiology*. 46: 1319-1333.
- Sharma, P., Meena, N., Aggarwal, M., and Mondal, A.K. (2005). *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Current Genetics*. 48: 162–170.
- Slayman, C. L., Long, W. S., and Lu, C. Y. (1973). The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa* *Journal of Membrane Biology*, 14, 305-38.
- Thomé-Ortiz P., Peña A. and Ramírez J., (1998). Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast*. 14:1355–1371.
- Van der Walt, J.P., Taylor, M.B. and Liebenberg, N.V. (1977) *Antonie Van Leeuwenhoek*. 43: 205-18.
- Van N y Fell J. (1968). *Marine Yeasts. Advances in microbiology of the sea*. Vol. 1. Academic Press, London and New York. p167-201.

- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A. y Ariño, J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 42: 43614-43624.
- Vindelov J., and Arneborg, N. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces mellis* exhibit different hyperosmotic shock responses. *Yeast*. 19:429-439.
- Wong, B., Kiehn, T.E., Edwards, F., Bernard, E.M., Marcove, R.C., de Harven, E. and Armstrong, D. (1982). *Journal of Clinical Microbiology*. 16: 545-8.