

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



**El estrés abiótico en el metabolismo del nitrógeno y en el
sistema antioxidante de la microalga acidófila**

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

María del Carmen Romero Cruz

Fecha de lectura: 7 de junio de 2017

Bajo la dirección del doctor:

Javier Vigara Fernández

Huelva, 2017





Universidad
de Huelva



**ESTRÉS ABIÓTICO EN EL
METABOLISMO DEL NITRÓGENO Y EN
EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LA
MICROALGA ACIDÓFILA
*Coccomyxa onubensis***

María del Carmen Romero Cruz

Huelva, 2017



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
“Profesor José Carlos Vílchez Martín”**

**ESTRÉS ABIÓTICO EN EL METABOLISMO DEL
NITRÓGENO Y EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE
DE LA MICROALGA ACIDÓFILA
*Coccomyxa onubensis***

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en
Química, por la Licenciada en Química**

María del Carmen Romero Cruz

Director

**Dr. Javier Vigara Fernández
Catedrático de Escuela Universitaria de
Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Huelva**

A mis padres, por haberme formado como la
persona que soy en la actualidad, por vuestro amor, trabajo,
apoyo incondicional en los buenos y malos momentos y
sacrificios en todos estos años.
Gracias a vosotros he logrado llegar hasta aquí y convertirme
en lo que soy, por ello, esta Tesis es vuestra.
GRACIAS por creer en mí.

A mi hermano, por estar siempre a mi lado y
apoyarme en todo momento.
A pesar de las “peleas”, siempre he querido lo mejor para ti.
Somos hermanos y siempre estaremos juntos.
¡¡Te quiero!!

A Xiki, el pequeñín de la casa, por darme todos esos
momentos de alegría y cariño.
Aunque ya no estés, siempre te llevaré conmigo.

“El modo de dar una vez en el clavo
es dar cien veces en la herradura”

Miguel de Unamuno

“La posibilidad de realizar un sueño
es lo que hace que la vida sea interesante”

Paulo Coelho

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado. Un esfuerzo total
es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

Esta Tesis ha sido realizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Química “Profesor J. Carlos Vílchez Martín” de la Facultad de Ciencias Experimentales, de la Universidad de Huelva, bajo la dirección del Dr. Antonio Javier Vígara Fernández.

Cuando empiezas a escribir los agradecimientos, te das cuenta de la cantidad de gente que ha pasado por tu vida desde el momento en que decides realizar la tesis, quedándote con algo especial de cada una de ellas. Sé que no soy muy buena con las palabras, pero espero poder expresarlos de la mejor manera.

En primer lugar, quisiera empezar agradeciendo a la Universidad de Huelva por haberme permitido desarrollar los trabajos de esta Tesis Doctoral, además de haber financiado parte de ella. También quisiera agradecerle la concesión de una estancia en Chile en calidad de becaria Marie Curie, dentro del proyecto Europeo IRSES ALGAENET (PIRSES-GA-2011-295165).

Aún recuerdo el día que entré por primera vez en el laboratorio para realizar mi Tesina del Máster. Indecisa, elegí hacer el proyecto aquí por ti Javi, porque no tenía claro en que laboratorio entrar y, de entre todos los profesores, eras el que me dabas más confianza. Y para nada me equivoqué. Porque aquí estoy, escribiendo los agradecimientos de la Tesis, que no la hubiera realizado sin tu “empujoncito” y el ánimo que me diste para empezarla. ¿Y qué decirte?, cuando en realidad no tengo suficientes palabras para agradecerte todo lo que me has aportado, no solo a nivel profesional, sino a nivel personal. A nivel profesional quiero agradecerte, en primer lugar, el haberme acogido en el grupo de investigación y proporcionarme todos los medios posibles para hacer realidad el desarrollo de este trabajo, además de mi formación científica. También quisiera darte las gracias por todos los conocimientos que me has dado, por la paciencia, apoyo e inestimable dedicación y, sobre todo, por la dura labor de dirigir y corregir este trabajo, que no ha sido fácil. A nivel personal quiero decirte que no solo eres mi “jefe”, sino mi amigo y una de las mejores personas que he conocido. Siempre con una sonrisa, me has enseñado lo que es saber luchar y salir adelante en los momentos difíciles.

No solo he tenido la suerte de encontrar a un gran Director de Tesis, sino también de encontrar a unos compañeros de laboratorio que, gracias a ellos, han hecho que todo haya sido mucho más fácil. Gracias por vuestro apoyo, vuestros consejos, vuestra disposición y ayuda en el laboratorio, esos desayunos “mañaneros” y, sobre todo, por esos momentos que hemos pasado fuera del laboratorio y que hemos disfrutado. Ana, Antonio, Encarni, Gloria, Laura, Marta Vega, Marta Vila,

Patri, Rocío y Montse (te considero parte de nuestro laboratorio), sois y habéis sido mis compañeros pero, ante todo, os considero mis amigos y me llevo algo de cada uno de vosotros. Sabed que me tendréis siempre para lo que necesitéis.

También quisiera agradecer a algunos profesores que han sido muy importantes en la realización de esta Tesis. Rosa, aunque no he podido trabajar contigo, siempre has estado ahí desde el primero momento dispuesta a ayudar en todo y apoyándome en cada momento; Inés Garbayo, por ese apoyo y ayuda mostrados siempre, y por compartir alguna que otra vez a la “Cocco”, que tanta guerra nos ha dado; Inma Giráldez, por tu inestimable ayuda a la hora de la determinación de metales, aunque siempre te has mostrado dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado; Daniel Sánchez Rodas, por tu inestimable ayuda a la hora de la especialización del arsénico; y Carlos Vílchez, solo tengo palabras de gratitud hacia ti, siempre has contado conmigo y has estado dispuesto para todo lo que he necesitado, y si ya eres un gran profesor y científico, aún eres una mejor persona.

No puedo olvidarme de los compañeros del Grupo de Biotecnología de Microalgas de la Universidad de Huelva: María Cuaresma, Mari Carmen, Juanlu, Mayca, Zaida, María Vázquez, Isa y Eli, por tener siempre palabras de apoyo, disposición a ayudar y ser grandes compañeros, además de compartir a nuestra querida “Cocco”, y como no, también esos buenos partidos de fútbol.

Hacia Chile también va una parte muy especial de estos agradecimientos. A Lorena Wilson, el profesor Andrés y a Gonzalo Ruíz, por haberme enseñado, aconsejado y animado durante mi estancia. A ti Gonzalo te debo una especial gratitud, ya que me acogiste, junto con tu esposa Lorena y tu hijo Santi, desde el primer día, como si fuera una hija. Aunque nos has dejado hace poco, nunca olvidaré la alegría y todos esos momentos en los cuales siempre tenías grandes cosas que dar. Por ello, te recordaré siempre con mucho cariño. También tengo que mencionar a mis compañeros de laboratorio Paulina, Jessica, Andrés D., Rosy, Néstor, Carlos, Cecilia, Claudia, Cati y Fabio, por ser grandes compañeros y compartir buenos momentos y risas. Y como no a mi “mamá” chilena, Andrea, y mis hermanos chilenos, Camille y Andrés, por estar ahí y compartir el día a día.

Fuera del ámbito científico, quisiera agradecer a todas las personas que me han apoyado y, en especial, a mi familia, por la confianza y apoyo que siempre han depositado en mí.

Por último, y no menos importante, quería dedicarle una mención especial a mi “bicho”, la microalga *Coccomyxa onubensis*, o como yo la llamo, “Cocco”. Cuando te conocí hace 6 años, ya me advertiste de antemano que no me ibas a poner las cosas fáciles, ¡¡¡y tanto que así fue!!! Pero poco a poco, a medida que te fui conociendo, pude romper la barrera para poder extraerte las proteínas, además de descubrir que tu golosina favorita es el cobre. Sé que aún me queda mucho por conocer de ti y no sé si algún día me seguirás desvelando más secretos, pero, a pesar de todo, ¡gracias por todos los años que hemos pasado juntas!

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Las microalgas y su vida en ambientes extremófilos	3
1.1. Características generales y composición bioquímica	3
1.2. Principales factores de crecimiento	4
<i>Luz</i>	4
<i>Nutrientes</i>	4
<i>Salinidad</i>	5
<i>pH</i>	6
<i>Temperatura</i>	6
1.3. Ambientes extremos y microorganismos extremófilos	6
1.4. Ambientes ácidos y microorganismos acidófilos	8
<i>Oxidación abiótica de la piritita</i>	8
<i>Oxidación biótica de la piritita</i>	9
1.5. <i>Coccomyxa onubensis</i> y su hábitat, el río Tinto	11
1.6. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos acidófilos	14
<i>Biominería</i>	14
<i>Biorremediación</i>	14
2. Estrés oxidativo	15
2.1. Especies reactivas de oxígeno	15
2.2. Sistemas antioxidantes	18
<i>Ciclo ascorbato-glutatión</i>	19
2.2.1. <i>Catalasa</i>	20
2.2.2. <i>Ascorbato peroxidasa</i>	21
2.2.3. <i>Glutatión reductasa</i>	22

3. Metabolismo del nitrógeno inorgánico	23
3.1. Asimilación fotosintética de nitrógeno	24
3.1.1. <i>Nitrito reductasa</i>	26
3.1.2. <i>Glutamina sintetasa</i>	27
3.1.3. <i>Glutamato deshidrogenasa</i>	28
4. Objetivos de la Tesis	30
II. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Material biológico empleado y condiciones de cultivo	33
2. Consumo de diferentes fuentes nitrogenadas por <i>Coccomyxa onubensis</i>	35
3. Preparación de extractos crudos	36
3.1. Recolección de células	36
3.2. Rotura celular y preparación de extractos crudos	36
<i>Vibración en un homogeneizador Bübler</i>	36
<i>Congelación-descongelación</i>	37
<i>Sonicación</i>	37
4. Determinación de actividades enzimáticas	37
4.1. Ascorbato peroxidasa	38
4.2. Catalasa	38
4.3. Glutamato deshidrogenasa	39
4.3.1. <i>Glutamato deshidrogenasa aminante</i>	39
4.3.2. <i>Glutamato deshidrogenasa desaminante</i>	39
4.4. Glutamina sintetasa	40
4.5. Glutación reductasa	40
4.6. Nitrito reductasa	41
<i>Actividad NiR dependiente de metil viológeno</i>	41
<i>Actividad NiR dependiente de ferredoxina</i>	42
5. Determinación de parámetros cinéticos	42
5.1. Constante de Michaelis-Menten	42

	Índice
5.2. pH óptimo	43
5.3. Temperatura óptima	43
6. Purificación parcial de la ascorbato peroxidasa de <i>Coccomyxa onubensis</i>	43
6.1. Eliminación de pigmentos y nucleicos	43
6.2. Cromatografía en DEAE-Sefacel	44
7. Técnicas electroforéticas	45
7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (NATIVE-PAGE)	45
7.2. Determinación de la actividad en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	46
7.2.1. Tinción de la actividad ascorbato peroxidasa	46
7.2.2. Tinción de la actividad catalasa	47
7.2.3. Tinción de la actividad glutamato deshidrogenasa	48
7.2.4. Tinción de la actividad glutatión reductasa	48
7.2.5. Tinción de la actividad glutamina sintetasa	49
7.2.6. Tinción de la actividad nitrito reductasa	49
7.3. Determinación del peso molecular de las proteínas por NATIVE-PAGE	50
8. Determinaciones analíticas	50
8.1. Amonio	50
8.2. Clorofila	51
8.3. γ -glutamihidroxamato	51
8.4. Metales pesados y metaloide	51
8.5. Nitrato	53
8.6. Nitrito	53
8.7. Proteínas	53
9. Otras técnicas experimentales	54
9.1. Diálisis	54
9.2. Concentración de proteínas	54

10. Reactivos y aparatos	55
10.1. Reactivos	55
10.2. Aparatos	55
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Consumo de nitrógeno por células de <i>Coccomyxa onubensis</i> y estrés abiótico	59
1.1. Efecto del pH sobre el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas por <i>C. onubensis</i>	59
1.2. Efecto que produce el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas sobre el pH del medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	63
1.3. Efecto que produce diversos metales pesados sobre el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas de <i>C. onubensis</i>	68
1.3.1. Efecto del cadmio sobre el consumo de nitrato y amonio	68
1.3.2. Efecto del cobre sobre el consumo de nitrato y amonio	71
1.3.3. Efecto del mercurio sobre el consumo de nitrato y amonio	74
1.3.4. Efecto del arsénico sobre el consumo de nitrato y amonio	77
2. Caracterización de enzimas del metabolismo del nitrógeno y estrés abiótico en <i>Coccomyxa onubensis</i>	85
2.1. Caracterización de la actividad nitrato reductasa de <i>C. onubensis</i>	85
2.1.1. Propiedades cinéticas de la actividad nitrato reductasa	87
Parámetros cinéticos	87
Efecto del pH	90
Efecto de la temperatura	90
Estabilidad térmica	92
Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad NiR	93
Ensayo de actividad en gel	94
2.2. Caracterización de la actividad glutamina sintetasa de <i>C. onubensis</i>	95
2.2.1. Propiedades cinéticas de la actividad glutamina sintetasa	96
Parámetros cinéticos	96
Efecto del pH	98

<i>Efecto de la temperatura</i>	99
<i>Estabilidad térmica</i>	100
<i>Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad GS</i>	102
<i>Ensayo de actividad en gel</i>	104
2.3. Caracterización de la actividad glutamato deshidrogenasa de <i>C. onubensis</i>	105
2.3.1. <i>Propiedades cinéticas de la actividad glutamato deshidrogenasa aminante</i>	107
<i>Parámetros cinéticos</i>	107
<i>Efecto del pH</i>	109
<i>Efecto de la temperatura</i>	109
<i>Estabilidad térmica</i>	111
2.3.2. <i>Propiedades cinéticas de la actividad glutamato deshidrogenasa desaminante</i>	113
<i>Parámetros cinéticos</i>	113
<i>Efecto del pH</i>	115
<i>Efecto de la temperatura</i>	115
<i>Ensayo de actividad en gel</i>	118
2.4. Efecto del estrés abiótico sobre los niveles de actividad NiR, GS y GDH de <i>C. onubensis</i>	119
3. Caracterización de enzimas del sistema antioxidante y estrés abiótico en <i>Coccomyxa onubensis</i>	127
3.1. Caracterización de la actividad catalasa de <i>C. onubensis</i>	127
3.1.1. <i>Propiedades cinéticas de la actividad catalasa</i>	128
<i>Parámetros cinéticos</i>	128
<i>Efecto del pH</i>	130
<i>Efecto de la temperatura</i>	130
<i>Estabilidad térmica</i>	132
<i>Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad CAT</i>	133
<i>Ensayo de actividad en gel</i>	136
3.2. Caracterización de la actividad glutatión reductasa de <i>C. onubensis</i>	137
3.2.1. <i>Propiedades cinéticas de la actividad glutatión reductasa</i>	138

Índice

<i>Parámetros cinéticos</i>	138
<i>Efecto del pH</i>	140
<i>Efecto de la temperatura</i>	141
<i>Estabilidad térmica</i>	143
<i>Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad GR</i>	144
<i>Ensayo de actividad en gel</i>	147
3.3. Caracterización de la actividad ascorbato peroxidasa de <i>C. onubensis</i>	148
3.3.1. <i>Propiedades cinéticas de la actividad ascorbato peroxidasa</i>	149
<i>Parámetros cinéticos</i>	149
<i>Efecto del pH</i>	153
<i>Efecto de la temperatura</i>	153
<i>Estabilidad térmica</i>	155
<i>Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad APX</i>	157
<i>Ensayo de actividad en gel</i>	160
3.3.2. <i>Purificación parcial de la ascorbato peroxidasa</i>	160
<i>Ensayo de actividad en gel de las preparaciones obtenidas</i>	162
<i>Propiedades cinéticas de las distintas isoformas de la APX</i>	163
3.4. <i>Efecto del estrés abiótico sobre los niveles de actividad CAT, GR y APX de <i>C. onubensis</i></i>	168
4. Estrés abiótico en el crecimiento celular y capacidad acumuladora de metales y metaloides en <i>Coccomyxa onubensis</i>	177
4.1. <i>Efecto que produce diferentes metales y metaloides sobre el crecimiento de <i>C. onubensis</i></i>	178
4.2. <i>Capacidad acumuladora de <i>C. onubensis</i> sobre diferentes metales y metaloide</i>	181
IV. CONCLUSIONES	185
V. BIBLIOGRAFÍA	191
<i>Curriculum vitae</i>	229

Índice de Figuras

Figura 1.	Esquema del ciclo del hierro en ambientes ácidos	10
Figura 2.	Microalga extremófila <i>Coccomyxa onubensis</i>	12
Figura 3.	Zona minera, Tharsis (Huelva)	12
Figura 4.	Especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la reducción de oxígeno molecular (O ₂)	16
Figura 5.	Sistemas enzimáticos antioxidantes	19
Figura 6.	Papel del ciclo del glutatión en la defensa frente al estrés abiótico en organismos fotosintéticos	23
Figura 7.	Ciclo biológico del nitrógeno	24
Figura 8.	Ruta de asimilación de nitrato en microalgas	25
Figura 9.	Características estructurales de la nitrito reductasa de eucariotas	26
Figura 10.	Reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa	28
Figura 11.	Fotografía del río Tinto donde se observa su color rojo característico (A). Microalga <i>Coccomyxa onubensis</i> obtenida al microscopio óptico (60 aumentos) (B)	33
Figura 12.	Instalación utilizada para el cultivo de microalgas localizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Huelva	34
Figura 13.	Sistema de purificación utilizado (FPLC ÄKTA Purifier)	44
Figura 14.	Sistema de electroforesis (Hoefler)	46
Figura 15.	Sistema de Espectrometría de Plasma con Detector de Masa (ICP-MS)	52
Figura 16.	Uso de la diálisis para la eliminación de sales y moléculas pequeñas	54
Figura 17.	Unidad de concentración AMICON (A) y MICROCON YM-10 (B)	55
Figura 18.	Consumo de distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por células de <i>C. onubensis</i> , a pH 7	60

Índice de Figuras

Figura 19.	Consumo de distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por células de <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	61
Figura 20.	Consumo de nitrato amónico por células de <i>C. onubensis</i> , a pH 7	61
Figura 21.	Consumo de nitrato amónico por células de <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	62
Figura 22.	Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de <i>C. onubensis</i> , en células cultivadas en nitrato	64
Figura 23.	Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de <i>C. onubensis</i> , en células cultivadas en amonio	65
Figura 24.	Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de <i>C. onubensis</i> , en células cultivadas en nitrato amónico	66
Figura 25.	Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de <i>C. onubensis</i> , en células cultivadas en nitrato amónico (2,5 mM)	67
Figura 26.	Efecto del cadmio sobre el consumo de nitrato por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	69
Figura 27.	Efecto del cadmio sobre el consumo de amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	69
Figura 28.	Efecto del cadmio sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	70
Figura 29.	Efecto del cobre sobre el consumo de nitrato por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	72
Figura 30.	Efecto del cobre sobre el consumo de amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	72
Figura 31.	Efecto del cobre sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	74
Figura 32.	Efecto del mercurio sobre el consumo de nitrato por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	75
Figura 33.	Efecto del mercurio sobre el consumo de amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	75
Figura 34.	Efecto del mercurio sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	76
Figura 35.	Efecto del arsenito sobre el consumo de nitrato por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	78

Figura 36.	Efecto del arsenito sobre el consumo de amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	78
Figura 37.	Efecto del arsenito sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	79
Figura 38.	Efecto del arseniato sobre el consumo de nitrato y amonio por la microalga <i>C. onubensis</i> , a pH 2,5	80
Figura 39.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de metil viológeno (A), o ferredoxina (B)	87
Figura 40.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para metil viológeno (A), o ferredoxina (B), de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	88
Figura 41.	Representación de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la determinación del valor de Km para nitrito, de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	89
Figura 42.	Determinación del pH óptimo de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	90
Figura 43.	Determinación de la temperatura óptima (A) y energía de activación (B) de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	91
Figura 44.	Estabilidad térmica de la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	92
Figura 45.	Ensayo de actividad NiR en gel de poliacrilamida	95
Figura 46.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad GS de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de glutamina (A), hidroxilamina (B), ADP (C), o el catión divalente manganeso (D)	97
Figura 47.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para glutamina (A), hidroxilamina (B), ADP (C), o el catión divalente manganeso (D), de la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	98
Figura 48.	Determinación del pH óptimo de la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	99
Figura 49.	Determinación de la temperatura óptima (A) y energía de activación (B) de la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	100
Figura 50.	Estabilidad térmica de la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	101
Figura 51.	Ensayo de actividad GS en gel de poliacrilamida	105

Índice de Figuras

Figura 52.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de 2-oxoglutarato (A), NADH (B), o amonio (C)	107
Figura 53.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para 2-oxoglutarato (A), NADH (B), o amonio (C), de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i>	108
Figura 54.	Determinación del pH óptimo de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i>	109
Figura 55.	Determinación de la temperatura óptima de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i>	110
Figura 56.	Determinación de la energía de activación de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i>	110
Figura 57.	Estabilidad térmica de la actividad GDH aminante de <i>C. onubensis</i>	111
Figura 58.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad GDH desaminante de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de glutamato (A), o NAD ⁺ (B)	113
Figura 59.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para glutamato (A), o NAD ⁺ (B), de la actividad GDH desaminante de <i>C. onubensis</i>	114
Figura 60.	Determinación del pH óptimo de la actividad GDH desaminante de <i>C. onubensis</i>	115
Figura 61.	Determinación de la temperatura óptima de la actividad GDH desaminante de <i>C. onubensis</i>	116
Figura 62.	Determinación de la energía de activación de la actividad GDH desaminante de <i>C. onubensis</i>	116
Figura 63.	Ensayo de actividad GDH desaminante en gel de poliacrilamida	118
Figura 64.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad NiR en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	120
Figura 65.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GS en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	121
Figura 66.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GDH aminante en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	123

Figura 67.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de H ₂ O ₂	129
Figura 68.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de Km para H ₂ O ₂ de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	129
Figura 69.	Determinación del pH óptimo de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	130
Figura 70.	Determinación de la temperatura óptima de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	131
Figura 71.	Determinación de la energía de activación de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	131
Figura 72.	Estabilidad térmica de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	132
Figura 73.	Efecto del Mn ²⁺ sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad CAT de <i>C. onubensis</i> respecto a H ₂ O ₂	135
Figura 74.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del tipo de inhibición del Mn ²⁺ sobre la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	135
Figura 75.	Ensayo de actividad CAT en gel de poliacrilamida	137
Figura 76.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad GR de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de GSSG (A), o NADPH (B)	139
Figura 77.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para GSSG (A), o NADPH (B), de la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	140
Figura 78.	Determinación del pH óptimo de la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	141
Figura 79.	Determinación de la temperatura óptima de la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	142
Figura 80.	Determinación de la energía de activación de la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	142
Figura 81.	Estabilidad térmica de la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	143
Figura 82.	Efecto del Mn ²⁺ sobre la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	145
Figura 83.	Efecto del Mn ²⁺ sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad GR de <i>C. onubensis</i> respecto a GSSG	146

Índice de Figuras

Figura 84.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del tipo de inhibición del Mn^{2+} sobre la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	146
Figura 85.	Ensayo de actividad GR en gel de poliacrilamida	148
Figura 86.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de ascorbato	149
Figura 87.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_m para ascorbato de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	150
Figura 88.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de H_2O_2	151
Figura 89.	Representación de Lineweaver-Burk (A) y lineal de Hill (B) para la determinación del valor de $S_{0,5}$ y “n” para H_2O_2 de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	152
Figura 90.	Determinación del pH óptimo de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	153
Figura 91.	Determinación de la temperatura óptima de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	154
Figura 92.	Determinación de la energía de activación de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	154
Figura 93.	Estabilidad térmica de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	155
Figura 94.	Representación de Michaelis-Menten (A) y de Lineweaver-Burk (B) para la determinación del tipo de inhibición del Mn^{2+} en función de la concentración de ascorbato para la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	158
Figura 95.	Efecto del DTT sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	159
Figura 96.	Ensayo de actividad APX en gel de poliacrilamida	160
Figura 97.	Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sefacel de la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	161
Figura 98.	Ensayo de actividad APX en gel de poliacrilamida de las preparaciones APX1 y APX2 de <i>C. onubensis</i>	162
Figura 99.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de ascorbato	164

Figura 100.	Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de Km para ascorbato de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de <i>C. onubensis</i>	165
Figura 101.	Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de H ₂ O ₂	166
Figura 102.	Representación lineal de Hill para APX1 (A) y de Lineweaver-Burk para APX2 (B) de <i>C. onubensis</i> en función de la concentración de H ₂ O ₂	167
Figura 103.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad CAT en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	169
Figura 104.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GR en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	171
Figura 105.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad APX en el medio de cultivo de <i>C. onubensis</i>	172
Figura 106.	Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre el crecimiento de <i>C. onubensis</i>	178

Índice de Tablas

Tabla 1.	Valores intracelulares de pH en diferentes microalgas	11
Tabla 2.	Clasificación de la microalga <i>Coccomyxa onubensis</i>	11
Tabla 3.	Composición media del río Tinto	13
Tabla 4.	Procedimiento de preparación de los geles separador y empaquetador de la electroforesis en condiciones nativas	45
Tabla 5.	Masa seleccionada para la cuantificación de metales y metaloides, y límites de detección por ICP-MS	52
Tabla 6.	Valores de las velocidades de consumo de las distintas fuentes de nitrógeno inorgánico en <i>C. onubensis</i>	62
Tabla 7.	Caracterización de las actividades NiR en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	86
Tabla 8.	Parámetros cinéticos de las NiR de algunos organismos fotosintéticos	93
Tabla 9.	Efecto de diferentes agentes sobre la actividad NiR de <i>C. onubensis</i>	94
Tabla 10.	Caracterización de las actividades GS en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	96
Tabla 11.	Parámetros cinéticos de la actividad transferasa de las GS de algunos organismos fotosintéticos	102
Tabla 12.	Efecto de diferentes agentes sobre la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	103
Tabla 13.	Efecto de diferentes cationes divalentes sobre la actividad GS de <i>C. onubensis</i>	103
Tabla 14.	Caracterización de las actividades GDH aminantes en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	106
Tabla 15.	Caracterización de las actividades GDH desaminantes en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	106
Tabla 16.	Parámetros cinéticos de la actividad aminante de las GDH de algunos organismos fotosintéticos	112

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la actividad desaminante de las GDH de algunos organismos fotosintéticos	117
Tabla 18. Caracterización de las actividades CAT en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	128
Tabla 19. Parámetros cinéticos de las CAT de algunos organismos fotosintéticos	133
Tabla 20. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad CAT de <i>C. onubensis</i>	134
Tabla 21. Caracterización de las actividades GR en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	138
Tabla 22. Parámetros cinéticos de las GR de algunos organismos fotosintéticos	144
Tabla 23. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad GR de <i>C. onubensis</i>	145
Tabla 24. Caracterización de las actividades APX en extractos crudos de la microalga <i>C. onubensis</i>	149
Tabla 25. Parámetros cinéticos de las APX de algunos organismos fotosintéticos	156
Tabla 26. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad APX de <i>C. onubensis</i>	157
Tabla 27. Purificación parcial de la APX de <i>C. onubensis</i>	162
Tabla 28. Tabla resumen del estrés abiótico sobre distintos aspectos de la microalga extremófila <i>C. onubensis</i>	177
Tabla 29. Acumulación de metales y metaloide en el interior celular de <i>C. onubensis</i> , y factor de bioconcentración (BCF)	182

Abreviaturas

A	Amperio
AcH	Ácido acético
AcNa	Acetato sódico
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica o <i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i>
APS	Persulfato amónico
APX	Ascorbato peroxidasa
BSA	Seroalbúmina bovina
cAPX	Ascorbato peroxidasa citosólica
CAT	Catalasa
chl	Clorofila
chlAPX	Ascorbato peroxidasa cloroplástica
DEAE	Dietilaminoetil
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DTE	Ditioeritriol
DTT	Ditiotreitól
ϵ	Coefficiente de extinción
Ea	Energía de activación
EC	Extracto crudo
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido [forma oxidada]
Fd	Ferredoxina
Fd_{ox}	Ferredoxina [forma oxidada]
Fd_{red}	Ferredoxina [forma reducida]

FPLC	Cromatografía rápida de proteínas o <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GHA	Glutamilhidroxamato
GOGAT	Glutamato sintasa o glutamina oxoglutarato aminotransferasa
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación [forma reducida]
GSSG	Glutación [forma oxidada]
<i>h</i>	altura
HG	Generación de hidruros o <i>Hydride Generation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución o <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente o <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
kat	Katal
kDa	Kilo Daltons
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LED	Diodo emisor de luz o <i>Light Emitting Diode</i>
mAPX	Ascorbato peroxidasa membranal
mitAPX	Ascorbato peroxidasa mitocondrial
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
MSO	Metionina sulfoximina
MV	Metil viológeno
NAD(P)⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido(fosfato) [forma oxidada]
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido(fosfato) [forma reducida]
NBT	Nitroblue tetrazolium

Abreviaturas

NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
ϕ	Diámetro
oxo	Oxoglutarato
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PC	Fitoquelatina
phc	Peso húmedo de células
P_i	Fósforo inorgánico
PM	Peso molecular
R	Constante de los gases ideales
R_f	Movilidad electroforética
ROS	Especies reactivas de oxígeno o <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
T^a	Temperatura
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TSB	Tris-HCl 0,48 mM, pH 6,8; sacarosa al 80% (p/v); y azul de bromofenol al 40% (p/v)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
V_{máx}	Velocidad máxima
W	Vatio

I. Introducción

1. Las microalgas y su vida en ambientes extremófilos

1.1. Características generales y composición bioquímica

Las microalgas son microorganismos eucarióticos unicelulares de muy variadas formas y tamaños capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, que contienen clorofila *a* y *b*, además de otros pigmentos fotosintéticos. Entre ellas, también se incluyen a las cianobacterias (o algas verde-azuladas), que poseen estructura celular procariota y tienen solo clorofila *a*. Debido a la estructura celular sencilla de las microalgas, la acumulación de energía química después del proceso fotosintético no se desperdicia en la construcción de estructuras complejas, sino que se orienta a un uso más eficiente de formación de nuevas células (Satyanarayana et al., 2011). En este sentido, los microorganismos fotosintéticos son la base de todas las cadenas alimenticias y, por tanto, de la vida en el planeta (Hosikian et al., 2010).

Además de constituir un óptimo agente para la fijación de CO₂ atmosférico (Borowitzka, 1988), las microalgas son responsables de más del 50% de la productividad fotosintética primaria en la tierra, representando fábricas solares para un amplio rango de productos potencialmente beneficiosos (Milledge, 2011). Hasta la fecha, estos microorganismos han sido poco explorados, sobre todo los de origen marino y extremófilos, representando una oportunidad para descubrir nuevos metabolitos de interés y producirlos de forma eficiente y económica. La versatilidad del metabolismo de las microalgas las hace extremadamente interesantes. Además de ser la biomasa que representa un crecimiento más rápido, su cultivo controlado supone ventajas relativas a su capacidad de almacenamiento de CO₂, acumulación de lípidos (para la producción de biodiesel), producción de fitometabolitos (para una nueva generación de productos farmacéuticos) y fitorremediación (Guedes et al., 2011).

Las microalgas poseen estructuras sencillas, su composición consiste básicamente en carbohidratos, proteínas y lípidos, aunque también son fuente de vitaminas como la A, B₁, B₂, B₆, C y E. Según los estudios de Brown et al., (1997), sobre la composición bioquímica de 40 especies de algas cultivadas en condiciones estándar, la proteína fue el componente orgánico más importante (15-52% del peso seco), seguido de los lípidos (5-20%) y carbohidratos (5-12%). La composición bioquímica no siempre se correlaciona directamente con el valor nutricional debido a la posible deficiencia en algunos nutrientes esenciales, sin embargo, cuando los nutrientes esenciales se encuentran en proporción adecuada, la composición puede ser importante. Las vitaminas presentes en las microalgas se encuentran en mayor concentración que en los alimentos convencionales y la ingestión de cantidades relativamente pequeñas de microalgas permiten cubrir las necesidades de algunas vitaminas en la alimentación animal, incluida la nutrición humana (Fábregas y Herrero, 1990; De Roeck-Holtzhauer et al., 1991), así como niveles recomendados en dietas para peces (Sheguineau et al., 1996); de hecho, la mayoría de las vitaminas

I. Introducción

liposolubles se encuentran en las microalgas empleadas en acuicultura (Fábregas y Herrero, 1990; Brown et al., 1999).

1.2. Principales factores de crecimiento

Muchos factores contribuyen al desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas, afectando algunos de éstos a las características del crecimiento (Torrentera y Tacon, 1989). Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son: la disponibilidad y concentración de nutrientes, la luz, el pH, la salinidad y la temperatura. Los parámetros óptimos, así como los rangos tolerados, dependen de cada especie. Incluso algunas especies de microalgas presentan variaciones muy significativas de la composición celular bajo condiciones de cultivo desfavorables, llegando a acumular hasta un 80%, en peso seco, de compuestos hidrocarbonados (Hu, 2004). Además, los diversos factores pueden ser interdependientes, y un parámetro que es óptimo para un conjunto de condiciones, puede no serlo necesariamente para otro (Coutteau, 1996).

Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas y debe ser continuamente suministrada al cultivo (Molina-Grima et al., 1996). La luz puede ser natural, si bien la energía fotosintéticamente activa (radiación PAR), accesible al cloroplasto, es solo un 40% del total que le llega, correspondiente con la radiación cuya longitud de onda está comprendida entre 400-700 nm. La luz puede ser suministrada también por tubos fluorescentes, siendo los tubos LED la fuente más eficiente y económica, ya que emiten más del 98% de su luz entre 600-700 nm (Kommareddy y Anderson, 2003).

La tasa específica de crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de la luz. El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida hasta llegar a su punto máximo, en la cual, ésta disminuye con el crecimiento de la intensidad de la luz debido a procesos de fotoinhibición (Bohne y Linden, 2002). Este patrón de crecimiento, en relación con la intensidad de la luz, se observa en la mayoría de las especies de microalgas (Fábregas et al., 1998).

Nutrientes

Los principales nutrientes minerales que las microalgas toman del medio y necesitan para su desarrollo son:

- *Nitrógeno*: elemento esencial para la síntesis de todas las estructuras nitrogenadas y proteínas de las microalgas. Pueden tomarlo en forma de nitrato, nitrito, amonio e incluso urea (Kaplan et al., 1986).

- *Fósforo*: elemento principal en numerosas biomoléculas, esencial en ácidos nucleicos, lípidos de membrana e intermediarios metabólicos. Permite la movilización de la energía contenida en enlaces fosfato-fosfato de las moléculas de nucleótidos. En los entornos ácidos, sus precipitados mantienen el equilibrio de especies metálicas disueltas, afectando a la biodisponibilidad de los mismos (Gross, 2000).
- *Azufre*: elemento presente principalmente en proteínas, como parte de la estructura de los aminoácidos cisteína y metionina, en cofactores y en otras estructuras químicas implicadas en funciones de diversa naturaleza, desde la intervención redox hasta funciones antioxidantes y de resistencia a metales (Gross, 2000; Gaur y Rai, 2001).
- *Carbono*: debido a que casi el 50% de la biomasa de microalgas se compone de carbono, el aire es fundamental para el crecimiento de la microalga, puesto que contiene la fuente de carbono inorgánico necesaria para la fotosíntesis, en forma de CO₂ (0,038%) (Le Quéré et al., 2009). El carbono suministrado a un cultivo de microalgas puede proceder también de fuentes orgánicas (glucosa, fructosa, acetato, glicerol). Además, el aporte de CO₂ mediante aireación facilita la mezcla del cultivo, impide la sedimentación celular, favorece la exposición de las células a la luz y a los nutrientes, y mejora el intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire.

La carencia de alguno de estos macronutrientes puede provocar en los cultivos de microalgas una reducción en la concentración celular de los pigmentos fotosintéticos y de las proteínas celulares, dificultando así la fijación fotosintética de CO₂ (Ben-Amotz et al., 1987; Grossman, 2000; Cakmak et al., 2012).

Otros elementos también son necesarios para el cultivo de microalgas, tanto macronutrientes (K, Na, Fe, Mg, Ca), como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V, Se). Muchos de estos elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el fósforo, estos iones traza muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, se añaden al medio agentes quelatantes de metales, como el EDTA.

Salinidad

La concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica (Terlizzi y Karlander, 1980). La tolerancia a la sal varía según las especies, sin embargo, el efecto de la salinidad adquiere más influencia cuando se relaciona con otras variables. La salinidad elevada puede conllevar algunos cambios

I. Introducción

fisiológicos en las microalgas tales como la pérdida de la actividad fotosintética (Fábregas et al., 1985).

pH

Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo. En la mayoría de cultivos de microalgas, el pH se encuentra entre 7-9, con un valor óptimo entre 8,2-8,7. En la naturaleza también encontramos microalgas que han conseguido adaptarse a ambientes de pH extremos. Este es el caso de la microalga estudiada en esta Tesis, *Coccomyxa onubensis*, cuyas aguas presentan unos valores de pH muy ácidos (en torno a 2,5) y altas concentraciones de metales pesados en disolución (López-Archilla, 2005).

Por otro lado, el pH del medio influye también en la disponibilidad de la forma química en la que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. Así, a pH neutro, la principal forma de carbono disuelto es HCO_3^- , mientras que en ambientes ácidos, el carbono disponible se encuentra como CO_2 y, teniendo en cuenta su baja solubilidad en agua (10-15 μM a 18 °C), hace que las microalgas sometidas a ambientes extremófilos desarrollen mecanismos concentradores de carbono inorgánico basados en un sistema de anhidrasas carbónicas en diferentes compartimentos celulares (Moroney y Somanchi, 1999; Spalding, 2009).

Temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan al crecimiento y desarrollo de los organismos vivos, por lo que se requiere conocer un valor óptimo para una tasa máxima de crecimiento. Además, influye en la respiración y fotorrespiración de manera más marcada que la fotosíntesis y pueden causar alteraciones en muchas de las rutas metabólicas. La temperatura óptima para el cultivo de microalgas se encuentra generalmente entre los 20-24 °C, no obstante, ésta puede variar dependiendo de la especie y la cepa utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran valores de temperatura entre 16-27 °C, donde a temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que a temperaturas mayores de los 35 °C puede resultar letal para un gran número de especies (Raven y Geider, 1988; Shuler y Kargi, 2002).

1.3. Ambientes extremos y microorganismos extremófilos

Los ambientes extremos se definen como aquellos en los que una o más características fisicoquímicas se encuentran fuera de los parámetros normales, tomando valores considerados límites para la vida (Kristjánsson y Hreggvidsson, 1995). Las variables más importantes que pueden afectar a las funciones y estructuras de los componentes celulares (membranas, ácidos nucleicos y proteínas) y, por lo

tanto, las que permiten definir un ambiente como extremo son: la temperatura, el pH, la presión, la disponibilidad de oxígeno, la salinidad y la exposición a la radiación.

El estudio de los ambientes extremos, de los microorganismos que los habitan y de sus características, es muy importante desde varios puntos de vista. A nivel de ecosistema, permite conocer las interrelaciones de las distintas especies con su medio ambiente y como éstas intervienen en la geomicrobiología del lugar. Para la biología evolutiva, los microorganismos extremófilos aportan conocimientos sobre las estrategias de adaptación de las especies a distintas condiciones fisicoquímicas y permiten estudiar cómo distintas estructuras celulares y rutas metabólicas han evolucionado para asegurar la supervivencia y colonización de nichos específicos. El estudio de los ambientes extremos y los microorganismos extremófilos han tenido un gran impulso por su relación con el origen de la vida en la Tierra y, potencialmente, en otros planetas. Dichos estudios también son importantes debido a las numerosas aplicaciones biotecnológicas, tanto de las especies extremófilas aisladas, como de sus metabolitos y macromoléculas. El descubrimiento de nuevas especies extremófilas y la posibilidad de aislarlas y caracterizarlas abre también las puertas para nuevas aplicaciones biotecnológicas, con sus eventuales impactos económicos. Los microorganismos extremófilos y sus enzimas están adaptados a funcionar en condiciones particulares que muchas veces se asemejan a las necesarias para realizar determinados procesos químicos o para producirlos en condiciones más favorables.

En los ambientes extremos se han encontrado organismos pertenecientes a los tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*, aunque en la mayoría de los casos, las especies procariontas son las más diversificadas y mejor adaptadas, siendo capaces de sobrevivir en condiciones más adversas que las eucariotas (Rothschild y Mancinelli, 2001). Es común que muchos microorganismos, debido al ambiente en el cual se desarrollan, se vean afectados por más de una de estas cualidades extremófilas. Por ejemplo, los microorganismos que habitan en el fondo de los océanos deben soportar bajas temperaturas además de las altas presiones y, en algunos casos, con condiciones de hipersalinidad y falta de oxígeno. En el otro extremo, los microorganismos que viven en zonas geotermales soportan altas temperaturas y, en ciertos casos, bajos valores de pH y/o altas concentraciones de metales.

Si bien para estos microorganismos es normal vivir en ambientes extremos, su supervivencia bajo esas condiciones es el resultado de haber desarrollado diferentes estrategias para poder mantener las funciones y estructuras celulares activas. Estas estrategias les permiten no solo sobrevivir en estado latente, sino crecer y colonizar los diversos nichos. La especialización que alcanzan estos microorganismos es tan alta que a veces se vuelven extremófilos obligados, es decir, las condiciones extremas no solo son normales, sino también necesarias para su desarrollo (Morozkina et al., 2010).

1.4. Ambientes ácidos y microorganismos acidófilos

Los ambientes ácidos y los microorganismos que viven en ellos son especialmente interesantes debido a que, en general, el pH usualmente bajo de estos hábitats se debe al metabolismo de los microorganismos y no solo a las condiciones impuestas por el medio en el que se desarrollan, como puede ocurrir en otros ambientes extremos (alta o baja temperatura, alta presión o radiación) (Hallberg y Johnson, 2001; Amils et al., 2007).

Los ambientes ácidos naturales poseen dos orígenes (Johnson y Hallberg, 2003). En el primero, asociado a la actividad volcánica, la acidez se debe a la oxidación microbiana del azufre elemental producto de la reacción de condensación de los gases oxidados y reducidos producidos por la actividad volcánica:



En el segundo caso, el origen de los ambientes ácidos se relaciona con la oxidación de sulfuros metálicos. Estos sulfuros son estables e insolubles bajo las condiciones reductoras que existen en el subsuelo, pero su exposición a condiciones atmosféricas desestabiliza su estructura mediante reacciones de oxidación. El agente oxidante para que se produzca este proceso puede ser el oxígeno (O₂) o el catión férrico (Fe³⁺). Entre los sulfuros metálicos, la pirita (FeS₂) es el más común en la naturaleza, encontrándose en formaciones hidrotermales, rocas ígneas y depósitos sedimentarios. Dependiendo de la ausencia o presencia de microorganismos en el medio ambiente ácido, se habla de dos vías de oxidación de la pirita, abiótica o biótica, respectivamente (Johnson, 2010).

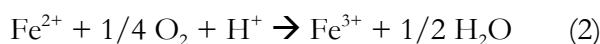
Oxidación abiótica de la pirita

En contacto con la atmósfera y en presencia de agua se produce la oxidación directa de la pirita, según se indica en la reacción 1. En este proceso se liberan protones, produciendo acidez, además de sulfato y Fe²⁺, junto con otros elementos accesorios (As, Cd, Co, Ni, Pb, etc.) que, en mayor o menor proporción, forman parte de la pirita.

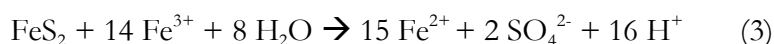


La disponibilidad de oxígeno es, por tanto, el factor limitante de este proceso, especialmente en el agua, donde la concentración de oxígeno ronda los 8-13 mg·L⁻¹, en comparación con los 290 mg·L⁻¹ del aire, por lo que la oxidación de la pirita en medio acuoso es más lenta que en contacto con la atmósfera (Ritchie, 1994).

El Fe^{2+} liberado en la reacción 1, en presencia de oxígeno, se oxida a Fe^{3+} consumiendo un protón, según la reacción:

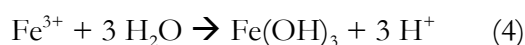


Por otro lado, y como se indicó anteriormente, la oxidación de la pirita también puede ser realizada por la presencia de hierro férrico, según la reacción 3. El Fe^{3+} tiene la capacidad de oxidar la pirita, aproximadamente entre 20 y 200 veces más rápidamente que el oxígeno atmosférico (Nordstrom, 2011).



En esta reacción se producen 16 protones por cada mol de pirita oxidado, sin embargo, se necesitan 14 moles de Fe^{3+} que, a su vez, consumen 14 protones según la reacción 2. Por tanto, el balance final de producción de acidez de las reacciones 1 y 3 es el mismo: se liberan dos protones por cada mol de pirita oxidado.

La reacción 3 va a depender de la disponibilidad de Fe^{3+} disuelto en el agua que, a su vez, está controlada por el pH de la disolución. Así, a pH próximo a 3, el ion Fe^{3+} precipita en forma de hidróxido férrico, generando a su vez más acidez (reacción 4):



La reacción 3 implica la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , por tanto, para que se pueda producir, debe existir una reoxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , según la reacción 2. Pero este proceso (que controla la disponibilidad de Fe^{3+}) es extremadamente lento, convirtiéndose en el proceso limitante en la oxidación abiótica de la pirita, e indicando la necesidad de la participación directa de microorganismos en el proceso, lo que justificaría la presencia constante de Fe^{3+} en el medio y la acidez que se detecta en estos ambientes (Nordstrom, 2011).

Oxidación biótica de la pirita

La presencia de bacterias óxido-reductoras de hierro y azufre, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, subrayan la existencia de un ciclo operativo del hierro (Figura 1) en ambientes ácidos. Así, la actividad de los procariotas oxidadores de Fe^{2+} es la responsable de las importantes concentraciones de Fe^{3+} presentes en el río. Bacterias como *Acidithiobacillus ferrooxidans* pueden acelerar hasta 100000 veces este proceso (Nordstrom y Alpers, 1999). De esta forma, al aumentar la concentración de Fe^{3+} se produce un incremento de la oxidación indirecta de la pirita (reacción 3), que genera más Fe^{2+} , que de nuevo se oxida a Fe^{3+} , de forma que estas reacciones se retroalimentan en un ciclo sin fin, manteniendo constante el pH ácido del río (González-Toril et al., 2003).

I. Introducción

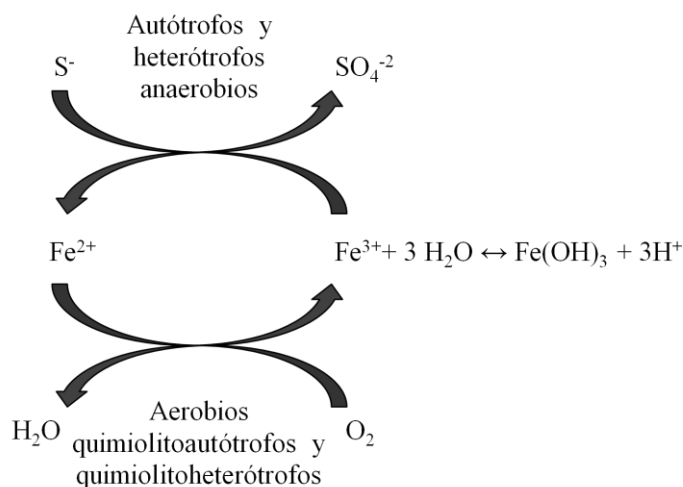


Figura 1. Esquema del ciclo del hierro en ambientes ácidos. Muestra las reacciones catalizadas por microorganismos más comunes en ambientes ácidos.

Por otro lado, el Fe^{3+} , mediante el proceso de oxidación, permite la solubilización de cationes metálicos que, a su vez, facilitan la formación de distintos minerales como la jarosita, goetita, entre otros, considerados de interés como posibles biomarcadores de actividad quimiolitotrófica en misiones astrobiológicas (Fernández-Remolar et al., 2004).

Los microorganismos acidófilos que forman parte de estos ecosistemas poseen estrategias de supervivencia que les permiten vivir en estos ambientes tan ácidos. En la mayoría de los casos, estas estrategias consisten en mantener el pH intracelular cerca de la neutralidad (Beardall y Entwisle, 1984), como se muestra en la Tabla 1. Se han descrito diferentes mecanismos para compensar los efectos de este gradiente de pH. Así, se han detectado microorganismos acidófilos que poseen membranas celulares más impermeables a los H^+ que las de los microorganismos neutrófilos (con crecimiento óptimo en niveles de pH neutros); se han identificado genes codificantes de transportadores secundarios que bombean H^+ hacia fuera de la célula, o bien de transportadores de potasio hacia el exterior para contrarrestar la entrada de protones; se ha indicado la presencia de mecanismos tamponadores (acetato, lactato, fosfato) que neutralizan los protones; y, por último, también se han detectado en microorganismos acidófilos un gran número de genes implicados en la reparación de ADN y proteínas que pueden dañarse por los bajos valores de pH. Por otro lado, también se ha sugerido que el potencial positivo de la cara interna de la membrana de los acidófilos los hace resistentes a altas concentraciones de cationes metálicos tóxicos que suele haber en los ambientes en los cuales se desarrollan (Baker y Dopson, 2007).

La siguiente tabla muestra el pH intracelular medido en diferentes microalgas, expuestas a pH ácidos (Forján et al., 2014):

Tabla 1. Valores intracelulares de pH en diferentes microalgas.

Microorganismos	pH del medio	pH del citosol
<i>Cyanidium caldarium</i>	2,1	6,6
<i>Chlorella saccharophila</i>	4,0	7,1
<i>Chlorella vulgaris</i> Beij	5,3	6,6
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> Chick	3,1	6,6-7,4
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	3,1	6,8-7,0
<i>Euglena mutabilis</i> Schmitz	2,8	5,0-6,4
<i>Dunaliella acidophila</i>	0,5-3,0	6,2-7,2

1.5. *Coccomyxa onubensis* y su hábitat, el río Tinto

El río Tinto, en Huelva (España), es uno de los ecosistemas de ambientes ácidos más estudiado y ha servido como fuente de microalgas, *Coccomyxa onubensis*, para la realización de esta Tesis.

Coccomyxa onubensis pertenece al orden *Chlorococcales* (Tabla 2). La estructura fundamental de las células de las algas *Chlorococcales* es relativamente uniforme. Su condición unicelular se mantiene durante todo su ciclo de vida, es decir, sin manifestar complejidades morfológicas que correspondan con otro nivel de organización.

Tabla 2. Clasificación de la microalga *Coccomyxa onubensis*.

Clasificación	
Dominio:	<i>Eukaryota</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Chlorophyta</i>
Clase:	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden:	<i>Chlorococcales</i>
Familia:	<i>Coccomyxaceae</i>
Género:	<i>Coccomyxa</i>

Coccomyxa onubensis (Figura 2) habita a escasos centímetros por debajo de la superficie del agua ácida del río Tinto. Por tanto, la microalga se encuentra sometida tanto a la presencia de especies metálicas oxidantes, como a elevados valores de irradiación PAR y UV procedentes del sol. Su crecimiento se desarrolla en condiciones limitantes de carbono reducido, propio de un cauce fluido con escaso

I. Introducción

aporte de materia orgánica. Además, el CO_2 tiene baja solubilidad a pH ácido, lo que obliga a la microalga a habitar en localizaciones próximas a la superficie del agua para poder tener mayor disponibilidad de CO_2 . Desde estas perspectivas, es esperable que *Coccomyxa onubensis* exprese mecanismos de respuesta ante tales condiciones de estrés.

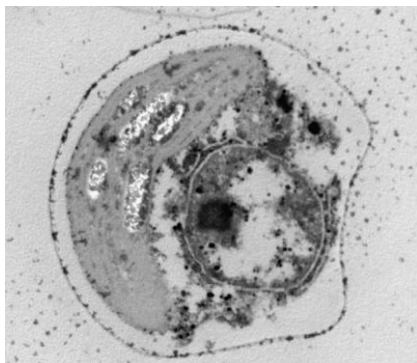


Figura 2. Microalga extremófila *Coccomyxa onubensis*. Fotografía obtenida al microscopio óptico (30000 aumentos).

El río Tinto, perteneciente a la cuenca del Guadiana, nace en la sierra de Padre Caro y, tras 100 km de recorrido, llega hasta la ría de Huelva, donde se funde con el río Odiel. Próximo a su nacimiento se sitúa el mayor yacimiento minero de piritita (Figura 3) a cielo abierto de Europa (Corta Atalaya), que viene siendo explotado desde la época romana.

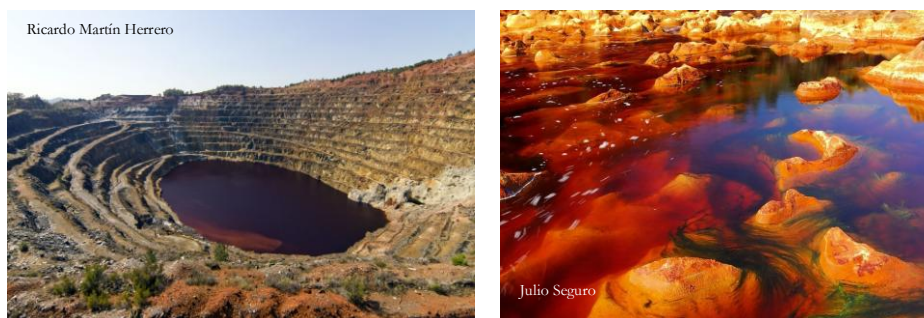


Figura 3. Zona minera, Tharsis (Huelva).

Las aguas del río Tinto tienen un pH muy ácido, en torno a 2,5, y un alto contenido en sales ferruginosas que le confieren una gama de colores rojizos y le dan un aspecto único (Figura 3). Posee un alto contenido en metales pesados (Cu, Zn, Cr, Cd, Mn, As, etc.) y concentraciones de Fe^{3+} que pueden llegar incluso a valores tan altos como $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, además de escasez de oxígeno, lo que en principio son

condiciones inadecuadas para el desarrollo de la vida (López-Archilla et al., 1993). A pesar de esto, el río Tinto es un río vivo. Las condiciones extremas del río son esencialmente debidas a la actividad de los microorganismos acidófilos más que, como se creía con anterioridad, a la intensa actividad minera de la zona; de hecho, algunos estudios realizados demuestran que las condiciones de acidez son previas a cualquier actividad minera realizada por el hombre (González-Toril et al., 2003).

La biodiversidad de este peculiar sistema, compuesta principalmente por especies acidófilas relacionadas con el metabolismo del hierro y su relación con las características fisicoquímicas extremas que presenta, han sido reportadas en numerosos trabajos (González-Toril et al., 2003; Aguilera et al., 2007; Amaral-Zettler et al., 2011). Tales organismos son tanto procariontes, que contienen un singular ecosistema basado en el ciclo del hierro; como eucariotas, incluyéndose, entre los segundos, algunas especies de hongos y algas endémicas del río; si bien, más del 80% de los microorganismos que viven en él pertenecen al dominio *Bacteria*.

Las condiciones del río Tinto son generadas por la actividad metabólica de microorganismos quimiolitotróficos que viven de los ricos complejos de sulfatos de la Faja Pirítica Ibérica (Leistel et al., 1998). A su vez, las reacciones químicas y procesos microbiológicos (anteriormente indicados) actúan sobre la pirita y otros sulfatos como galena, calcopirita, etc., generando un lixiviado muy contaminante caracterizado por una alta acidez y elevadas concentraciones de sulfatos (SO_4^{2-}), metales y metaloides, como pueden ser Fe, Cu, Zn, Pb, Cd, Mn, As, etc. Estos lixiviados son incorporados a la red fluvial afectando a la calidad de las aguas y generando estrés abiótico en los ecosistemas próximos.

La composición química media del agua del río Tinto se presenta en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Composición media del río Tinto.

Elemento	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Elemento	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
SO_4^{2-}	1450	As	160
Al	79	Cd	118
Cu	19	Co	564
Fe	151	Cr	16
Mn	8	Ni	170
Zn	26	Pb	130

La tabla muestra las concentraciones medias de la composición del río Tinto (Ollas et al., 2010).

1.6. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos acidófilos

Las aplicaciones biotecnológicas más desarrolladas de los microorganismos acidófilos están relacionadas con el procesamiento de minerales con intervención microbiana (biominería) y la biorremediación de ambientes contaminados con metales. Estos procesos mediados por microorganismos se consideran “tecnologías limpias”, ya que tienen menores requerimientos energéticos, menores costes y, fundamentalmente, menor impacto ambiental que los procesos no biológicos tradicionales.

Biominería

En la actualidad, existen operaciones biomineras a escala comercial que permiten recuperar ciertos metales. Este bioproceso se basa en la capacidad de ciertos microorganismos acidófilos de producir Fe^{3+} y H_2SO_4 , que crean las condiciones para la oxidación y disolución de sulfuros metálicos y otros minerales (Johnson, 2010). En los casos en los que el metal que se intenta recuperar se solubiliza a través de la acción microbiana, el proceso se conoce como biolixiviación. Algunos ejemplos son la acción de microorganismos azufre-oxidantes para la recuperación de metales como Cr, Ni, Pb, Cu y Zn a partir de barros de digestores anaeróbicos de plantas de tratamiento de residuos municipales, o de las cenizas de incineración de residuos (Viera y Donati, 2004). Por otro lado, si el metal de interés se mantiene en fase sólida, pero la acción de los microorganismos lo hace más accesible al ataque por otros agentes lixiviantes, el proceso recibe el nombre de biooxidación.

Biorremediación

A diferencia de lo que ocurre con los contaminantes orgánicos, que pueden ser degradados completamente desde el punto de vista químico, los metales pesados no pueden ser destruidos y solo es posible utilizar procesos a través de los cuales se modifique su movilidad o su toxicidad cambiando de especie química o de estado de oxidación. Los microorganismos, y en particular los extremófilos, son una herramienta muy importante para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, ya que son capaces de solubilizar metales por lixiviación ácida o por complejación, inmovilizarlos por acumulación, o precipitarlos a través de la producción de metabolitos que pueden reaccionar con los metales para dar compuestos insolubles (Urbieta et al., 2011).

La bioprecipitación es uno de los ejemplos del uso de microorganismos acidófilos en la biorremediación. Es una estrategia que ha probado ser exitosa para remover metales pesados desde efluentes líquidos (Urbieta et al., 2011). Una de las variantes de este bioproceso es la precipitación de metales con SH_2 producido por bacterias sulfato-reductoras como producto final de su metabolismo. El anión sulfuro es un agente sumamente útil para la precipitación de metales pesados debido al bajo valor del producto de solubilidad que poseen los sulfuros metálicos. De esta

manera, los metales en solución son inmovilizados en precipitados estables que pueden ser más fácilmente removidos.

Por último, dentro de las alternativas de la biorremediación, algunas especies de microorganismos acidófilos son capaces de reducir especies metálicas cuyos metales se presentan en altos estados de oxidación, que son usualmente más tóxicos, y hacerlos biodisponibles como especies reducidas que suelen ser menos tóxicas (Quintana et al., 2001).

2. Estrés oxidativo

2.1. Especies reactivas de oxígeno

Las condiciones ambientales extremas hacen que los distintos organismos que habitan en estos ambientes se encuentren sometidos a condiciones de estrés abiótico que pueden desencadenar procesos internos agresivos, como es el caso del estrés oxidativo. La necesidad que tienen los organismos por el oxígeno eclipsa el hecho de que pueda ser un gas tóxico y mutagénico; más aún, estos mismos organismos sobreviven ya que han desarrollado mecanismos antioxidantes muy eficientes (Halliwell, 2006).

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). Es un estrés de tipo bioquímico, derivado de la propia acción del metabolismo (Mano, 2002).

El funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico puede sufrir alteraciones como consecuencia de las condiciones ambientales o del estado de desarrollo, originándose especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species). Las ROS son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991) y su formación es un proceso normal, inevitable y constante en organismos que poseen un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002). Cualquier alteración de las condiciones óptimas de cultivo incide de forma negativa en la fisiología del organismo y puede llegar a generar la producción de estrés oxidativo, con la consecuente generación de ROS (Halliwell, 1987).

A pesar del papel fisiológico que puedan desempeñar algunas ROS, como el crecimiento y el ciclo celular, la muerte celular programada, la respuesta a estrés abiótico y la defensa frente a patógenos (Mittler et al., 2004; Foyer y Noctor, 2005; Fujita et al., 2006), las ROS también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, provocando daños en diversos componentes celulares tales como lípidos (Moran et al., 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2002), proteínas (Berlett y Stadtman,

I. Introducción

1997), ácidos nucleicos (Sies, 1993), carbohidratos, ADN y otras macromoléculas (Hariyadi y Parkin, 1993; O’Kane et al., 1996).

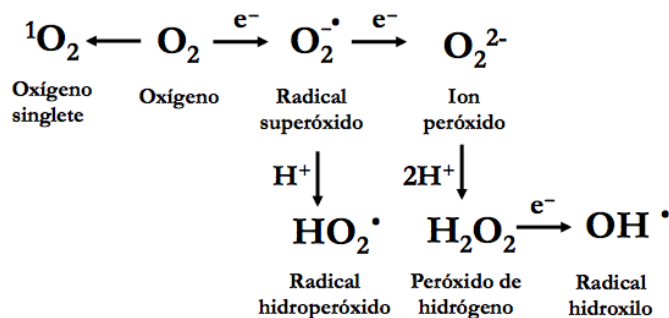


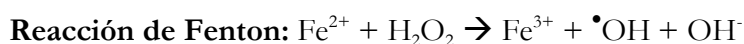
Figura 4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la reducción de oxígeno molecular (O₂) (Imlay, 2008; Gill y Tuteja, 2010).

Existen numerosas ROS (Figura 4), entre las que podemos encontrar radicales libres, como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Edreva, 2005); o formas no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (${}^1\text{O}_2$) (Brivida et al., 1997).

Las ROS son continuamente producidas en plantas y microalgas por distintas rutas metabólicas (como la fotosíntesis o la respiración) con distinta localización subcelular, siendo los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas, los orgánulos donde se genera la mayor producción de ROS (Shahid et al., 2014). Mientras que bajo condiciones normales de crecimiento la producción de ROS en la célula es baja ($240 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $0,5 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ de H_2O_2), bajo condiciones de estrés los valores se incrementan notablemente ($720 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $5-15 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ de H_2O_2). Cuando la intensidad lumínica es alta, el aparato fotosintético absorbe más energía lumínica que la que suele utilizarse en reacciones metabólicas normales. Como consecuencia, la cadena fotosintética de transporte electrónico transfiere los electrones al oxígeno, produciendo como producto final el H_2O_2 . El exceso de H_2O_2 fomenta la formación de radicales OH^{\bullet} , oxidantes fuertes de ácidos orgánicos que pueden iniciar la formación en cadena de nuevos radicales altamente tóxicos para las células. Adicionalmente, la inhibición de la cadena fotosintética de transporte electrónico también puede favorecer la transferencia de energía desde la clorofila excitada por la luz hacia el oxígeno, formándose el ${}^1\text{O}_2$, el cual es altamente tóxico para las células debido a su reactividad. Por su parte, en la cadena mitocondrial, los principales generadores de ROS son el complejo I y el complejo III, indicándose que el 2% del O_2 consumido en la cadena se utiliza para la producción de H_2O_2 (Mittler, 2002).

La especie más reactiva de estas ROS es el radical OH^{\bullet} , un poderoso oxidante que puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984). Por su

parte, el anión $\cdot\text{O}_2^-$ inactiva ciertas enzimas con centros de hierro-azufre debido a su tolerancia a ser electrostáticamente atraído al átomo de hierro de estos centros catalíticos (Flint et al., 1993). El H_2O_2 , aunque es menos reactivo que el $\cdot\text{O}_2^-$ y el $\text{OH}\cdot$, desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media (Hung et al., 2005). Esta especie puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilos (Stadtman y Levine, 2003) y, al igual que el $\cdot\text{O}_2^-$, puede provocar cambios irreversibles oxidando directamente enzimas con grupos hierro-azufre, destruyendo la función enzimática (Gardner y Fridovich, 1991; Flint et al., 1993). El H_2O_2 participa en la degradación oxidativa de proteínas, especialmente con la presencia de cofactores metálicos, tales como el hierro. En estos casos, el metal reacciona con el H_2O_2 a través de la reacción de Fenton para formar un radical $\text{OH}\cdot$ (Elstner et al., 1988), que rápidamente oxida un residuo aminoacídico, ya sea en el mismo sitio de unión al catión o en una región cercana al mismo.



Además de la reacción de Fenton, la generación de $\text{OH}\cdot$ puede también producirse en los organismos por la reacción de Haber-Weiss, en la cual, en presencia de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , se generan más $\text{OH}\cdot$.



La exposición a metales pesados también provocan un incremento en los niveles de ROS (Dietz et al., 1999). Este proceso está bien estudiado en plantas y parece ser una de las respuestas más rápidas derivadas del estrés metálico (Opdenakker et al., 2012).

Se definen como metales pesados aquellos elementos de transición de la tabla periódica que presentan una densidad igual o superior a $5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y sean tóxicos incluso en concentraciones muy bajas. Ciertos metales pesados, tales como el B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe, Se o Zn, son denominados oligoelementos, ya que sirven como micronutrientes para los cultivos pero, a partir de una cierta concentración, se vuelven tóxicos. También hay metales pesados sin función biológica conocida que resultan altamente tóxicos, entre los que se encuentran el Cd, Hg, Pb, Sb, Bi, Sn o Tl (García y Dorronsoro, 2005). La toxicidad de los metales pesados depende de la concentración, de la forma química y de la persistencia, es decir, del tiempo que tarda un metal tóxico en transformarse en una forma no tóxica. No obstante, la producción de ROS generada por efecto de los metales pesados depende de su actividad redox, así, el Cu y el Fe actúan principalmente mediante la reacción de Fenton/Haber-Weiss generando radicales $\text{OH}\cdot$. Por su parte, el resto de metales pesados, tales como Pb, Cd, Hg, Ni, Zn, o el metaloide As, interaccionan

I. Introducción

directamente con los grupos tiólicos de las proteínas. Este proceso desestabiliza los mecanismos de protección de las plantas e incrementa notablemente los niveles de ROS, así se ha indicado en diferentes plantas la producción de OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , por estrés metálico provocado por Al, As, Cd o Mn (Shahid et al., 2014). Adicionalmente, el Pb puede inactivar enzimas por interacción con los grupos carboxilos (Gupta et al., 2010); el Cu posee también una gran afinidad por ligandos con azufre o nitrógeno, además de reducir el glutatión; el Cd puede inducir la deficiencia de nutrientes esenciales y disminuir la concentración de muchos macronutrientes (Siedleska, 1995); y el Hg, siendo el elemento metálico con mayor afinidad por los grupos tiólicos, actúa inhibiendo masivamente la actividad enzimática (Azevedo y Rodriguez, 2012).

Una vez han entrado los metales en la célula, empiezan a funcionar los mecanismos de tolerancia frente a las ROS y también los que permiten soportar altas concentraciones de metal y facilitar el almacenamiento de los iones tóxicos en lugares no perjudiciales para las células. El incremento en la capacidad de eliminación de estas ROS se considera como síntoma de tolerancia, mientras que la ausencia de respuesta o una disminución respecto de los valores control se considera síntoma de sensibilidad (Hernández et al., 1995; 2000). Contra las ROS, los organismos han tenido que desarrollar distintos sistemas antioxidantes de defensa (Slater, 1984; Halliwell, 1999; Mittler, 2002; Shahid et al., 2014).

2.2. Sistemas antioxidantes

Se puede definir antioxidante como cualquier sustancia que, en bajas concentraciones comparadas con la del sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato (Halliwell et al., 1995).

Las ROS producidas en las células por distintos procesos son eliminadas por diversos sistemas antioxidantes que se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos, aunque, en muchos casos, ambos tipos de antioxidantes funcionan en forma coordinada (Foyer et al., 1994; Perl-Treves y Perl, 2002).

- *Antioxidantes no enzimáticos*: en este grupo pueden distinguirse los antioxidantes hidrosolubles y los liposolubles. Entre los primeros (importantes en el citoplasma, estroma cloroplástico, etc.) destacan el ácido ascórbico y el glutatión (Foyer et al., 1994). Entre los antioxidantes liposolubles (presentes en membranas) se encuentran los carotenoides (carotenos y xantofilas) (Young, 1991) y el α -tocoferol (Munné-Bosch y Alegre, 2002).
- *Antioxidantes enzimáticos*: en este grupo (Figura 5) se encuentran diversas enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), que elimina el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$ generando H_2O_2 (Casano et al., 1997); o la catalasa (CAT) que, junto con la glutatión peroxidasa (GPX) y el denominado ciclo ascorbato-glutatión, se

encarga de la eliminación de la mayoría de H_2O_2 producido (Asada, 1997; Arora et al., 2002; Mittler, 2002; Tausz et al., 2004; Gill y Tuteja, 2010).

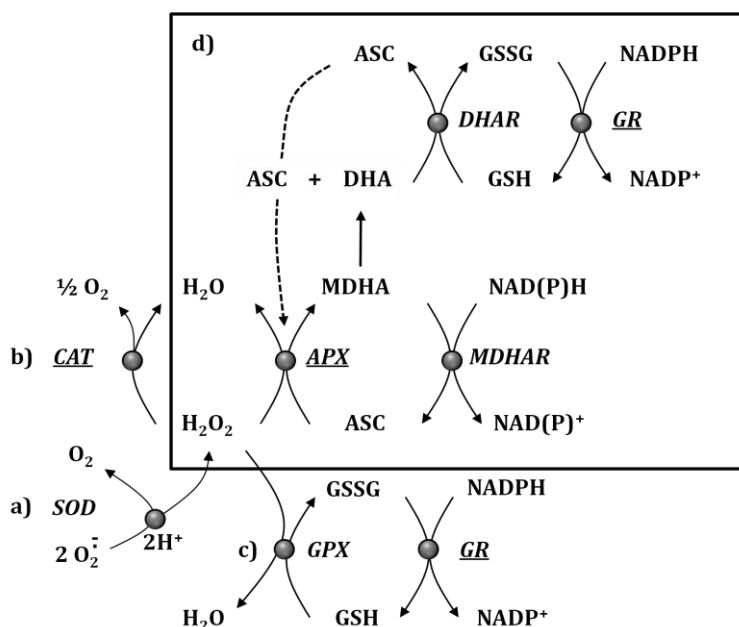


Figura 5. Sistemas enzimáticos antioxidantes. El anión O_2^- formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (a). El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT) (b); en presencia de glutatión reducido (GSH) por la glutatión peroxidasa (GPX) (c); por el ciclo ascorbato-glutación mediante la ascorbato peroxidasa (APX) (d). En los dos últimos casos, el GSH se genera vía glutatión reductasa (GR).

Ciclo ascorbato-glutación

Los organismos sometidos a estrés oxidativo han desarrollado eficientes sistemas enzimáticos (Figura 5) para eliminar el exceso de H_2O_2 , y así prevenir los daños oxidativos. Uno de ellos es el denominado ciclo ascorbato-glutación o de Halliwell-Asada (Figura 5d). Este ciclo es considerado el principal sistema de defensa para la efectiva desactivación de las ROS en múltiples reacciones de óxido-reducción, protegiendo al organismo de los posibles daños oxidativos (Asada, 1997). En el ciclo participa la ascorbato peroxidasa (APX), la cual requiere de ascorbato para reducir el H_2O_2 a H_2O en distintos orgánulos celulares, con la producción de monodehidroascorbato (MDHA). Éste puede ser reducido a ascorbato de nuevo por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), que requiere NADH, o bien puede descomponerse espontáneamente a ascorbato y dehidroascorbato (DHA). A continuación, la dehidroascorbato reductasa (DHAR) regenera el ascorbato a partir de DHA utilizando glutatión reducido (GSH) como reductor. El ciclo se completa

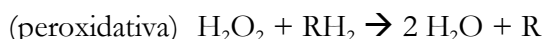
I. Introducción

con la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH mediante la actividad glutatión reductasa (GR) utilizando NAD(P)H.

A continuación, se describen las enzimas del sistema antioxidante que han sido objeto de estudio en la presente Tesis: la catalasa, la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa (subrayadas en la Figura 5).

2.2.1. Catalasa

La catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) es una hemoproteína tetramérica (con pesos moleculares de, aproximadamente, 220 kDa) encargada de detoxificar el H₂O₂ sin necesidad de ningún cofactor como fuente de electrones. Esta ventaja energética frente a otras peroxidases es contrarrestada por la baja afinidad de la enzima por el H₂O₂ (Arora et al., 2002). Algunas catalasas son capaces de realizar también la degradación peroxidativa del H₂O₂, precisando para ello de un agente reductor, normalmente un donador orgánico de electrones o, a veces, un ion haluro.



Adicionalmente, se han identificado pseudocatalasas sin grupo hemo (MnCAT), denominadas así porque son resistentes a los inhibidores comunes para las catalasas, tales como la azida y el cianuro (Mataix-Verdú et al., 2001).

Evidencias cinéticas y espectrofotométricas sugieren que la reacción catalizada por la catalasa se produce en dos etapas a altas concentraciones de H₂O₂. Así, en primer lugar, el hierro hemínico interactúa con H₂O₂ para formar un intermediario peróxido del tipo CAT-Fe-OOH que, a su vez, interacciona con una segunda molécula de H₂O₂ produciendo agua y oxígeno (Mallick y Mohn, 2000).

Al ser la CAT activa solo a altas concentraciones de H₂O₂, en plantas se localiza principalmente en los peroxisomas y glioxisomas, donde existen distintas isoformas de la enzima (Kuk et al., 2003; Singh et al., 2010). Es especialmente abundante en los peroxisomas, donde tiene lugar parte de la fotorrespiración, que acumula H₂O₂ durante la conversión de glicolato a glioxilato (Feierabend, 2005; Engel et al., 2006; Vuleta et al., 2010). De esta forma, la CAT evita que el H₂O₂ difunda hacia el citoplasma y pueda reaccionar con otras biomoléculas. Se han encontrado también isoformas en el citosol y en las mitocondrias, pero su presencia no ha podido ser constatada en los cloroplastos (Perl-Treves y Perl, 2002). En microalgas, los datos son mucho más escasos, habiéndose detectado en *Chlamydomonas reinhardtii* dos isoformas de localización mitocondrial (Kato et al., 1997).

Respecto al estrés abiótico en algas, se ha indicado el aumento de los niveles de actividad de la CAT por efecto de la temperatura, la exposición a cobre, la luz ultravioleta (Mataix-Verdú et al., 2001) y el estrés salino (Vega et al., 2006).

2.2.2. Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) es una hemoproteína que está codificada por múltiples familias génicas, dando lugar a diferentes isoformas, las cuales se clasifican en función de su localización celular. Se han encontrado isoformas solubles en el citosol y la mitocondria, y asociadas a membranas en peroxisomas, glioxisomas y en tilacoides de cloroplastos (Arora et al., 2002; Shigeoka et al., 2002). Dichas isoformas poseen diferencias moleculares y cinéticas, así, se ha descrito que las isoformas membranales y las cloroplásticas poseen un mayor peso molecular respecto a la citosólica debido a que poseen en el extremo N-terminal un péptido señal (tránsito) y/o una extensión C-terminal de una región de inserción en la membrana (Chen y Asada, 1989).

La APX posee una alta afinidad por el ascorbato, que lo utiliza como donador de electrones para reducir el H_2O_2 hasta H_2O y O_2 , con la generación concomitante de monodehidroascorbato (MDHA), participando directamente en el ciclo del ascorbato-glutación (Shigeoka et al., 2002), tal y como se ha indicado anteriormente (Figura 5).

Una de las propiedades más características de la APX es su inestabilidad en ausencia de ascorbato. En condiciones donde la concentración de ascorbato es inferior a 20 μM , la actividad APX se pierde rápidamente. Los tiempos de inactivación media de la APX cloroplástica y mitocondrial son menores de 30 segundos, mientras que los de la citosólica y la membranal son alrededor de 1 hora o más, lo que dificulta su estudio y purificación (Chen y Asada, 1989; De Leonadis et al., 2000).

Las APX de cianobacterias y algas eucarióticas, aunque poseen similitudes antigénicas con las enzimas de plantas, presentan aspectos diferentes en cuanto a la afinidad por los sustratos, isoformas, estabilidad y localización. Así, *Euglena gracilis* posee una sola isoforma citosólica de APX (Shigeoka et al., 1980a), mientras que en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* se han identificado también una isoforma, pero de localización cloroplástica (Mallick y Mohn, 2000). En cuanto al estrés abiótico, los datos en microalgas son más escasos, así, la presencia de Cu en el medio de cultivo inactiva la enzima de *Anabaena doliolum* (Mallick y Rai, 1999), mientras que la luz UV-B no afecta a los niveles de actividad de la APX de *Chlorella* (Malanga et al., 1997).

2.2.3. Glutación reductasa

La glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) es un miembro de las flavoenzimas de las piridín nucleótido disulfuro oxidoreductasa que, estructuralmente, contiene dos subunidades, cada una con un flavín adenín dinucleótido (FAD) como grupo prostético. La enzima es dependiente de NADPH, que reduce el FAD, el cual cede sus electrones a un puente disulfuro entre dos cisteínas (Cys58 y Cys63) de la proteína. Los dos grupos tiólicos reducidos interaccionan entonces con el glutatión oxidado (GSSG) y lo reducen a dos moléculas de GSH, volviéndose a formar el puente disulfuro entre las cisteínas de la proteína (Becker et al., 1995).

La GR actúa como un potente sistema antioxidante y, debido a esto, ha sido purificada de un gran número de animales, plantas y fuentes microbianas, y estudiada desde 1935 (Becker et al., 1995). Se ha detectado y purificado en una gran variedad de tejidos vegetales como acículas de pino (Wingsle, 1989), plántulas y raíces de guisante (Madamanchi et al., 1992). En plantas, se han identificado dos genes que codifican para la GR. El gen *GR1* codifica para las GR localizadas en el citosol y en el peroxisoma, mientras que el gen *GR2* codifica para las que poseen localización cloroplástica y mitocondrial (Díaz-Vivancos et al., 2015). En algas se ha llegado a identificar una o dos isoformas de la GR dependiendo del organismo estudiado, así, en *Phaeodactylum tricornutum* (Arias et al., 2010) se ha identificado solo una isoforma; no obstante, en *Chlamydomonas reinhardtii* (Serrano y Llobell, 1993) y *Engelena gracilis* (Shigeoka et al., 1987) se han identificado dos.

La enzima juega un papel crucial en el mantenimiento de una elevada relación intracelular de glutatión reducido/oxidado, [GSH]/[GSSG]. La presencia de altos niveles de GSH es importante para la maquinaria antioxidante de la célula. El glutatión es uno de los compuestos tiólicos más abundante en la célula, llegando a alcanzar concentraciones entre 1-10 mM, con una relación [GSH]/[GSSG] de 30:1 a 100:1 (Couto et al., 2016).

El glutatión reducido es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina (γ -glutamil-cisteinil-glicina). La fuerte naturaleza nucleofílica de la cisteína hace que el glutatión sea un potente agente reductor, así, el GSH producido por la GR, actúa protegiendo los grupos tiólicos de enzimas (Figura 6) aportando electrones para la eliminación enzimática del H_2O_2 directa (vía glutatión peroxidasa) o indirectamente (ciclo ascorbato-glutatión), y como antioxidante, descomponiendo con el 1O_2 y los radicales OH^\bullet . El GSH permite también mantener los niveles suficientes de ascorbato que se requiere en el ciclo de las xantofilas durante la conversión de violaxantina en zeaxantina y la consecuente disipación de exceso de luz (Mallick y Mohn, 2000; Arora et al., 2002); y del necesario para recuperar el α -tocoferol, que actúa directamente en la degradación del 1O_2 (Falk y Munné-Bosch, 2010). Otro papel destacado del glutatión reducido es su participación en la defensa frente al estrés metálico, sirviendo de sustrato para la síntesis de las fitoquelatinas (PC). Las PC son pequeños péptidos de estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (con valores de n

entre 2 y 11) capaces de quelar los metales pesados y almacenarlos en las vacuolas (Rauser, 1995; Hirata et al., 2005). Así, se ha indicado cómo la presencia de Cd en el medio induce la síntesis de PC en varias estirpes de microalgas, incluyendo *Chlamydomonas reinhardtii* (Howe y Merchant, 1992) y *Chlorella fusca* (Kaplan et al., 1995).

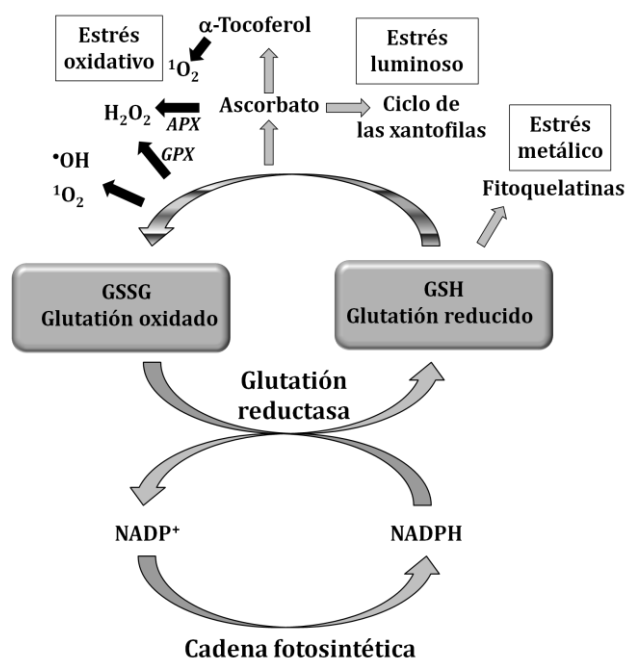


Figura 6. Papel del ciclo del glutatión en la defensa frente al estrés abiótico en organismos fotosintéticos. GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado. APX: ascorbato peroxidasa; GPX: glutatión peroxidasa. Las flechas negras indican la descomposición de las ROS por distintas vías.

Las implicaciones del glutatión reducido en el mantenimiento y control de los diferentes mecanismos frente a estrés oxidativo y metálico, ponen de manifiesto, a su vez, la importancia de L-glutamato y L-cisteína y, por lo tanto, del metabolismo del nitrógeno y azufre en la defensa celular.

3. Metabolismo del nitrógeno inorgánico

El nitrógeno es un elemento básico para la vida y limitante para el desarrollo de las plantas y del resto de organismos fotosintéticos. Dada su importancia, cualquier situación de estrés que pueda bloquear su asimilación fotosintética y posterior utilización, traería como consecuencia efectos negativos para el desarrollo y la

I. Introducción

supervivencia de plantas y microalgas. De ahí, que en la presente Tesis se haya realizado también el estudio de algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno frente al estrés metálico.

El nitrógeno presente en la biosfera se encuentra en varias formas con distinto estado de oxidación, siendo las más comunes el nitrato (NO_3^-), el amonio (NH_4^+), el nitrógeno como gas libre (N_2) y en formas orgánicas como aminoácidos y proteínas. Las interconversiones de las distintas especies de nitrógeno conforman el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 7), en el que participan organismos procariontas, eucariotas y bacterias (Richardson y Watmough, 1999).

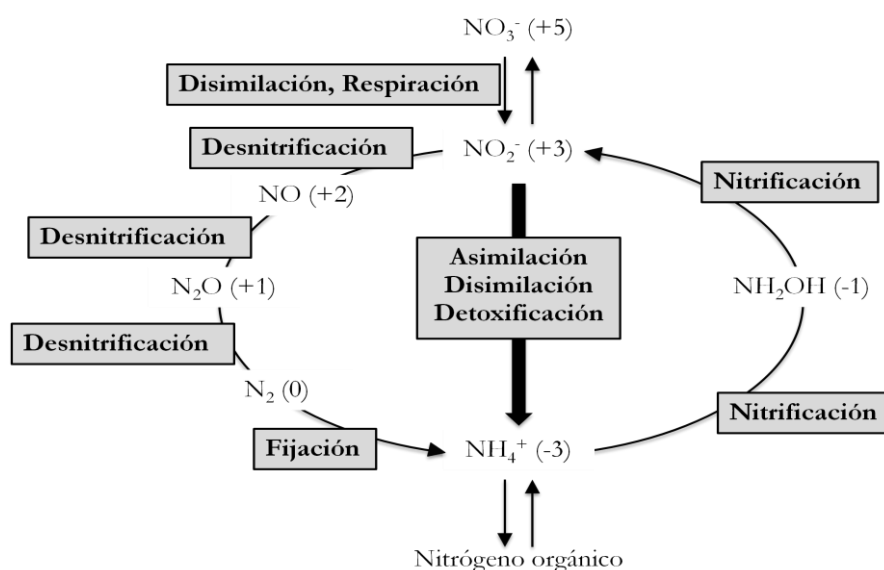


Figura 7. Ciclo biológico del nitrógeno. La *nitrificación* es una conversión oxidativa del NH_4^+ a NO_3^- ; y la *desnitrificación* es un proceso respiratorio en el que el NO_3^- es sucesivamente reducido a NO_2^- , óxidos de nitrógeno (NO y N_2O) y N_2 (Richardson, 2001).

3.1. Asimilación fotosintética de nitrógeno

De todos los procesos presentes en el ciclo del nitrógeno, la asimilación de nitrato es el proceso cuantitativamente más importante en la adquisición de nitrógeno en la biosfera. Se ha estimado que más de 10^4 megatoneladas de nitrógeno son asimiladas al año por este proceso (Guerrero et al., 1981). Las plantas y algas eucarióticas utilizan preferentemente el nitrato del suelo o el disuelto en agua como principal fuente de nitrógeno. La actividad fotosintética en cloroplastos suministra la energía metabólica y el poder reductor necesarios para la asimilación de CO_2 , nitrato y sulfato, que ocurren por rutas metabólicas independientes, conectadas en la biosíntesis de L-cisteína (Mosulén et al., 2003).

En microalgas, la asimilación fotosintética de nitrógeno presente en el nitrato, hasta formar parte del grupo α -amino del L-glutamato, se produce a través de una ruta metabólica (Figura 8), que implica:

- el transporte de nitrato al interior celular, proceso que ocurre por mediación de distintos transportadores de alta y baja afinidad (Fernández y Galván, 2008);
- la reducción citosólica de nitrato a nitrito, catalizada por el complejo enzimático NADH-nitrato reductasa (NR; EC 1.6.6.1) (Florencio y Vega, 1983);
- el transporte del nitrito producido al interior del cloroplasto, proceso mediado por un transportador específico (Fernández y Galván, 2008);
- la reducción, en el cloroplasto, de nitrito hasta amonio, por la acción catalítica de la ferredoxina-nitrito reductasa (NiR; EC 1.7.7.1) (Vega et al., 1980);
- y la incorporación del NH_4^+ producido al esqueleto carbonado del 2-oxoglutarato para sintetizar L-glutamato, que ocurre a través del ciclo glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.2.1)-glutamato sintasa (Fd-GOGAT; EC 1.4.7.1 y NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14), abreviado como ciclo GS-GOGAT (Vega et al., 1991). En este proceso se generan dos moléculas de glutamato, una de las cuales continúa en el ciclo y la otra se utiliza para la síntesis del resto de compuestos nitrogenados (Hirel et al., 1984; Monza y Márquez, 2004).

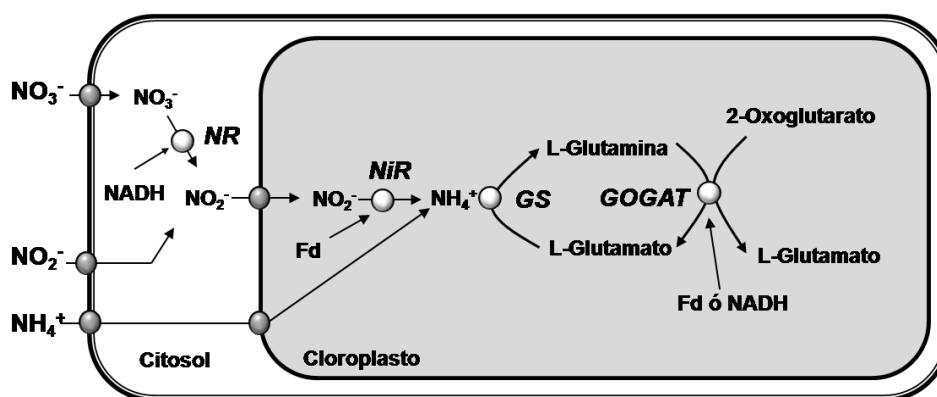


Figura 8. Ruta de asimilación de nitrato en microalgas.

Adicionalmente, la enzima NADH-glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2), que habitualmente actúa en la desaminación de L-glutamato para producir amonio, puede también estar implicada en la biosíntesis de cantidades adicionales de L-glutamato bajo circunstancias metabólicas específicas. Así, diversos estudios parecen indicar que la vía GDH es operativa cuando la concentración intracelular de amonio es elevada, mientras que el ciclo GS-GOGAT se desarrolla si la

I. Introducción

concentración intracelular de amonio es baja (Hochman et al., 1988; Lea y Mifflin, 2003; Krapp, 2015)

A continuación, se describen más detalladamente las enzimas del metabolismo del nitrógeno que han sido objeto de estudio en la presente Tesis: la nitrito reductasa, la glutamina sintetasa y la glutamato deshidrogenasa.

3.1.1. Nitrito reductasa

La reducción de nitrito hasta amonio en organismos fotosintéticos tiene lugar en el cloroplasto y está catalizada por la enzima ferredoxina-nitrito reductasa (Fd-NiR; EC 1.7.7.1), proceso que requiere la transferencia de seis electrones aportados por la ferredoxina reducida fotosintéticamente (Guerrero et al., 1981).

La Fd-NiR se ha purificado hasta homogeneidad electroforética en una gran variedad de plantas (Vega et al., 1980; Wray y Fido, 1990) y algas como *Chlorella* (Zumft, 1972), *Chlamydomonas reinhardtii* (Romero et al., 1987) o *Monoraphidium braunii* (Vigara et al., 2002). Todas las formas monoméricas de NiR de plantas y algas tienen un peso molecular comprendido entre 60-64 kDa y contienen un sirohemo y una agrupación sulfoférrica [4Fe-4S] como grupos prostéticos que participan en la transferencia de electrones (Figura 9) desde la ferredoxina reducida hasta el nitrito, habiéndose detectado residuos de cisteína (Cys) encargados de la unión de ambos grupos, Fe-S y sirohemo. (Vega y Kamin, 1977; Fernández et al., 1998).

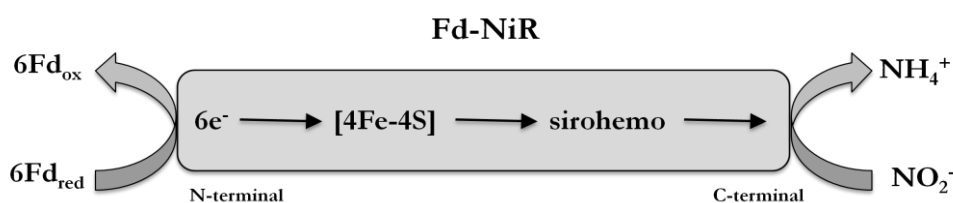


Figura 9. Características estructurales de la nitrito reductasa de eucariotas. Se representa el flujo de electrones suministrados por la ferredoxina reducida (Fd_{red}), generada como consecuencia del transporte electrónico fotosintético y la reacción que cataliza (Márquez et al., 2004).

También se han caracterizado nitritos reductasas asimilatorias heterodiméricas con una subunidad de 61-64 kDa, y otra de 24-35 kDa (Sengupta et al., 1996). Además de la Fd-NiR, se han descrito dos enzimas más con actividad nitrito reductasa: la NAD(P)H-nitrito reductasa (NAD(P)H-NiR; EC 1.6.6.4), presente en organismos tales como *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*; y las sulfito reductasas asimiladoras y disimiladoras, presentes en diversas especies de plantas como espinaca, guisante, trigo, maíz y cebada (Von-Arb, 1990; Duncanson et

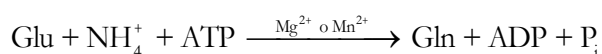
al., 1993), que posiblemente reducen el nitrito fortuitamente debido a una actividad residual del grupo sirohemo de la enzima (Kleinhofs y Warner, 1990).

El efecto del estrés metálico sobre el metabolismo del nitrógeno se ha estudiado en varias especies de plantas. Así, se ha indicado como en tomate, judía y maíz, la presencia de Cd no solo genera estrés oxidativo, sino que también disminuye los niveles de actividad de la nitrato reductasa y de la nitrito reductasa (Chugh et al., 1992; Boussama et al., 1999; Chaffei et al., 2004; Mohammad, 2013), mientras que en guisante, la presencia del metal produce un mayor efecto inhibitor sobre la nitrato reductasa que sobre la nitrito reductasa (Gouia et al., 2000).

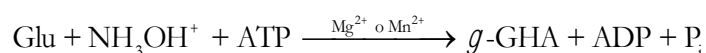
3.1.2. Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) tiene un papel clave en el metabolismo del nitrógeno. Esta enzima cataliza la incorporación del amonio en la molécula del glutamato para dar glutamina, independientemente de que sea producido por el propio metabolismo celular o por el transporte directo desde el exterior (Monza y Márquez, 2004).

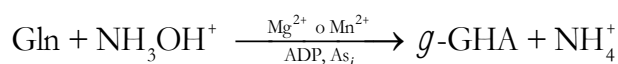
La producción de glutamina por parte de la GS, en presencia de metales divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}), se denomina reacción biosintética:



Además de su reacción fisiológica, la GS también cataliza la reacción sintética, en la cual se sustituye el amonio por hidroxilamina en presencia de glutamato, ATP y metales divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}), para dar lugar a γ -glutamilhidroxamato (γ -GHA) (Elliot, 1955):



La enzima también puede sintetizar γ -glutamilhidroxamato sin necesidad de la hidrólisis de ATP, en presencia de ADP y arseniato, y utilizando glutamina e hidroxilamina, dando lugar a la denominada reacción transferasa (Shapiro y Stadtman, 1970):



Se han descrito tres tipos de GS en base al número de subunidades y de la masa molecular. La GSI es una enzima compuesta por doce subunidades idénticas de peso molecular entre 44-60 kDa, cada una organizada en dos anillos superpuestos de seis subunidades que se encuentra solamente en bacterias, cuyo peso molecular es de 600

I. Introducción

kDa (Yamashita et al., 1989). La GSII es la enzima típica de los eucariotas. Su estructura cuaternaria está compuesta por ocho subunidades con una masa molecular de, aproximadamente, 350 kDa (Forde y Cullimore, 1989). Tanto en plantas como en *Chlamydomonas* existen dos isoformas que difieren en su localización intracelular, la GS1 citosólica y la GS2 cloroplástica (Lam et al., 1996; Monza y Márquez, 2004). Las subunidades de la GS cloroplástica tienen una masa molecular alrededor de 43-45 kDa, ligeramente superior que las citosólicas (37-40 kDa). Además, ambas isoformas suelen ser fácilmente distinguibles debido a que la isoforma cloroplástica es más termoestable que la citosólica (McNally et al., 1983), tiene un valor óptimo de pH ligeramente superior y suele mostrar cooperatividad negativa para el sustrato L-glutamato (Ahmad et al., 1982). Por último, la GSIII es una enzima encontrada en algunas clases de bacterias compuesta de seis subunidades con un peso molecular de, aproximadamente, 500 kDa.

La asimilación de amonio, vía ciclo GS-GOGAT, también se ve afectada por el estrés metálico. Así, se ha descrito en hojas de maíz como la exposición a cantidades crecientes de Cd, durante 12 días, dio lugar a un decrecimiento importante de los niveles de actividad de la GS y de la GOGAT, tanto dependiente de NADH como de ferredoxina (Boussama et al., 1999); por el contrario, en guisantes, fue mayor el efecto observado sobre la actividad GOGAT que sobre la GS (Gouia et al., 2000).

3.1.3. Glutamato deshidrogenasa

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima que cataliza la reacción entre el 2-oxoglutarato y el amonio para formar glutamato, utilizando como cofactores los piridín nucleótidos (NAD^+ o NADP^+). La enzima es reversible, así, en el proceso anabólico o de aminación reductiva, actuaría como ruta alternativa para la asimilación de amonio, mientras que en el proceso catabólico actuaría desaminando el glutamato (Figura 10).

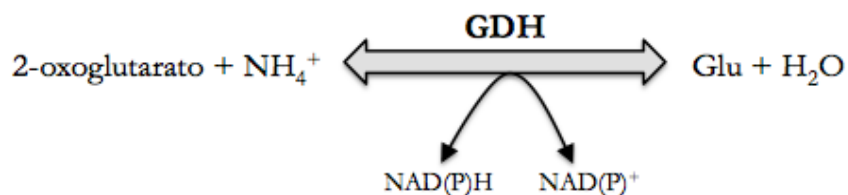


Figura 10. Reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa.

La GDH proporciona una ruta para la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos, siendo fundamental en la síntesis de todos los aminoácidos pues, en muchas especies, es la ruta principal de formación de grupos α -amino directamente a partir de amonio, y supone, además, una conexión entre el metabolismo de los carbohidratos y el de los aminoácidos (Smith et al., 1975).

Actualmente, existen distintos puntos de vista opuestos sobre la función de la GDH. Así, se ha sugerido que la enzima cataliza la aminación reductiva de 2-oxoglutarato y funciona como una alternativa para el ciclo de la GS-GOGAT (Yamaya et al., 1984; Oaks, 1994). Otra alternativa indica que la enzima cataliza la desaminación oxidativa del glutamato para proveer esqueletos carbonados al ciclo del ácido cítrico, particularmente bajo condiciones de limitación de carbono (Robinson et al., 1992). Finalmente, también se ha sugerido que la GDH podría jugar un papel en la reasimilación del amonio bajo condiciones de estrés (Domínguez et al., 2003). En un medio rico en amonio como fuente de nitrógeno, se ha propuesto que la asimilación del amonio se realiza por la vía GDH, a pesar de la baja afinidad de la enzima por el amonio (esta enzima posee una elevada K_m de, aproximadamente, 1 mM) (Brown, 1980). Sin embargo, cuando el suministro de amonio es limitado, la asimilación por la vía GS-GOGAT es más eficiente, ya que la GS posee una K_m mucho más baja para el amonio que la GDH (Harder y Dijkhuizen, 1983).

En plantas se han descrito GDH de localización cloroplástica y mitocondrial (Hudson y Daniel, 1993). La enzima está codificada por dos genes nucleares distintos que dan lugar a polipéptidos de entre 41-45 kDa. El gen *GDH1* codifica para la denominada subunidad β y el gen *GDH2*, para la subunidad α . Estas dos subunidades pueden ser ensambladas en diferente proporción, dando lugar a homo- o heterohexameros. Recientemente se ha identificado en *Arabidopsis* un tercer polipéptido (γ) codificado por un gen diferente (Fontaine et al., 2013). En microalgas, la enzima de *Chlamydomonas reinhardtii* es hexamérica, habiéndose identificado hasta tres isoenzimas (Moyano et al., 1992); en *Chlorella sorokiniana* se han identificado dos isoformas cloroplásticas hexaméricas y una tetramérica mitocondrial (Meredith et al., 1978). Basándose en la especificidad de la coenzima, se conocen tres tipos diferentes de GDH: las NAD-específicas (NAD-GDH; EC 1.4.1.2); las NADP-específicas (NADP-GDH; EC 1.4.1.4); y las no específicas, es decir, funcionan con ambas coenzimas (NAD(P)-GDH; EC 1.4.1.3). Al parecer, la NADP-GDH podría tener un papel en la asimilación de amonio, especialmente en hongos y levaduras, como también en algunas procariontas (Smith et al., 1975; Stewart et al., 1980), mientras que para la NAD-GDH se ha propuesto un papel catabólico en eucariotas.

Entre los factores que regulan la actividad de la GDH, quizás el más importante y estudiado sea el amonio (Peeters y Vanlaere, 1992). El amonio provoca un aumento de la actividad aminante de la GDH, mientras que la actividad desaminante disminuye bruscamente. Por otro lado, azúcares como la sacarosa, glucosa o la fructosa pueden afectar de manera negativa a la actividad de la GDH, como han comprobado distintos autores (Lawlor, 2002; Weber y Flugge, 2002). La actividad GDH también se ve afectada por las condiciones de estrés abiótico, así, la presencia de metales pesados incrementa los niveles de actividad de la GDH de tomate, junto con la actividad NADH-GOGAT (Chaffei et al., 2004); y en maíz se ha observado como la actividad aminante de la GDH se incrementa notablemente por la presencia de Cd, apreciándose también un incremento en los niveles de γ -glutamilcisteína y

glutación (Boussama et al., 1999). Por su parte, la GDH en *Chlamydomonas reinhardtii* incrementa su nivel de actividad en células expuestas a Cd, efecto que también se observa en las isocitrato deshidrogenasas (NAD⁺ y NADP⁺ dependientes), que aportan el esqueleto de 2-oxoglutarato, junto con las enzimas del complejo cisteína sintasa (Domínguez et al., 2003).

4. Objetivos de la Tesis

Coccomyxa onubensis es una microalga extremófila que habita en el río Tinto, cuyas aguas tienen un pH muy ácido, además de poseer un alto contenido en metales pesados. Debido a las condiciones de hábitat excepcionales en las que se encuentra la microalga, la presente Tesis se ha centrado en profundizar en el estudio de cómo responde la microalga a estas condiciones de estrés, en base a la presencia de cobre, cadmio, mercurio o arsénico en el medio de cultivo, a pH ácido. Para ello, se tomará como referencia dos procesos esenciales, uno bajo el punto de vista nutricional, como es el caso del metabolismo del nitrógeno; y otro como mecanismo de defensa frente al estrés abiótico, como es el caso del sistema antioxidante. Además, teniendo en cuenta que a nivel enzimático no existen datos previos en esta microalga, se pretende caracterizar parcialmente algunas de las enzimas que intervienen en estos procesos. En este contexto, se han planteado los siguientes objetivos para la realización de esta Tesis Doctoral:

- 1) Estudiar el comportamiento de las células de *C. onubensis* frente al consumo de diferentes fuentes nitrogenadas a distintos valores de pH, comprobar el efecto que producen dichas fuentes sobre el pH del medio, así como estudiar la actuación que provoca el estrés abiótico sobre el consumo de nitrato y amonio.
- 2) Caracterizar cinéticamente tres enzimas del metabolismo del nitrógeno de la microalga *C. onubensis*, como son la nitrito reductasa, la glutamina sintetasa y la glutamato deshidrogenasa, y estudiar el efecto que provoca el estrés abiótico sobre el nivel de actividad de dichas enzimas.
- 3) Caracterizar cinéticamente tres enzimas del sistema antioxidante de la microalga *C. onubensis*, como son la catalasa, la ascorbato peroxidasa y la glutatión reductasa, y estudiar el efecto que provoca el estrés abiótico sobre su nivel de actividad.
- 4) Estudiar cómo afecta al crecimiento celular de *C. onubensis* la exposición a diferentes metales y metaloides, y comprobar la capacidad bioacumuladora de la microalga.

II. Materiales y Métodos

1. Material biológico empleado y condiciones de cultivo

El organismo utilizado en el presente trabajo ha sido la microalga *Coccomyxa onubensis*, antes denominada *Coccomyxa acidophila*, aislada del río Tinto (Figura 11) por el grupo de Investigación de Biotecnología de Algas (BITAL), del Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez Martín”, de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva. Se trata de una microalga extremófila que pertenece a la división de las *Chlorophytas*, orden *Chlorococcales*.

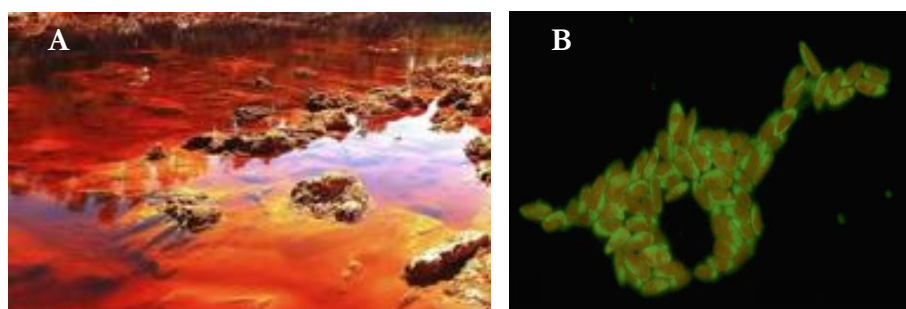


Figura 11. Fotografía del río Tinto donde se observa su color rojo característico (A). Microalga *Coccomyxa onubensis* obtenida al microscopio óptico (60 aumentos) (B).

La microalga *C. onubensis* fue cultivada en una cámara de cultivo climatizada a una temperatura de 25 °C y condiciones fotoautotróficas, bajo iluminación continua con tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30 W/33) suministrada a una intensidad aproximada de $160 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los cultivos. Los cultivos en medio líquido se realizaron en recipientes de 0,25, 0,5, 1, 2 o 5 litros de capacidad, según las necesidades de biomasa, por los que se hacía pasar una corriente de aire enriquecido con un 5% (v/v) de CO_2 , que servía como fuente de carbono, a través de una varilla de vidrio inmersa en el cultivo (Figura 12).

Las células de la microalga *C. onubensis* crecieron en un medio de cultivo descrito por Silverman y Lundgren (1959). Este método ha sido modificado, obteniéndose la composición, que contenía por litro: K_2HPO_4 , 0,50 g; K_2SO_4 , 3,95 g; KNO_3 , 2,30 g; KCl , 0,10 g; $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,40 g; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; FeCl_3 , 0,030 g; Trazas Hutner, 5 ml. El pH de dicho medio es básico, por lo que se corrige adicionando unas gotas de H_2SO_4 concentrado hasta un valor de 2,5. La fuente de nitrógeno estándar utilizada fue KNO_3 , aunque en las ocasiones también se utilizó amonio o nitrato amónico.

II. Materiales y Métodos



Figura 12. Instalación utilizada para el cultivo de microalgas localizada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Huelva. La foto corresponde a cultivos realizados en condiciones fotoautótrofas.

Las Trazas Hutner, indicadas anteriormente en la composición del medio, se prepararon, en un volumen de 1 L, según el siguiente procedimiento:

- 1) *Disolución A*: disolver 10 g de EDTA (ácido libre) en 250 ml de agua destilada. Se facilita la disolución basificando el agua con KOH concentrado.
- 2) *Disolución B*: disolver en 550 ml de agua destilada, por orden y calentando a 100 °C, los siguientes compuestos:
 - 2,28 g de H_3BO_3
 - 4,40 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 1,02 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - 1,00 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0,32 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - 0,32 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 0,22 g de $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 3) Mezclar ambas disoluciones, obteniéndose una nueva de un color verde-azulado.
- 4) Calentar hasta los 100 °C para, a continuación, dejar enfriar hasta una temperatura comprendida entre 80-90 °C.
- 5) Ajustar en este momento el pH a 6,8 con una disolución de KOH al 20% (p/v), manteniendo siempre la temperatura superior a los 70 °C.

- 6) Por último, enrasar hasta un volumen total de 1 L con agua destilada y guardar en oscuridad durante 2 días, tras los cuales se podrá proceder a su uso.

Puntualmente, y cuando se indica, se utilizó la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. En este caso, para crecer la microalga se utilizó el medio de cultivo descrito por Sueoka et al. (1967), que contenga por litro: 0,72 g de KH_2PO_4 ; 1,89 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1 g de KNO_3 ; 1 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($61 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); 1 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); y 5 ml de Trazas Hutner. Los cultivos de *C. reinhardtii* se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento descritas para *C. onubensis*, a excepción del pH del medio, que no se ajustó a pH 2,5.

2. Consumo de diferentes fuentes nitrogenadas por *Coccomyxa onubensis*

Para realizar los estudios de consumo de la fuente nitrogenada, las células de la microalga *C. onubensis*, crecidas en condiciones estándar con KNO_3 22,75 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos, se lavaron tres veces en medio de cultivo sin fuente nitrogenada y se resuspendieron en el mismo hasta una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, en un volumen total de 250 ml. Posteriormente, a tiempo cero, se incubaron según las condiciones requeridas en los distintos experimentos realizados. La fuente nitrogenada utilizada fue, según el caso: KNO_3 , NH_4Cl o NH_4NO_3 , a una concentración en el medio de cultivo de 0,25 mM.

La velocidad de consumo se determinó en base a la velocidad con la que disminuían estos compuestos en los medios de cultivo en experimentación. Cada cierto período de tiempo, de entre 15 y 30 minutos, se tomaba una muestra del cultivo correspondiente, se eliminaban las células por centrifugación a 13400 rpm durante 5 minutos y, en el sobrenadante resultante, se determinaba el contenido de la fuente nitrogenada a estudiar, según se describe en los apartados 8.1, 8.5 y 8.6 de este Capítulo. En los tiempos inicial y final se determinó el contenido de clorofila según se describe en el apartado 8.2 de este Capítulo.

3. Preparación de extractos crudos

3.1. Recolección de células

Las microalgas se recogieron durante el final de la fase exponencial de crecimiento a efectos de conseguir suficiente masa para la extracción de proteínas, por centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos. Las células recogidas se utilizaron directamente, o bien se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El rendimiento obtenido de *C. onubensis* fue de 3-4 g de peso húmedo de células (phc) por cada litro de cultivo centrifugado.

3.2. Rotura celular y preparación de extractos crudos

La ruptura celular es el primer paso en el aislamiento de una proteína. El método de rotura a elegir dependerá de las características mecánicas del tejido o células donde se va a aislar la proteína, así como de su localización.

Los extractos crudos de los distintos organismos utilizados se prepararon a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando alguno de los siguientes métodos de rotura celular:

Vibración en un homogeneizador Bühler

Este método fue el utilizado habitualmente en este trabajo para romper las células de *C. onubensis*. Para ello, las células recogidas tras la centrifugación se mezclaron con perlas de vidrio, de 0,3 mm de diámetro ($3\text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\text{ phc}$), en presencia de $1\text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\text{ phc}$ de tampón de extracción correspondiente. La mezcla resultante se sometió a vibración a alta velocidad en el Bühler durante 5 períodos de 1 minuto, siendo el tiempo de espera entre pulso y pulso de 30 segundos para evitar el sobrecalentamiento de las proteínas y su consecuente desnaturalización. Seguidamente, se filtró a través de cuatro capas de gasa de nylon. A continuación, se realizó una segunda filtración utilizando $2\text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\text{ phc}$ de tampón y filtrando de nuevo a través de la gasa utilizada anteriormente para separar definitivamente las perlas de vidrio. El homogenado resultante es una mezcla de proteínas solubles, restos de membranas y células rotas. Esta preparación se mantuvo en contacto con el tampón de extracción, en agitación suave, durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para conseguir la máxima extracción de proteínas. Por último, se centrifugó durante 30 minutos a 13400 rpm para eliminar los restos celulares y separar el sobrenadante (conteniendo las proteínas solubles), que se utilizó como extracto crudo para las medidas de proteínas totales y actividad de las diferentes enzimas estudiadas, o bien se almacenó a -20°C hasta su uso.

Congelación-descongelación

Se utilizó este tipo solo para la rotura celular para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, debido a que la pared celular de dicha microalga no es tan resistente. Las células recogidas se sumergieron en nitrógeno líquido (-195,8 °C) durante 90 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 90 segundos para, seguidamente, adicionar el tampón de extracción a la dilución de 3 ml de tampón·g⁻¹ phc. A continuación, se mantuvo en agitación suave, a 4 °C, hasta la resuspensión celular. Por último, se centrifugó a 13400 rpm durante 30 minutos para eliminar los restos celulares y separar el sobrenadante, que se utilizó como extracto crudo para las medidas de proteínas totales y actividad de las diferentes enzimas estudiadas, o bien se almacenó a -20°C hasta su uso.

Sonicación

Utilizado en el caso de *C. onubensis* como método de rotura celular puntual para la realización de la purificación parcial de la enzima ascorbato peroxidasa. Las células se resuspendieron en 2 ml·g⁻¹ phc del tampón de extracción y se sometieron a 150 W durante 10 períodos de 10 segundos, siendo el tiempo de espera entre pulso y pulso de 2 minutos. La suspensión resultante se mantuvo en contacto con el tampón de extracción, en agitación suave, durante 10 minutos a 4 °C. Por último, se centrifugó a 13400 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo para las medidas de proteínas totales y la determinación de la actividad correspondiente, o bien se almacenó a -20°C hasta su uso.

4. Determinación de actividades enzimáticas

Las enzimas son proteínas dotadas de propiedades catalíticas que no modifican el balance energético ni el equilibrio de aquellas reacciones en las que intervienen. Su función se limita a ayudar a acelerar el proceso, en cambio, por ser proteínas, resultan termolábiles y sensibles a los cambios y variaciones del medio ambiente físico en que se hallen (Dixon y Webb, 1958). La velocidad del proceso catalizado se mide, según el Sistema Internacional de Unidades, en katal (kat), pero suele utilizarse también la unidad de actividad enzimática (U). Su equivalencia viene dada por:

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol de sustrato convertido} \cdot \text{s}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ U} = 6 \cdot 10^7 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1}$$

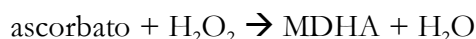
Otra unidad comúnmente utilizada es la actividad específica, que se refiere al número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U·mg⁻¹). La actividad específica da una idea de la pureza de la preparación enzimática y permite comparar los niveles de actividad de los distintos extractos crudos enzimáticos obtenidos.

II. Materiales y Métodos

A continuación, se describen los ensayos de actividad de las enzimas estudiadas en la presente Tesis.

4.1. Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa (APX) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, en presencia de ascorbato sódico, produciéndose el radical ascorbato monohidrato y agua, según la reacción:



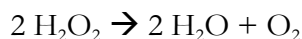
La actividad enzimática se determinó en base a las condiciones descritas por Asada (1984) y modificadas por Amako et al. (1994). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de fosfato potásico, pH 7; 1 μmol de EDTA (sal disódica); 10 μmol de H_2O_2 ; 0,24 μmol de ascorbato sódico; y una cantidad de extracto enzimático comprendido entre 10 y 50 μl . La actividad se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la cinética de desaparición de ascorbato a la absorbancia de 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a 50 °C. El inicio de la reacción se realizó por la adición de ascorbato. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia de H_2O_2 en la mezcla de reacción.

Todos los reactivos, excepto el extracto crudo, se adicionaron a la cubeta, la cual se introdujo en el espectrofotómetro hasta conseguir la estabilización de la absorbancia (8-10 segundos). Por último, se adicionó el extracto crudo para la obtención de la pendiente, tras la cual se obtuvo los valores de actividad.

Una unidad (U) de actividad APX se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de H_2O_2 en un minuto.

4.2. Catalasa

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, dando lugar a oxígeno y agua, según la reacción:



La actividad enzimática se determinó en las condiciones modificadas descritas por Martins y English (2014). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0,525 ml: 10,5 μmol de H_2O_2 (preparado en 0,5 ml de Tris-HCl 52,5 mM, pH 12); y una cantidad de extracto enzimático de 25 μl . La actividad se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la cinética de desaparición de H_2O_2 a la absorbancia de 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a 60 °C. El inicio de la reacción se realizó

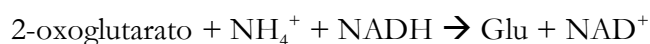
por la adición de H₂O₂. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia de enzima en la mezcla de reacción.

Una unidad (U) de actividad CAT se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de H₂O₂ en un minuto.

4.3. Glutamato deshidrogenasa

4.3.1. *Glutamato deshidrogenasa aminante*

La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) aminante cataliza la reacción de aminación oxidativa del 2-oxoglutarato en L-glutamato, según la siguiente reacción:



La actividad enzimática se determinó en base a las condiciones descritas por Moyano et al. (1995). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de Tris-HCl, pH 9; una cantidad de extracto enzimático de 100 μl; 10 μmol de 2-oxoglutarato (sal disódica); 100 μmol de NH₄Cl; y 0,3 μmol de NADH. La actividad se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la cinética de desaparición de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), a 60 °C. El inicio de la reacción se realizó por la adición de NADH. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia del 2-oxoglutarato en la mezcla de reacción.

Una unidad (U) de actividad GDH se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de NADH en un minuto.

4.3.2. *Glutamato deshidrogenasa desaminante*

La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) desaminante cataliza la reacción de desaminación oxidativa del L-glutamato en α-cetoglutarato, según la siguiente reacción:



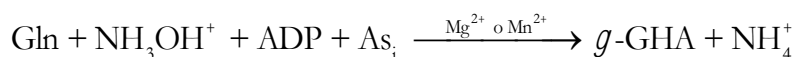
La actividad enzimática se determinó en base a las condiciones modificadas descritas por Ruiz et al. (1998). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de Tris-HCl, pH 9,5; una cantidad de extracto enzimático comprendido entre 100 y 200 μl; 50 μmol de L-glutamato; y 2 μmol de NAD⁺. La actividad se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la cinética de aparición de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), a 50 °C. El inicio de la reacción se realizó por la adición de NAD⁺. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia de glutamato en la mezcla de reacción.

II. Materiales y Métodos

Una unidad (U) de actividad GDH se define como la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 μmol de NADH en un minuto.

4.4. Glutamina sintetasa

Aunque la glutamina sintetasa (GS) cataliza la síntesis de L-glutamina a partir de L-glutamato y amonio en presencia de ATP (actividad biosintética), la enzima se ensayó en base a su actividad transferasa, catalizando la síntesis de γ -glutamilhidroxamato (γ -GHA) a partir de glutamina e hidroxilamina (NH_3OH^+), y en presencia de ADP y arseniato (As_i), según la reacción:



La actividad enzimática se determinó en base a las condiciones descritas por Shapiro y Stadtman (1970). La mezcla de reacción contenía, en 1 ml de volumen final: 0,6 ml de mezcla de ensayo (40 mM de L-glutamina; 4 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM de ADP; 66 mM de MOPS, pH 6); 60 μmol de hidroxilamina; 60 μmol de NaOH; una cantidad de extracto enzimático comprendido entre 50 y 100 μl ; 5 μmol de DTE; y 50 μmol de HAsO_4^{2-} . Después de 10 minutos a 40 °C, la reacción se paró por adición de 1 ml del reactivo ácido de Fe(III). Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó el γ -GHA formado midiendo la absorbancia a 500 nm ($\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), según se describe en el apartado 8.3 de este Capítulo. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia del extracto enzimático en la mezcla de reacción.

Una unidad (U) de actividad GS se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de γ -glutamilhidroxamato en un minuto.

4.5. Glutación reductasa

La actividad glutación reductasa (GR) cataliza la reducción del glutación oxidado (GSSG) con la respectiva oxidación del NADPH a NADP^+ , según la reacción:



La actividad enzimática se determinó en las condiciones descritas por Lamotte et al. (2000). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 25 μmol de Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 μmol de EDTA (sal disódica); 0,25 μmol de NADPH; 1 μmol de GSSG; y una cantidad de extracto enzimático comprendido entre 100 y 200 μl . La actividad se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la cinética de desaparición de NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a 60 °C. El blanco se realiza

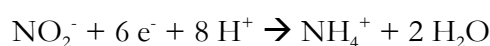
exactamente igual, pero sin la presencia de glutatión oxidado en la mezcla de reacción.

Todos los reactivos, excepto el extracto crudo, se adicionaron a la cubeta, la cual se introdujo en el espectrofotómetro hasta conseguir la estabilización de la absorbancia (8-10 segundos). Por último, se adicionó el extracto crudo para la obtención de la pendiente, tras la cual se obtuvo los valores de actividad.

Una unidad (U) de actividad GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de NADPH en un minuto.

4.6. Nitrito reductasa

La actividad nitrito reductasa (NiR) cataliza la transferencia de 6 electrones al nitrito para producir amonio, según la siguiente reacción:



La actividad enzimática se determinó en las condiciones descritas por Romero et al. (1987), excepto que se incrementó la concentración inicial de NaNO_2 a 3 mM. La actividad se ensayó rutinariamente con metil viológeno reducido químicamente con ditionito, no obstante, y en las condiciones que se indican, también se ensayó la actividad utilizando como dador de electrones la ferredoxina reducida.

En todos los ensayos que se describen, una unidad (U) de actividad NiR se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μmol de nitrito hasta amonio en un minuto.

Actividad NiR dependiente de metil viológeno

Dicha actividad se midió colorimétricamente determinando el nitrito (como se describe en el apartado 8.6 de este Capítulo) presente en el medio de reacción. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de Tris-HCl, pH 7,5; 3 μmol de NaNO_2 ; 10 μmol de metil viológeno; y un volumen de extracto enzimático comprendido entre 100 y 500 μl . La reacción se inició al adicionar 10 mg de ditionito sódico 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ recientemente disuelto en 0,1 ml de bicarbonato sódico 300 mM. La mezcla de reacción se incubó a 45 °C y, tras 10 minutos, se paró por agitación vigorosa hasta la oxidación completa del ditionito. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia del extracto enzimático en la mezcla de reacción.

Actividad NiR dependiente de ferredoxina

Esta actividad se determinó de forma análoga a la MV-NiR, pero adicionando, en lugar de metil viológeno, 225 μl de ferredoxina de *Spinacia oleracea* ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (comercial, SIGMA-ALDRICH). La reacción se inició al adicionar 10 mg de ditionito sódico $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ recientemente disuelto en 0,1 ml de bicarbonato sódico 300 mM. El blanco se realiza exactamente igual, pero sin la presencia del extracto enzimático en la mezcla de reacción.

5. Determinación de parámetros cinéticos

5.1. Constante de Michaelis-Menten

La constante de Michaelis-Menten (K_m) corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), siendo la $V_{m\acute{a}x}$ la correspondiente al valor máximo al que tiende la curva experimental. En base a esta teoría, la cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, según la ecuación:

$$U = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Para los estudios de determinación de la K_m de las diferentes enzimas, se procedió manteniendo constante, en cada caso, la concentración del resto de reactivos y la cantidad de extracto enzimático, y variando solo la concentración del sustrato estudiado.

Para cinéticas no Michaelianas, fue necesario utilizar la aproximación de la ecuación de Archibal Hill en lugar de la de Michaelis-Menten, según la ecuación:

$$U = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]^n}{K^n + [S]^n}$$

La ecuación, empleada en los procesos alostéricos, incorpora el término “n” (número de sitios de unión al sustrato por molécula de enzima), denominado índice de Hill, siendo K, o también $S_{0,5}$, la concentración de sustrato para la cual la velocidad es la mitad de la velocidad máxima. En los supuestos de que “n” sea igual a 1, la ecuación se iguala a la de Michaelis-Menten, en cambio, si “n” es mayor que 1, la

cooperatividad es de tipo positiva y si “n” es menor que 1, la cooperatividad es de tipo negativa.

5.2. pH óptimo

La determinación del pH óptimo de trabajo de las distintas enzimas estudiadas se realizó reemplazando el tampón utilizado para cada ensayo de actividad, según lo indicado en el apartado 4 de este Capítulo, por diferentes tampones a diferentes pH, en la mezcla de reacción. Según la enzima ensayada se utilizaron diferentes tampones, tales como: ácido acético/acetato sódico, pH 3,0; 3,5; 4,0 y 4,5; MES, pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5; MOPS, pH 6,0; 6,5; 7,0 y 7,5; fosfato potásico, pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 y 9,0; Tris-HCl, pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0 y 12,5.

5.3. Temperatura óptima

La temperatura óptima se determinó calculando las correspondientes actividades enzimáticas, según se describe en el apartado 4 de este Capítulo, variando la temperatura de incubación de la mezcla de reacción, entre 0-80 °C, dependiendo de la enzima estudiada. El valor de Energía de Activación (E_a) se calculó a partir de la representación de Arrhenius, según la ecuación:

$$U = k \times e^{-E_a/RT}$$
$$\ln U = \ln k - \frac{E_a}{RT}$$

donde R es la constante de los gases ($8,3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$); T, la temperatura absoluta (°K); y k, la constante cinética dependiente de la temperatura.

6. Purificación parcial de la ascorbato peroxidasa de *Coccomyxa onubensis*

6.1. Eliminación de pigmentos y nucleicos

Como paso previo a la etapa cromatográfica, y para evitar interferencias durante la purificación, se procedió a la eliminación de pigmentos y nucleicos del correspondiente extracto crudo proteico de *C. onubensis*, obteniendo por sonicación (según se indica en el apartado 3.2 de este Capítulo). Con esta finalidad, se adicionó lentamente sobre el extracto crudo una disolución de sulfato de estreptomycin a una

II. Materiales y Métodos

concentración de 100 mM (a razón de 100 μ l por mililitro de extracto crudo) preparada en tampón de extracción (fosfato potásico 20 mM, pH 7; conteniendo ascorbato 1 mM). Tras 5 minutos de agitación suave y continua a 4 °C, la preparación se centrifugó a 13400 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la siguiente etapa de la purificación.

6.2. Cromatografía en DEAE-Sefacel

La purificación parcial de la APX se realizó mediante una cromatografía de intercambio aniónico de DEAE-Sefacel (dietilaminoetil-sefarosa) a partir del sobrenadante resultante del tratamiento con sulfato de estreptomicina. Las columnas de vidrio utilizadas se rellenaron con la matriz de DEAE-Sefacel (fase estacionaria) y se empaquetaron y equilibraron con el tampón de extracción. La cromatografía se realizó de forma semiautomática utilizando un sistema FPLC (ÄKTA Purifier), (Figura 13).

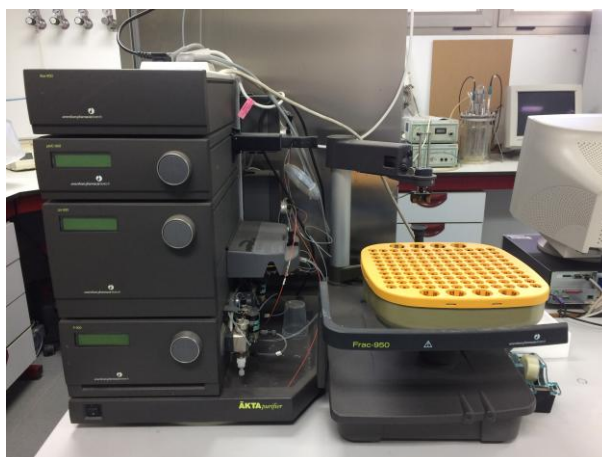


Figura 13. Sistema de purificación utilizado (FPLC ÄKTA Purifier).

Todo el proceso cromatográfico se realizó a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido tras el tratamiento con sulfato de estreptomicina, se aplicó a una columna (ϕ 1 x h 20 cm) empacada con DEAE-Sefacel y equilibrada con tampón de extracción a un flujo de 15 ml·h⁻¹. Seguidamente, la columna se lavó con 50 ml de tampón de extracción. La enzima APX se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 0 a 400 mM de NaCl en el mismo tampón. Finalmente, la columna se lavó con 50 ml de tampón de extracción conteniendo 600 mM de NaCl, eluyéndose todas las proteínas que se hubieran quedado retenidas en la columna. En todo momento, se recogieron fracciones de 2 ml. Como el ascorbato, contenido en el tampón de extracción, absorbe a 290 nm, el perfil de elución de proteína de la cromatografía se realizó mediante la determinación por el método Bradford (según se

describe en el apartado 8.7 de este Capítulo). Las fracciones con actividad APX se agruparon y se dializaron durante 24 horas a 4 °C frente al tampón de extracción libre de NaCl (ver apartado 9.1 de este Capítulo), tras lo cual se concentraron con un sistema AMICON, tal y como se indica en el apartado 9.2 del presente Capítulo.

7. Técnicas electroforéticas

7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (NATIVE-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevaron a cabo según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando un gel separador al 7 o 10% (p/v) de acrilamida, y un gel empaquetador al 4% (p/v).

Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes disoluciones, siendo la composición la descrita en la Tabla 4:

- Disolución A: acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0,45% (p/v).
- Disolución B: tampón Tris-HCl 1,9 M, pH 8,8.
- Disolución C: tampón Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8.
- APS: persulfato amónico al 10% (p/v). Recién preparada.
- TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina (comercial).

Se utilizaron geles de 1 mm de espesor y 8,2 cm de anchura, con longitudes aproximadas para los geles separador y empaquetador de 5,7 y 2,5 cm, respectivamente.

Tabla 4. Procedimiento de preparación de los geles separador y empaquetador de la electroforesis en condiciones nativas.

	Gel Separador		Gel Empaquetador
	7%	10%	4%
Disolución A	1,20	1,70	0,750
Disolución B	1,00	1,00	-
Disolución C	-	-	1,04
Agua destilada	2,80	2,20	3,10
APS	0,025	0,025	0,075
TEMED	0,006	0,012	0,006

Las cantidades se encuentran expresadas en mililitros de disolución por placa de gel.

II. Materiales y Métodos

La disolución del gel separador se añadió al sistema formador de geles, tras lo cual se cubrió el menisco con 2-propanol. Una vez polimerizado el gel (tiempo aproximado, 30-45 minutos), se eliminó el alcohol lavando con abundante agua destilada. A continuación, y sobre este gel, se vertió la disolución del gel empaquetador y se colocó rápidamente el peine, que fue retirado tras la polimerización (15-20 minutos). Los pocillos obtenidos se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada.

Las muestras, con un volumen final de 15 μ l, se mezclaron con 5 μ l de tampón TSB, que contenía: Tris-HCl 0,48 mM, pH 6,8; sacarosa al 80% (p/v); y azul de bromofenol al 40% (p/v), y se colocaron en los pocillos directamente con ayuda de una jeringa Hamilton.

El tampón de electroforesis usado en condiciones nativas, de pH 8,3, contenía por litro: 3,03 g de Trizma base y 14,4 g de glicina.

Antes de comenzar la electroforesis, los geles se estabilizaron a una intensidad de corriente de 15 mA por placa durante 5 minutos. Trascurrido este tiempo, se cargaron las muestras, o los patrones de peso molecular, y el sistema se mantuvo a una intensidad de 15 mA por placa, hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final de la placa (Figura 14).



Figura 14. Sistema de electroforesis (Hoefer).

7.2. Determinación de la actividad en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

7.2.1. Tinción de la actividad ascorbato peroxidasa

Este método de medida de actividad en gel se realizó una vez hecha la electroforesis en condiciones nativas, por el método descrito por Mittler y Zilinskas (1993). Se basa en la capacidad del ascorbato de reducir el nitroblue tetrazolium (NBT) en presencia de *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED) a formazán (derivado coloreado muy poco soluble). En presencia de H_2O_2 , la APX es capaz de producir la acumulación de formazán debido a la rápida oxidación del ascorbato

dependiente de H_2O_2 y, por tanto, la actividad APX se observa como una banda acromática sobre un fondo azul-púrpura.

Las disoluciones utilizadas para la medida de actividad APX fueron las siguientes, todas ellas en un volumen total de 20 ml:

- Disolución A: ascorbato sódico 2 mM preparado en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.
- Disolución B: ascorbato sódico 4 mM y H_2O_2 2 mM al 33% (p/v) preparado en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.
- Disolución C: NBT 2,45 mM y TEMED 28 mM preparado en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7.

El gel de electroforesis se incubó, en primer lugar, con la disolución A durante 30 minutos. Posteriormente, esta disolución se desechó, se le adicionó la disolución B y se incubó durante 20 minutos. Por último, la disolución B se desechó y se le adicionó la disolución C, la cual tiñó el gel de un color azul-púrpura y, tras un tiempo de 20 minutos aproximadamente, se observaron bandas de actividad APX. Todo este proceso tuvo lugar a temperatura ambiente.

7.2.2. Tinción de la actividad catalasa

El ensayo de actividad CAT en gel se realizó en las condiciones modificadas descritas por Woodbury et al. (1971). Se basa en la capacidad que tiene los electrones de la reacción de oxidación del peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular, de reducir el ferricianuro de potasio (III) al ferrocianuro de potasio (II). A continuación, el cloruro férrico ($FeCl_3$) reacciona con el ferrocianuro (II) para formar un pigmento azul prusiano estable e insoluble, observándose la actividad CAT como una banda de color amarilla sobre un fondo oscuro.

Las disoluciones utilizadas para la medida de actividad CAT fueron las siguientes, todas ellas en un volumen total de 40 ml:

- Disolución A: H_2O_2 al 0,01% (p/v) preparado en agua destilada.
- Disolución B: $K_3[Fe(CN)_6]$ y $FeCl_3$ al 5% (p/v) preparado en agua destilada.

El gel de electroforesis se lavó, en primer lugar, con agua destilada durante un tiempo de 5 minutos. Posteriormente, se desechó el agua destilada y se incubó el gel en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7, durante 5 minutos. A continuación, se desechó la disolución de tampón y se adicionó la disolución A, incubándose el gel durante 10 minutos. Este paso se realizó en oscuridad debido a la sensibilidad del H_2O_2 por la luz. Por último, la disolución A se desechó y se adicionó la disolución B,

II. Materiales y Métodos

la cual tiñó el gel de un color oscuro. Tras 10 minutos de incubación, se desechó la disolución B y se paró la reacción lavando el gel con agua destilada, observándose bandas de actividad CAT. Todo este proceso se realizó a temperatura ambiente.

7.2.3. Tinción de la actividad glutamato deshidrogenasa

La determinación de la actividad GDH en gel se realizó por el método descrito por Brun et al. (1992), en base al ensayo desaminante. El ensayo se realizó incubando el gel en 20 ml de una mezcla de reacción preparada en Tris-HCl 100 mM (pH 7,8), conteniendo: 0,101 g de L-glutamato; 0,005 g de NAD⁺; 0,409 g de nitroblue tetrazolium; y 0,077 g de metosulfato de fenazina. El gel se mantuvo sumergido en la mezcla de reacción, a temperatura ambiente, hasta la aparición de bandas oscuras producidas por la formación de formazán reducido por la acción del nitroblue tetrazolium.

7.2.4. Tinción de la actividad glutatión reductasa

Teniendo en cuenta que la actividad requiere NADPH como donador de electrones, se procedió a sustituirlo por metil viológeno reducido con ditionito, realizando un ensayo similar al descrito para la actividad en gel de la NiR (ver apartado 7.2.6 de este Capítulo). Hasta la fecha no se han reportado ensayos similares para la actividad GR.

Las disoluciones utilizadas para la medida de actividad en gel de la GR fueron las siguientes, todas ellas en un volumen total de 40 ml:

- Disolución A: MV 20 mM preparado en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.
- Disolución B: ditionito 80 mg·ml⁻¹ preparado en NaHCO₃ 300 mM.
- Disolución C: GSSG 2 mM preparado en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.
- Disolución D: trifeniltetrazolio al 2,5% (p/v).

Todo el proceso que se detalla a continuación se realizó en una cámara inerte, en ausencia de oxígeno y presencia de N₂ gaseoso. El ensayo comenzó con la incubación del gel de electroforesis con la disolución A durante 10 minutos. A continuación, se desechó esta disolución y se adicionó la disolución B, incubándose el gel durante 2-3 minutos hasta alcanzar un color azul oscuro intenso debido al metil viológeno reducido. Seguidamente, se desechó la disolución B y se adicionó la disolución C, mediante la cual la actividad GR fue revelada por la presencia de bandas acromáticas sobre el fondo azul debido a la re-oxidación del metil viológeno, provocada por la actividad GR. Rápidamente, se desechó la disolución C, que cubría el gel, y se adicionó la disolución D, que reaccionó con el metil viológeno reducido

formando un derivado de color rojo intenso, excepto en aquellas zonas en las que se produjo la oxidación enzimática del metil viológeno, donde aparecían bandas acromáticas indicadas. Todo este proceso tuvo lugar a temperatura ambiente.

7.2.5. Tinción de la actividad glutamina sintetasa

El ensayo de actividad GS en gel se realizó por el método descrito por Winter et al. (1982). El ensayo comenzó sumergiendo el gel en 20 ml de una mezcla de reacción, conteniendo: 0,117 g de L-glutamina; 0,016 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,005 g de ADP; 33 ml de MOPS 500 mM, pH 7; 1 ml de hidroxilamina 1,2 M; 1 ml de NaOH 1,2 M; 1 ml de DTE 100 mM; 1 ml de $HAsO_4^{2-}$ 1 M. El gel se dejó en incubación durante 30 minutos a 40 °C. Después de eliminar la mezcla de reacción, se adicionó 20 ml del reactivo revelador de Fe(III) y se puso el gel a temperatura ambiente. La actividad GS fue revelada por la presencia de bandas de color marrón rojizas debido a la presencia del hierro.

7.2.6. Tinción de la actividad nitrato reductasa

El ensayo de actividad NiR en gel está basado en el uso del metil viológeno, un donador de electrones que pierde su color azul, tornándose incoloro al oxidarse (Vega y Kamin, 1977).

Las disoluciones utilizadas para la medida de actividad NiR fueron las siguientes, todas ellas en un volumen total de 20 ml:

- Disolución A: MV 20 mM y 2,0 g de ditionito sódico preparado en tampón Tris-HCl 500 mM, pH 7,5.
- Disolución B: $NaNO_2$ 30 mM preparado en tampón Tris-HCl 500 mM, pH 7,5.
- Disolución C: trifeniltetrazolio al 2,5% (p/v).

El ensayo comenzó con la incubación del gel de electroforesis con la disolución A. Después de 10 minutos de incubación, el gel quedó teñido de color azul debido a la reducción del metil viológeno. Posteriormente, esta disolución se desechó y se le adicionó la disolución B. La actividad NiR fue revelada por la presencia de bandas acromáticas sobre el fondo azul debido a la re-oxidación del metil viológeno, provocada por la actividad NiR. Rápidamente, se desechó la disolución B que cubría el gel y se adicionó la disolución C, que reaccionó con el metil viológeno reducido formando un derivado de color rojo intenso, excepto en aquellas zonas en las que se produjo la oxidación enzimática del metil viológeno, donde estaban las bandas acromáticas, correspondiente a la actividad NiR. Todo el proceso tuvo lugar a temperatura ambiente.

7.3. Determinación del peso molecular de las proteínas por NATIVE-PAGE

Para realizar esta determinación se cargaban, en uno de los pocillos de los geles de electroforesis, 5 µg de una mezcla de proteínas patrones, tratada en las mismas condiciones que las muestras.

- La mezcla para alto peso molecular (HitMarkTM ThermoFischer SCIENTIFIC) contiene proteínas con los siguientes pesos moleculares: 40, 55, 66, 97, 116, 160, 240, 290, 500 kDa.
- La mezcla para bajo peso molecular (PageRulerTM Unstained Protein Ladder) contiene proteínas con los siguientes pesos moleculares: 15, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa.

El peso molecular de las proteínas sujetas a estudio se determinó a partir de la representación lineal directa del logaritmo decimal de los pesos moleculares de las proteínas patrón frente a sus movilidades electroforéticas (R_f), calculadas según la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia de migración de cada proteína (cm)}}{\text{distancia de migración de azul de bromofenol (cm)}}$$

8. Determinaciones analíticas

8.1. Amonio

La concentración de amonio se determinó mediante el método de fenol-hipoclorito (Solorzano, 1969). A una parte alícuota de la muestra de hasta un volumen de 1,6 ml (conteniendo de 0 a 100 nmol de amonio) se le adicionaron, en el orden indicado, 0,2 ml de fenol al 10% (p/v) en etanol absoluto; 0,2 ml de una disolución de nitroprusiato sódico al 0,5% (p/v) en agua destilada; y 0,5 ml de una disolución oxidante, recientemente preparada. Tras agitación vigorosa en oscuridad durante un tiempo de 2 horas, se midió la absorbancia a 640 nm ($\epsilon = 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

El reactivo oxidante se preparó mezclando 20 volúmenes de una disolución alcalina estable (20 g de citrato trisódico dihidrato y 1 g de hidróxido sódico por cada 100 ml de agua destilada) y 5 volúmenes de una disolución de hipoclorito (1 ml de hipoclorito sódico comercial por cada 7 ml de agua destilada).

8.2. Clorofila

La determinación del contenido de clorofila en la microalga *C. onubensis* se llevó a cabo mediante el método de Marker (1972). Para ello, se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a 4400 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el botón celular obtenido se resuspendió en 5 ml de metanol, en tubos de centrifuga perfectamente cerrados (para evitar que el metanol se evapore). A continuación, la suspensión se calentó en un baño a 80 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se agitó vigorosamente durante 2 minutos para mejorar aún más la extracción, se volvió a centrifugar a 4400 rpm durante 5 minutos, y en el sobrenadante se determinó la absorbancia a 665 nm frente a un blanco de metanol ($\epsilon = 0,076 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

8.3. γ -glutamihidroxamato

El γ -glutamihidroxamato formado durante el ensayo de la actividad GS se determinó mediante una valoración con FeCl_3 en medio ácido según el método descrito por Betti (2005). Para ello, a 1 ml de mezcla de reacción se le adicionó 1 ml del reactivo revelador de Fe(III) (que contenía, en un volumen final de 1 L: 33,4 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 7,8 ml de HCl al 37% (v/v); 60,2 ml de ácido tricloroacético al 20% (p/v)). A continuación, para eliminar la turbidez, se centrifugó a 13400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 500 nm ($\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

8.4. Metales pesados y metaloide

La determinación del contenido de Cd, Cu, Zn y As en las muestras de la microalga *C. onubensis* se llevó a cabo mediante Espectrometría de Plasma con Detector de Masa (ICP-MS) (Figura 15) con celda de colisión. Para ello, se liofilizaron durante 48 horas las células obtenidas de cada cultivo. A continuación, se pesaron 0,05 g de cada muestra liofilizada en tubos de teflón y se sometieron a digestión ácida añadiendo 1 ml de HNO_3 , para posterior calentamiento en el microondas durante 2 minutos a 350 W. Después de enfriarse las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionó 1,5 ml de H_2O_2 , se volvieron a calentar en el microondas durante 2 minutos y se enrasaron en un matraz aforado de 5 ml con agua ultrapura Mili-Q. Por último, las muestras se diluyeron 10 veces adicionando, por pesada, 0,5 ml de muestra y 4,5 ml de agua ultrapura Mili-Q, y se les adicionó 0,1 ml de patrón interno preparados a una concentración de 500 ppb.

Para la medición de las muestras por ICP-MS con celda de colisión se utilizó un plasma de Ar, el cual se sustentó sobre una antorcha tipo Fassel, empleando los flujos de 0,5, 0,6 y 15 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ para los gases auxiliar, inyector y exterior, respectivamente, y una potencia de 1,9 kW. La muestra se introdujo mediante un

II. Materiales y Métodos

nebulizador de flujo cruzado a un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Como gas de reacción, se utilizó He a un flujo de $4,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Los distintos parámetros operativos se ajustaron mediante una disolución de calibración constituida por Li, Y, Ce y Tl para obtener la máxima señal y la mejor precisión. Además, se empleó una disolución multielemental estandarizada para la preparación de las curvas de calibración. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica del patrón interno, empleando para tal fin disoluciones de Sc, Rh, Tb y Ge. En la Tabla 5 se muestran las relaciones masa/carga utilizadas para la cuantificación, así como los límites de detección.



Figura 15. Sistema de Espectrometría de Plasma con Detector de Masa (ICP-MS)

Tabla 5. Masa seleccionada para la cuantificación de metales y metaloides, y límites de detección por ICP-MS.

Elemento	Masa/carga (m/z)	Límite de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
As	75	84,0
Cd	111	62,6
Cu	63	51,7
Zn	66	45,6

Para realizar el estudio de especiación de arsénico y poder ver el estado de oxidación en que se encontraba el metaloide en el interior celular de la microalga, se realizó una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a la Generación de Hidruros (HG) y a la Espectroscopía de Fluorescencia Atómica (AFS). Para ello, se pesó 0,1 g de muestra liofilizada y se disolvió en 10 ml de agua ultrapura Mili-Q. Seguidamente, se sonicó con una sonda de ultrasonidos durante un tiempo de 1 minuto a 50 W para, a continuación, tomar 0,1 ml de muestra y diluirla hasta un volumen de 10 ml con agua ultrapura Mili-Q. Por último, se filtró con un filtro de jeringa de $0,45 \mu\text{m}$ y se analizó por HPLC-HG-AFS.

8.5. Nitrato

El nitrato se determinó espectrofotométricamente por el método de Cawse (1967) tratando la muestra (conteniendo de 0 a 100 nmol de nitrato en un volumen máximo de 0,75 ml) con 0,05 ml de una disolución de ácido sulfámico al 10% (p/v). Tras agitar vigorosamente y esperar 2 minutos, se adicionaron 0,2 ml de una disolución de ácido perclórico al 20% (v/v) y se determinó la absorbancia a 210 nm ($\epsilon = 7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

8.6. Nitrito

El nitrito se determinó colorimétricamente según el método descrito por Snell y Snell (1949). Para ello, a una parte alícuota de muestra de hasta 1 ml (conteniendo de 10 a 60 nmol de nitrito), se le adicionaron 1 ml del reactivo de sulfanilamida al 1,5% (p/v) disuelto en HCl 2,5 N y 1 ml de *N*-(1-naftil)-etilendiamida al 0,02% (p/v) disuelto en agua destilada. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 540 nm ($\epsilon = 53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

8.7. Proteínas

El contenido de proteínas en los extractos crudos obtenidos a partir de las células se determinó según el método descrito por Bradford (1976). Este método consiste en la formación de un compuesto de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul Coomassie G-250.

A 0,1 ml de muestra se añadió 0,8 ml de agua destilada y 0,1 ml de reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad Protein Assay). Tras la adición del reactivo de Bradford, las muestras se agitaron suavemente, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm frente a un blanco en el que se sustituyó la muestra por agua destilada.

La concentración de proteínas en las muestras analizadas se obtuvo por interpolación de la absorbancia (595 nm) en una recta de calibrado obtenida previamente con seroalbúmina bovina (BSA) como patrón, abarcando un rango de concentración de 1-10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. El calibrado se realizó con una disolución de BSA al 0,02% (p/v), cuya concentración exacta se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción a 280 nm ($\epsilon = 0,69 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en una cubeta de cuarzo (Rideal y Roberts, 1951).

9. Otras técnicas experimentales

9.1. Diálisis

La eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones enzimáticas se llevó a cabo dializando las mismas mediante su inclusión en bolsas de celulosa SERVA de tamaño de poro 2,4 nm (Figura 16), frente al mismo tampón de muestra pero en ausencia de las moléculas a eliminar. El tratamiento se realizó a 4 °C y se prolongó durante, al menos, 12 horas.

Las membranas de diálisis fueron previamente hidratadas someténdolas a un tratamiento que consistía en hervirlas durante 20 minutos en una disolución de NaHCO_3 al 0,1% (p/v) y EDTA al 0,01% (p/v), y lavarlas a continuación con abundante agua destilada. Posteriormente, se almacenaron en una disolución de etanol al 25% (v/v) a 4 °C hasta su uso. Las membranas se lavaron exhaustivamente con agua destilada antes de introducir las preparaciones.

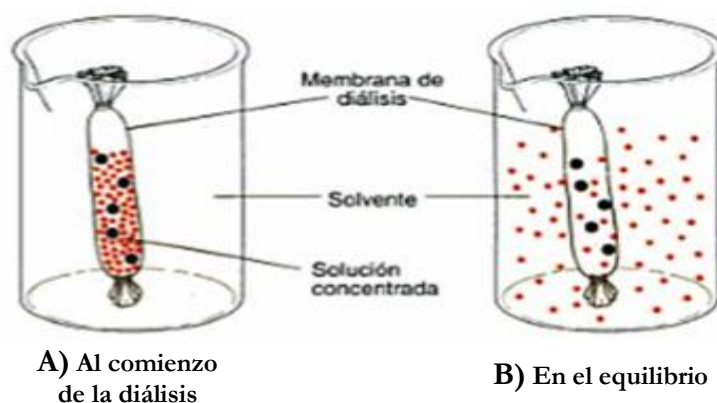


Figura 16. Uso de la diálisis para la eliminación de sales y moléculas pequeñas. Solo las moléculas pequeñas pueden difundirse a través de los poros de la bolsa de diálisis, que se muestra como una bolsa atada en ambos extremos (A). En el equilibrio, las concentraciones de moléculas pequeñas son casi similares dentro y fuera de la bolsa, mientras que las macromoléculas permanecen dentro (B).

9.2. Concentración de proteínas

La concentración de proteínas se realizó mediante ultrafiltración en una unidad AMICON para concentración de volúmenes grandes. Para volúmenes inferiores a 4 ml, se utilizó una unidad de concentración MICROCON YM-10 (Figura 17).

Para la unidad de concentración AMICON se utilizó una membrana Diaflo PM-10, que impide el paso de moléculas de peso superior a 10 kDa. El proceso se llevó a cabo a 4 °C bajo una presión de nitrógeno constante de $2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y con agitación suave de la preparación, la cual se concentró hasta un volumen mínimo de 4 ml.

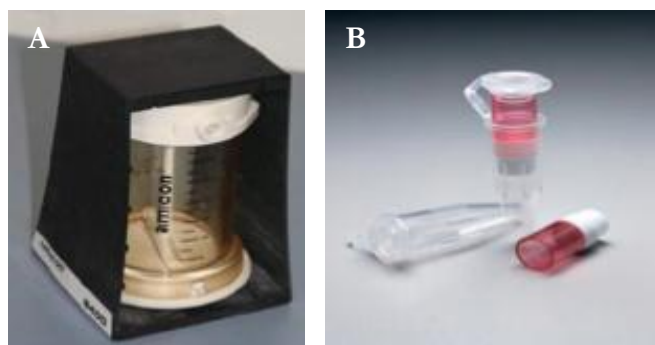


Figura 17. Unidad de concentración AMICON (A) y MICROCON YM-10 (B).

La unidad de concentración MICROCON YM-10 tiene un límite de exclusión de 10 kDa. El proceso se llevó a cabo por centrifugación a 4 °C bajo una aceleración máxima de 13400 rpm, concentrándose las muestras hasta un volumen, aproximadamente, de 50 μ l.

10. Reactivos y aparatos

10.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados, incluidos los líquidos, fueron suministrados por PANREAC, MERCK y SIGMA.

10.2. Aparatos

Las pesadas se efectuaron en balanzas COBOS (modelo CB Complet), METTLER TOLEDO (modelo AB104) y Precisa (modelo XT 120 A).

Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro CRISON (modelo BASIC 20).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro ultravioleta-visible Ultrospac (modelo 3100 “pro”), utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz de cuarzo, vidrio o plástico.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga refrigerada Biofuge Stratos (modelo Heracus instruments) con rotores #3335 y #3332 para la preparación del extracto crudo; y una centrífuga Eppendorf (modelo Centrifuge 5702) para la recolección de células. Para volúmenes de muestra inferiores a 2 ml, se utilizó la centrífuga Eppendorf (modelo MiniSpin).

II. Materiales y Métodos

Los ensayos a temperatura constante fueron realizados en baños termostatzados Tectron (modelo 3473100), ACCUBLOCK™ (modelo Digital Dry Bath), TECHNE Dri-Black® (modelo DB-2D) y ORTO ALRESA (modelo THERBA-D).

La agitación de disoluciones se llevaron a cabo en los agitadores magnéticos Heidolph REAX (modelo 2000) y P-SELECTA (modelo MOVIL-ROD).

Los geles de poliacrilamida se realizaron en un formador de geles Hoefer (modelo Mighty Small™ SE245).

Las electroforesis se realizaron en una unidad de electroforesis vertical Hoefer (Modelo Mighty Small II SE250/SE260).

Las electroforesis utilizaron una fuente de alimentación Electrophoresis Power (modelo EPS 1001).

La purificación parcial se realizó en un sistema de cromatografía rápida de proteínas o FPLC (fast protein liquid chromatography) ÄKTA Purifier (modelo Box-900), utilizando columnas de vidrio.

La medición de metales pesados y metaloide se realizó en un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente Agilent 7700 ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

La cromatografía líquida utilizada para la especiación del As se realizó utilizando una columna de intercambio iónico Hamilton PRPX100, con un tamaño de partícula de 10 µm, una longitud de 15 cm y un diámetro de 4,1 cm; además de una bomba Jasco (modelo PU-2089).

La espectroscopía de fluorescencia atómica utilizada para la especiación del As se realizó utilizando un espectrofotómetro Millenium Excalibur PS Analytical Ltd. con una superlámpara de As, primary source 27,5 mA, secondary source 35 mA.

III. Resultados y Discusión
Capítulo 1: Consumo de nitrógeno
por células de *Coccomyxa onubensis*
y estrés abiótico

1. Consumo de nitrógeno por células de *Coccomyxa onubensis* y estrés abiótico

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para los organismos fotosintéticos en general y para las microalgas en particular, constituyendo una parte relativamente importante para su crecimiento, ya que es el componente básico de los aminoácidos, proteínas, nucleótidos y clorofila, entre otras biomoléculas y metabolitos (Raven, 1992). Este primer capítulo se ha centrado en el estudio del comportamiento de las células de *Coccomyxa onubensis* (a partir de ahora *C. onubensis*) frente al consumo de diferentes fuentes nitrogenadas tales como nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) o nitrato amónico (NH_4NO_3), a distintos valores de pH. Los estudios se realizarán a pH neutro, ya que se encuentra en el rango de pH óptimo de crecimiento de la mayoría de las microalgas, entre las que se encuentran *Chlamydomonas reinhardtii* (Messerli et al., 2005), *Chlorella vulgaris* (Rachlin y Grosso, 1991) o *Dunaliella salina* (Ying et al., 2014); y a pH ácido, puesto que es el pH del medio natural del río Tinto, hábitat de la microalga *C. onubensis* (López-Archilla, 2005). También se ha comprobado el efecto que producen diferentes fuentes nitrogenadas sobre el pH del medio de cultivo y, además, se ha estudiado como distintos metales y metaloides actúan sobre el consumo de nitrato y amonio en la microalga *C. onubensis*.

1.1. Efecto del pH sobre el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas por *C. onubensis*

En el presente apartado se estudió cómo el pH puede afectar al consumo de KNO_3 , NH_4Cl o NH_4NO_3 , en cultivos de *C. onubensis*. En primer lugar, se presenta un estudio realizado a pH 7, en donde las fuentes nitrogenadas se utilizaron a una concentración de 0,25 mM.

Como se puede apreciar en la Figura 18, la microalga *C. onubensis* mostró una mayor afinidad por el amonio que por el nitrato. Así, prácticamente el 50% del amonio se consumió en un tiempo de 1 hora, para haberlo consumido totalmente a las 2 horas de ensayo, con una velocidad de $4,41 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$. En el cultivo inoculado con nitrato se aprecia como la microalga consume más despacio la fuente nitrogenada ($2,49 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$), consumiendo un 50% en un intervalo de tiempo de 2,5 horas, necesitándose 4 horas para consumir totalmente la fuente nitrogenada.

Cuando el ensayo se realizó a pH 2,5 (Figura 19), pH del hábitat natural de la microalga *C. onubensis*, los resultados fueron bastante similares. De nuevo, la velocidad de consumo fue mayor para el amonio ($4,07 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$) que cuando se utilizó nitrato como fuente nitrogenada ($2,60 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$), con valores parecidos a los obtenidos a pH 7.

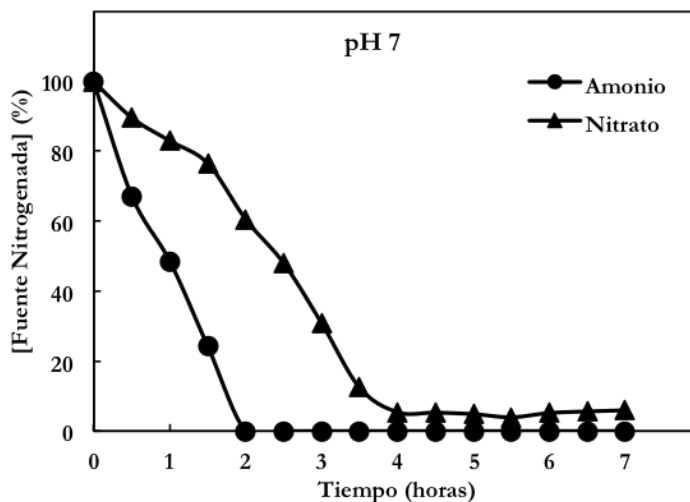


Figura 18. Consumo de distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por células de *C. onubensis*, a pH 7. Los cultivos (de 250 ml) se inocularon a una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de fuente nitrogenada, y a tiempo 0 se les adicionó KNO_3 o NH_4Cl , a una concentración de $0,25 \text{ mM}$ (100%). A los tiempos indicados, se determinó la concentración de la fuente nitrogenada, según se indica en Materiales y Métodos.

Al realizar el ensayo utilizando una fuente combinada de nitrógeno, NH_4NO_3 , se observaron pequeñas diferencias en función del pH de los cultivos celulares. La Figura 20 muestra la desaparición de las distintas formas combinadas de nitrógeno (amonio y nitrato) a pH 7. Como se puede apreciar, cuando las dos fuentes están presentes en el medio de cultivo, las células de *C. onubensis* comenzaron a consumir el amonio de forma rápida, aunque se apreció, a la vez, un ligero consumo de nitrato en las primeras horas del estudio. Así, puede observarse que existen dos pendientes para la desaparición de nitrato, una en el intervalo de 0-2,5 horas ($1,24 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$); y la otra en el intervalo de tiempo de 2,5-7 horas, donde el cultivo consume de forma más rápida ($2,72 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$) el resto del NO_3^- presente en el medio, una vez consumido el amonio.

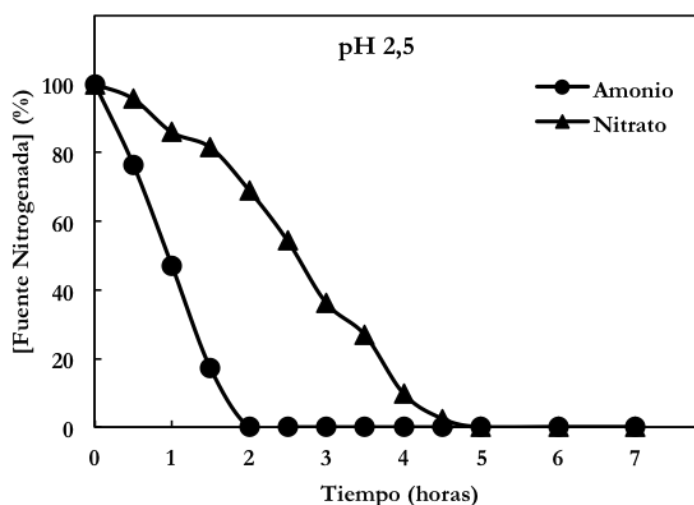


Figura 19. Consumo de distintas fuentes de nitrógeno inorgánico por células de *C. onubensis*, a pH 2,5. Los cultivos se inocularon a una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de nitrógeno, y a tiempo 0 se les adicionó KNO_3 o NH_4Cl a una concentración de 0,25 mM (100%). A los tiempos indicados, se determinó la concentración de la fuente nitrogenada, según se indica en Materiales y Métodos.

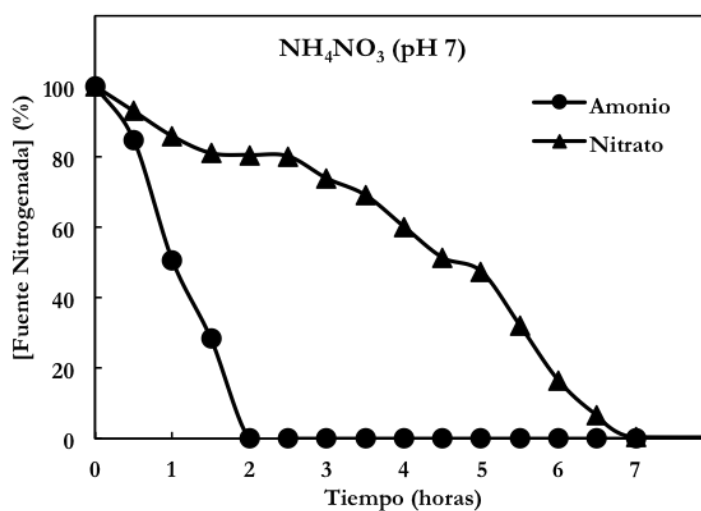


Figura 20. Consumo de nitrato amónico por células de *C. onubensis*, a pH 7. Los cultivos se inocularon a una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de nitrógeno, y a tiempo 0 se les adicionó NH_4NO_3 0,25 mM (100%). A los tiempos indicados, se determinó la concentración de la fuente nitrogenada, según se indica en Materiales y Métodos.

Sin embargo, este hecho no se observó cuando el estudio se realizó a pH 2,5 (Figura 21), donde se apreció como las células de *C. onubensis* consumieron primero el NH_4^+ , comenzando a consumirse el NO_3^- una vez desaparecido todo el amonio.

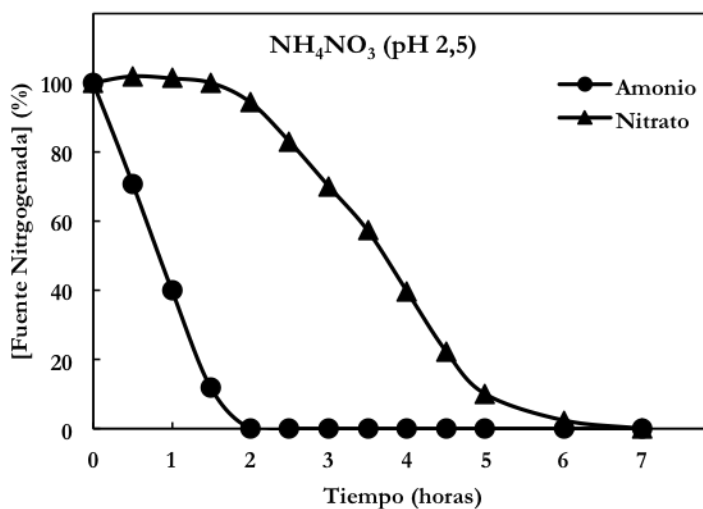


Figura 21. Consumo de nitrato amónico por células de *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se crecieron a pH 2,5 con NH_4NO_3 . A los tiempos señalados, se determinó la concentración de la fuente nitrogenada en los cultivos correspondientes, correspondiendo el 100% a una concentración de 0,25 mM. Más detalles en Materiales y Métodos.

Entre las distintas formas combinadas de nitrógeno inorgánico susceptibles de utilización por *C. onubensis*, la Tabla 6 recoge un resumen comparativo de los valores de velocidad de consumo obtenidos en cada ensayo.

Tabla 6. Valores de las velocidades de consumo de las distintas fuentes de nitrógeno inorgánico en *C. onubensis*.

	Fuente nitrogenada		NH_4NO_3	
	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-
pH 2,5	4,07	2,60	4,26	0,05 2,90
pH 7	4,41	2,49	4,69	1,24 2,72

La velocidad de consumo de cada fuente nitrogenada se obtuvo al dividir la pendiente obtenida por la concentración de clorofila media obtenida tras la medición inicial y final de cada cultivo. Los valores obtenidos están expresados en $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg chl}^{-1}$.

Como se puede apreciar en la Tabla 6, el pH del medio de cultivo no afecta de manera significativa a las velocidades de consumo de las diferentes fuentes nitrogenadas (nitrato y amonio) en cultivos de *C. onubensis*, obteniéndose valores muy similares a cada pH. No obstante, las velocidades de consumo son muy inferiores a las obtenidas para otras microalgas, como es el caso de *C. reinhardtii*, donde rondan los $10,7 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$ para NO_3^- y $10,1$ para NH_4^+ (Garbayo et al., 2002); de hecho, la microalga *C. onubensis* es un alga de lento crecimiento, situándose su tasa de crecimiento en $0,19 \text{ días}^{-1}$ (Ruiz-Domínguez, 2013). En el caso de *C. reinhardtii*, las dos fuentes de nitrógeno se consumen a una velocidad similar, mientras que en la microalga *C. onubensis* la velocidad de consumo de amonio es dos veces superior a la de nitrato (independientemente del pH).

En general, el consumo de NO_3^- en algas y plantas está regulado por distintos factores, así, se estimula por distintas fuentes de carbono, luz o carencia de nitrógeno, y se inhibe por la presencia de cloruro, amonio, glutamina o altas concentraciones de nitrato (Florencio y Vega, 1982; Guerrero et al., 1981; Tischner, 2000; Márquez y Cánovas, 2004). En este sentido, en los cultivos de *C. onubensis* se apreció el efecto inhibitorio del amonio sobre el consumo de nitrato. Este hecho fue más patente a pH ácido (Figura 21), donde la inhibición fue completa; mientras que a pH 7 (Figura 20), se observó un consumo simultáneo de ambas fuentes nitrogenadas durante las primeras horas de ensayo, aunque siempre el consumo de nitrato a velocidad muy inferior a la del amonio, tal y como se muestra en la Tabla 6.

1.2. Efecto que produce el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas sobre el pH del medio de cultivo de *C. onubensis*

El consumo de nitrógeno en plantas y microalgas se encuentra guiado por distintos transportadores específicos de diferente naturaleza y características, que hacen que su transporte al interior celular esté acompañado de la transferencia de protones, en uno u otro sentido, que pueden provocar cambios en el pH del medio del cultivo celular (Martínez, 2008; Park et al., 2011; Hernández-Pérez y Labbé, 2014). En este sentido, se ha estudiado en *C. onubensis* cómo afecta el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas, tales como KNO_3 , NH_4Cl , y NH_4NO_3 , al pH del medio de cultivo.

La Figura 22 muestra el efecto que provocó el consumo de nitrato, a una concentración de $22,75 \text{ mM}$, sobre el pH de dos cultivos de *C. onubensis* inoculados a diferente pH (2,5 y 7) en un intervalo de tiempo de 13 días. En la figura se aprecia cómo en el cultivo inoculado a pH 2,5, se produjo un aumento del pH hasta un valor de 6,2 en un intervalo de tiempo de 5 días, observándose posteriormente un ligero aumento (siempre inferior a pH 7) durante el resto de días que duró de ensayo. Por su parte, el cultivo ajustado en un principio a pH 7, mantuvo su valor de pH inicial durante los 13 días que duró el ensayo.

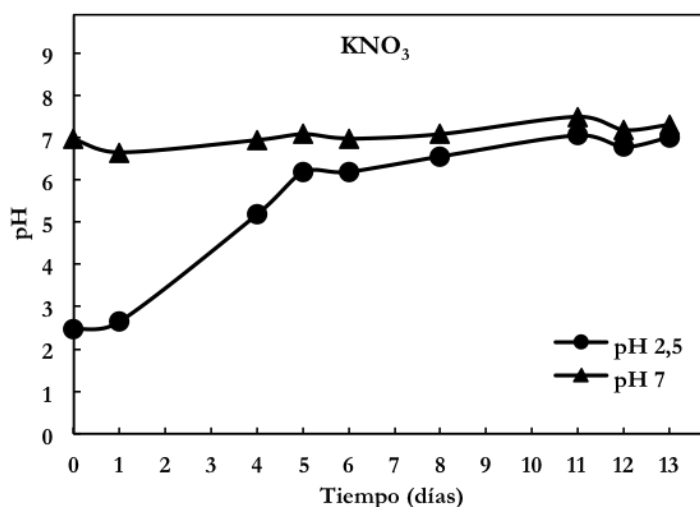


Figura 22. Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de *C. onubensis*, en células cultivadas en nitrato. Los cultivos (de 250 ml) se inocularon con una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de fuente nitrogenada y los cultivos se ajustaron a los pH indicados, y a tiempo 0 se les adicionó KNO_3 a una concentración de 22,75 mM. Periódicamente se determinó el pH a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento.

La Figura 23 muestra el efecto que provocó el consumo de amonio (22,75 mM) sobre el pH de dos cultivos de *C. onubensis* inoculados inicialmente a diferente pH (2,5 y 7). A diferencia de lo ocurrido en los cultivos crecidos con nitrato, se aprecia en la figura como el cultivo inoculado a pH 2,5 mantuvo constante el valor de pH durante todo el tiempo que duró el ensayo, mientras que en el cultivo inoculado a pH 7 se observó una caída drástica del pH del medio de cultivo hasta un valor de 3,5 en un intervalo de tiempo de 2 días, manteniéndose constante hasta finalizar el ensayo.

A continuación, se realizó un estudio con fuente de nitrógeno combinada. Así, la Figura 24 muestra el efecto provocado sobre el pH cuando las células de *C. onubensis* se crecieron en presencia de nitrato amónico a una concentración de 22,75 mM. De nuevo, se prepararon dos cultivos inoculados a diferente pH (2,5 y 7), realizando el estudio en un intervalo de tiempo de 13 días. En la figura se puede apreciar un efecto bastante parecido al observado en células crecidas con amonio, así, el cultivo inoculado con nitrato amónico a pH 2,5 mantuvo constante el valor de pH durante todo el tiempo que duró el ensayo, mientras que el cultivo inoculado a pH 7 mostró una caída del valor de pH hasta 2,6.

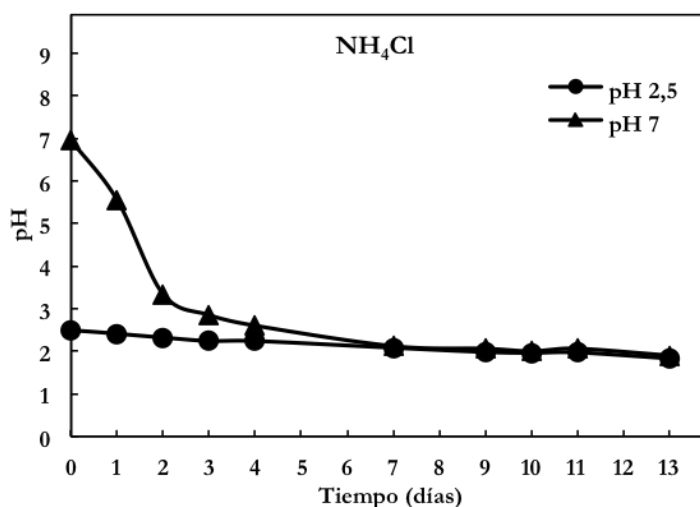


Figura 23. Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de *C. onubensis*, en células cultivadas en amonio. Los cultivos (de 250 ml) se inocularon con una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de fuente nitrogenada y los cultivos se ajustaron a los pH indicados. A tiempo 0 se les adicionó NH_4Cl a una concentración de 22,75 mM. Periódicamente se determinó el pH a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento.

No obstante, es importante destacar que en el cultivo crecido con nitrato amónico a pH 7 (Figura 24), la caída observada del pH fue menos drástica que la detectadas en amonio al mismo pH (Figura 23), ya que ocurrió en un intervalo de tiempo mayor (5 días), en lugar de los 2 días observado para el amonio. Estos resultados muestran la existencia de un ligero amortiguamiento del descenso del pH cuando ambas fuentes, nitrato y amonio, están presentes en el medio de cultivo.

El efecto de acidificación observado en presencia de NH_4^+ sobre el medio de cultivo de *C. onubensis*, inicialmente inoculado a pH 7, podría explicarse a partir del mantenimiento de la electroneutralidad de las células de la microalga. La carga total de cationes es nivelada o igualada a la carga de aniones, es decir, cuando un catión es absorbido, un anión también es absorbido o un catión es liberado; así, la absorción de NH_4^+ puede ser acompañada de la liberación de un protón, afectando con ello al pH del medio de cultivo de la microalga, acidificándolo. Este tipo de comportamiento ha sido documentado con anterioridad por diversos autores (Cao y Tibbitts, 1994; Marschener, 1995), lo que justifica la acidificación observada en los cultivos de *C. onubensis* crecidos en presencia de NH_4^+ como fuente nitrogenada.

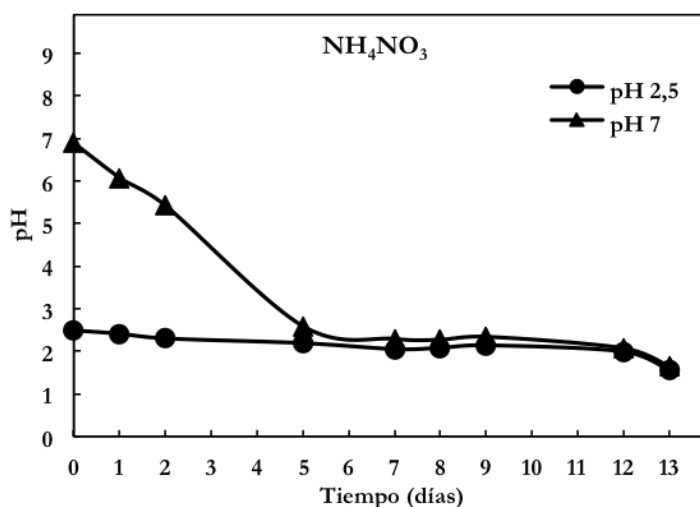


Figura 24. Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de *C. onubensis*, en células cultivadas en nitrato amónico. Se procedió igual que en el caso anterior, pero adicionando, a tiempo 0, NH_4NO_3 a una concentración de 22,75 mM. Periódicamente se determinó el pH a lo largo de todo el tiempo que duró el experimento.

En el caso del NO_3^- , el efecto observado sobre el pH del medio de *C. onubensis*, inicialmente inoculado a pH 2,5, es contrario al producido por el NH_4^+ , es decir, se produjo una alcalinización del medio. En este caso, se ha indicado previamente que el NO_3^- es cotransportado con H^+ con una estequiometría de $2\text{H}^+:1\text{NO}_3^-$, lo cual explica la alcalinización del medio externo, como ocurre en plantas cuando absorben NO_3^- , la cual se acompaña de la absorción de H^+ para mantener el balance de cargas (Maldonado, 1993). Este tipo de comportamiento también ha sido documentado con anterioridad por diversos autores (Hageman, 1992), lo que justifica que la absorción de nitrato por parte de *C. onubensis* incremente los valores de pH del medio de cultivo.

Por su parte, el nitrato amónico aporta, a la vez, iones NO_3^- e iones NH_4^+ . Como se ha indicado anteriormente en algas y plantas, el consumo de NO_3^- se inhibe por la presencia de amonio, entre otros compuestos. De esta forma, en el estudio realizado con nitrato amónico (Figura 24), la presencia de amonio evitaría la absorción de nitrato y el experimento sería similar al mostrado en la Figura 23 (solo con amonio), de ahí que se obtengan resultados parecidos, aunque con una ligera amortiguación de la bajada de pH (del cultivo a pH 7), anteriormente citada. Esto podría justificarse con los resultados obtenidos en la Figura 20, donde se observó un consumo parcial simultáneo de amonio y nitrato a pH 7. Así, el cotransporte de protones provocado por el consumo parcial de nitrato al interior celular contrarrestaría el antiporte de protones derivados del consumo de amonio.

Debido a que el nitrato amónico aportado al cultivo estaba a una concentración relativamente alta (22,75 mM), en la Figura 24 (cultivo crecido con nitrato amónico) no pudo observarse una supuesta alcalinización del medio de cultivo a pH 7 debida al consumo de nitrato una vez agotado el amonio. Para comprobar si realmente ocurre esto, se realizó un ensayo similar al anterior, pero utilizando nitrato amónico a una concentración más baja (2,5 mM). Los resultados se muestran en la Figura 25, donde se puede apreciar cómo en el cultivo inoculado a pH 7 se produjo la acidificación inicial del pH hasta un valor de 3,9 provocada por el antiporte de protones debido al consumo inicial de amonio, seguido de un incremento del valor de pH a partir del segundo día hasta un valor de 6,3, resultante del cotransporte de protones debido al consumo de nitrato.

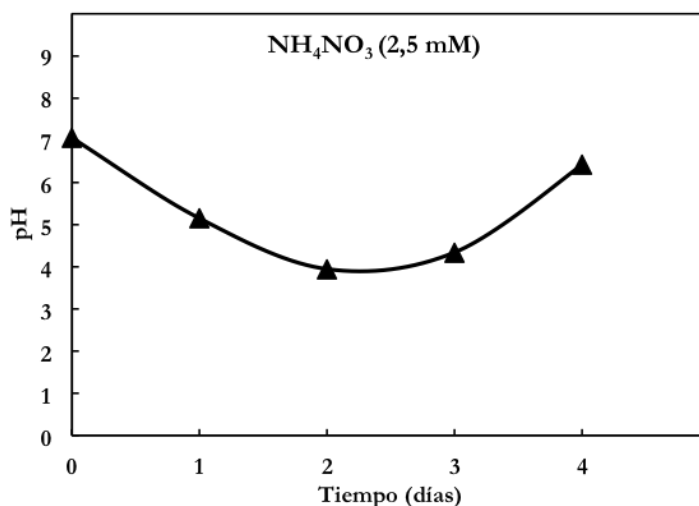


Figura 25. Efecto producido sobre el pH del medio de cultivo de *C. onubensis*, en células cultivadas en nitrato amónico (2,5 mM). El cultivo (de 250 ml) se inoculó con una concentración de clorofila de $30 \mu\text{g chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ a partir de un cultivo madre en fase exponencial, crecido con nitrato. Las células se lavaron previamente con medio carente de fuente nitrogenada y el cultivo se ajustó a pH 7. A a tiempo 0 se le adicionó NH_4NO_3 a una concentración de 2,5 mM. Periódicamente se determinó el pH a lo largo del tiempo que duró el experimento.

La Figura 25 muestra de manera conjunta la acidificación del medio de cultivo de *C. onubensis* debido a la asimilación del NH_4^+ y la alcalinización posterior del medio de cultivo debida a la asimilación del NO_3^- , tal y como se ha indicado en otros organismos fotosintéticos (Márquez y Cánovas, 2004).

1.3. Efecto que produce diversos metales pesados sobre el consumo de diferentes fuentes nitrogenadas de *C. onubensis*

El efecto tóxico de los metales pesados y algunos metaloides sobre los sistemas vivos es uno de los principales problemas derivados de la contaminación ambiental, llegando a afectar a procesos fisiológicos y bioquímicos, entre los que se incluyen la reducción en el crecimiento, fotosíntesis, contenido de clorofila, inhibición de actividades enzimáticas y degeneración de cloroplastos y mitocondrias (Reddy y Prasad, 1990; Devriese et al., 2001). Los organismos fotosintéticos responden al estrés metálico mediante distintos mecanismos, entre los que se encuentran la exclusión de los metales observado en plantas (Baker, 1978), la compartimentación de los metales en las vacuolas (Brookes et al., 1981) y paredes celulares (Turner, 1970), la evolución de las enzimas tolerantes a los metales (Wainwright y Woolhouse, 1975) y la producción de compuestos metal-quelantes (Grill et al., 1985; Reese y Wagner, 1987). Por otro lado, el potencial biotecnológico de las microalgas para eliminar la contaminación de metales en agua (Mallick, 2002) hace que sea especialmente interesante su estudio en organismos extremófilos, no solo con idea de estudiar su resistencia a la presencia de estos metales, así como de los posibles efectos derivados de su presencia en el medio de cultivo, sino también para comprobar su potencial biotecnológico como sistemas bioacumuladores de metales pesados.

Diferentes metales y metaloides fueron estudiados a diferentes concentraciones para ver el efecto que provocaban sobre el consumo de dos fuentes nitrogenadas (NH_4Cl y KNO_3) en la microalga extremófila *C. onubensis*. Todos los estudios se han realizado a pH 2,5, característico del hábitat natural de la microalga.

1.3.1. Efecto del cadmio sobre el consumo de nitrato y amonio

Las siguientes figuras muestran el efecto que provocaron diferentes concentraciones de cadmio (Cd^{2+}) sobre el consumo de nitrato (Figura 26) y de amonio (Figura 27) en cultivos de *C. onubensis*, crecidos a pH 2,5. Las concentraciones de Cd^{2+} utilizadas fueron las indicadas en las figuras, además de un control, crecido en ausencia del metal. Durante todo el tiempo que duró el ensayo, se realizó un seguimiento de la concentración de la fuente nitrogenada en el medio de cultivo, tomando puntos cada 15-30 minutos a efecto de calcular los valores de velocidad de consumo, reflejados en la Figura 28.

Como puede apreciarse en la Figura 26, todos los cultivos, excepto los inoculados con Cd^{2+} 1 y 5 mM, consumieron el NO_3^- presente en el medio durante las 4,5 horas que duró el ensayo, si bien en el cultivo control la desaparición de nitrato siempre fue más rápida que en el resto de cultivos. No se observó un efecto importante debido a la concentración de Cd^{2+} , pues se aprecia que, tanto a 15 como a 500 μM de Cd^{2+} , las curvas de desaparición de nitrato del medio de cultivo fueron

similares, siendo necesario alcanzar concentraciones de hasta 1 y 5 mM para ver un efecto más significativo sobre el consumo de nitrato.

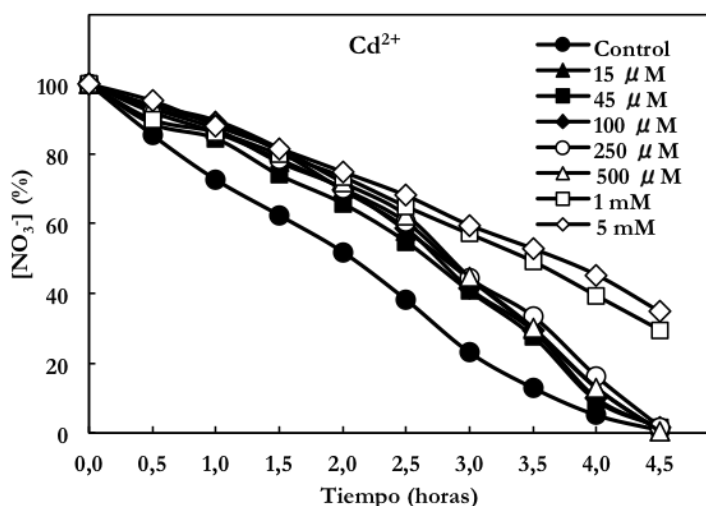


Figura 26. Efecto del cadmio sobre el consumo de nitrato por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de KNO₃ 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de Cd²⁺, añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NO₃⁻ según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

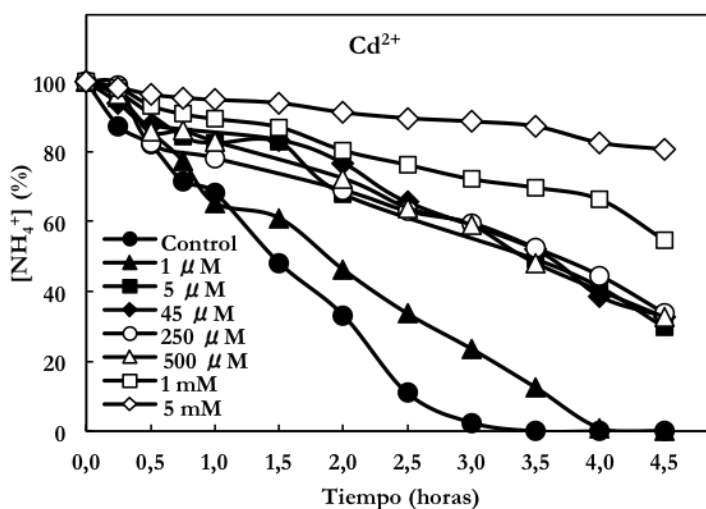


Figura 27. Efecto del cadmio sobre el consumo de amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. Se mantuvieron las mismas condiciones que en el ensayo anterior, pero utilizando como fuente nitrogenada NH₄Cl a una concentración de 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de Cd²⁺ a las concentraciones indicadas. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NH₄⁺ en los cultivos correspondientes según se describe en Materiales y Métodos.

A diferencia de lo ocurrido en presencia de NO_3^- , se observó un mayor efecto provocado por el Cd^{2+} sobre el consumo de NH_4^+ (Figura 27). Así, durante la primera hora de ensayo, todos los cultivos mantuvieron un comportamiento similar, con una leve diferencia a favor del cultivo control. No obstante, a partir de ese tiempo, los cultivos inoculados a diferentes concentraciones de Cd^{2+} comenzaron a diferenciarse, observándose una disminución en la velocidad de desaparición de la fuente nitrogenada del medio de cultivo. Tras 3 horas de ensayo, en el cultivo control se había consumido todo el amonio, mientras que en presencia del metal aún quedaba entre un 60-80% del NH_4^+ sin consumir, a excepción del cultivo con 5 mM del metal, cuya inhibición del consumo de amonio fue prácticamente total.

Estas diferencias encontradas entre ambas fuentes nitrogenadas pueden observarse con mayor claridad en la Figura 28, donde se muestra de manera comparada el efecto del Cd^{2+} sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio.

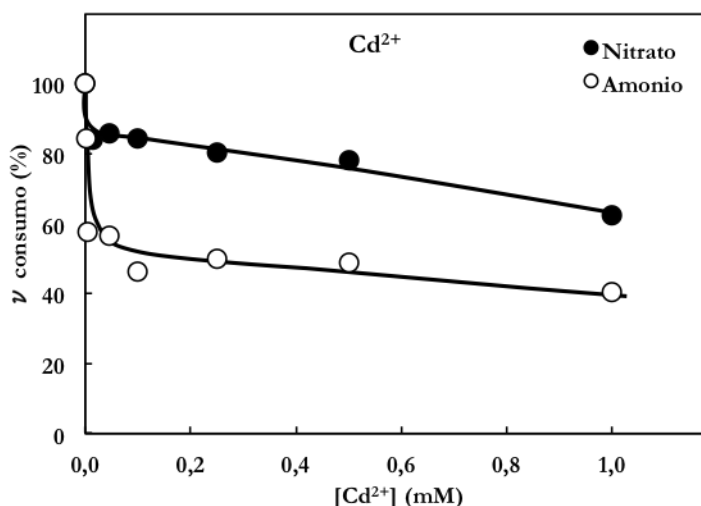


Figura 28. Efecto del cadmio sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. La velocidad de consumo de cada fuente nitrogenada se obtuvo al dividir la pendiente obtenida por la concentración de clorofila media, tras la medición inicial y final de cada cultivo mostrado en las Figuras 26 y 27. El 100% corresponde a 2,85 y 3,65 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$ para nitrato y amonio, respectivamente.

Como se puede apreciar en la Figura 28, mientras que la presencia de Cd^{2+} a una concentración de 0,5 mM inhibe en torno al 20% la velocidad de consumo de nitrato, en el caso del amonio la inhibición llega a ser del 50%, si bien los cultivos siguieron consumiendo la fuente nitrogenada, aunque a una menor velocidad; no obstante, al seguir aumentando la concentración del metal hasta 5 mM, la inhibición de consumo de ambas fuentes nitrogenadas aumentaron, llegando a ser de un 40% en el caso del nitrato y un 90% en el caso del amonio (Figuras 26 y 27). Estos datos contrastan con

los observados en otras microalgas, como es el caso del alga modelo *C. reinhardtii*, donde el consumo de nitrato y de amonio se inhibe fuertemente por la presencia de Cd^{2+} (a concentraciones en torno a 150 μM), siendo también la inhibición mayor sobre el consumo de amonio que sobre el consumo de nitrato (Domínguez, 2008). Los resultados ponen de manifiesto la resistencia a cadmio que muestra el consumo de nitrógeno en la microalga extremófila *C. onubensis*.

El Cd^{2+} es considerado como un elemento de toxicidad intermedia, ya que a concentraciones entre 0,04-0,32 mM, no es tóxico para las plantas (Wagner, 1993), pero a concentraciones entre 0,32-1 mM, se considera tóxico a un nivel moderado (Benavides et al., 2005). Otros autores también han discutido sobre el efecto que provoca la presencia de Cd^{2+} sobre el metabolismo del nitrógeno en varias plantas (Astolfi et al., 2004; Chaffei et al., 2004; Balestrasse et al., 2006; Hsu et al., 2006), así se ha indicado la inhibición tanto del consumo como del transporte de nitrato, además de otros procesos enzimáticos de la asimilación de nitrógeno (Hernández et al., 1997). Tras la exposición al Cd^{2+} , a menudo las plantas sintetizan un conjunto de metabolitos que contienen nitrógeno, tales como la prolina, el glutatión y las fitoquelatinas, que desempeñan un papel importante en la tolerancia al Cd^{2+} y que, como consecuencia, hacen que las plantas puedan presentar una mayor tolerancia al metal (Wang et al., 2008). Un mecanismo similar de desintoxicación de Cd^{2+} se ha propuesto para otras microalgas tales como *Englena gracilis* (Mendoza-Cózatl et al., 2006), que almacena Cd^{2+} dentro del cloroplasto, ya que esta microalga carece de vacuolas (Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005); *Stigeoclonium* sp. (Pawlik-Skowronska, 2001); la diatomea marina *Phaeodactylum tricornerutum* (Morelli y Scarano, 2001); y *C. reinhardtii* (Hu et al., 2001), aunque en esta última microalga el 60% del Cd^{2+} se acumula en cloroplastos (Nagel et al., 1996) y los niveles de fitoquelatinas no se correlacionan con la cantidad de Cd^{2+} acumulado por la microalga (Nishikawa et al., 2006).

1.3.2. Efecto del cobre sobre el consumo de nitrato y amonio

A diferencia del Cd^{2+} , el cobre (Cu^{2+}) presenta una mayor toxicidad incluso a concentraciones más bajas, según se ha descrito para plantas y microalgas (Clarkson y Hanson, 1980; Fernandes y Henriques, 1991). En este sentido, se ha realizado un estudio del efecto que provoca este metal sobre los consumos de nitrato (Figura 29) y amonio (Figura 30) en la microalga extremófila *C. onubensis*. Las concentraciones de Cu^{2+} utilizadas fueron: 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1 y 5 mM, además de un control, que se caracterizó por la ausencia del metal en el medio de cultivo.

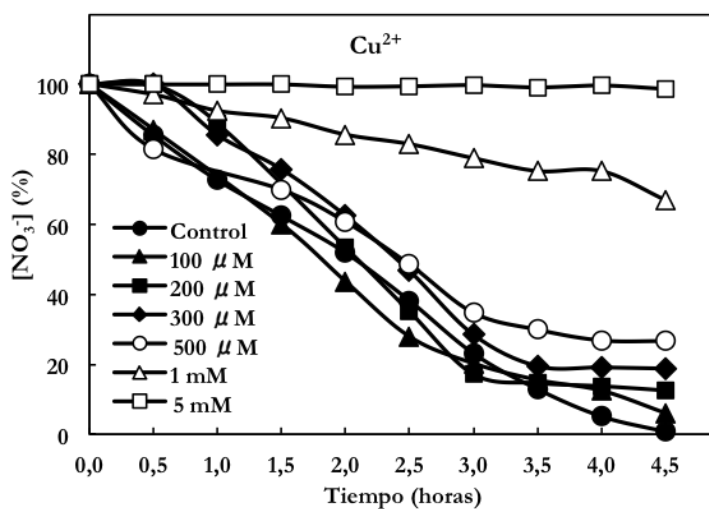


Figura 29. Efecto del cobre sobre el consumo de nitrato por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de KNO₃ a una concentración inicial de 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de Cu²⁺, añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NO₃⁻ en los cultivos correspondientes, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

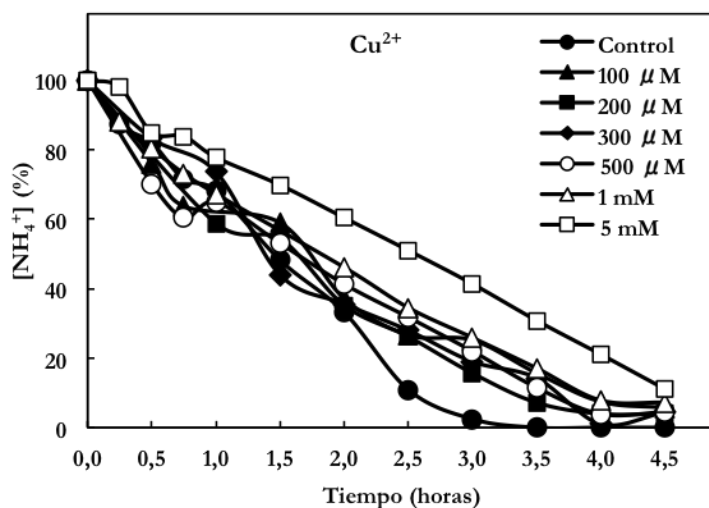


Figura 30. Efecto del cobre sobre el consumo de amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de NH₄Cl 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de las concentraciones indicadas de Cu²⁺, añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NH₄⁺ en los cultivos correspondientes, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

En la Figura 29 puede apreciarse cómo durante las 4,5 horas que duró el ensayo, en los cultivos inoculados con 100 y 200 μM de Cu^{2+} , la desaparición de NO_3^- fue similar al cultivo control. Esto no ocurrió para concentraciones de 300 y 500 μM de Cu^{2+} , donde se observó una ligera inhibición del consumo en los cultivos, especialmente en la primera media hora de ensayo. No obstante, el efecto fue menos significativo que el observado con el cadmio. Al seguir aumentando la concentración del metal, se observó una inhibición del consumo del nitrato de un 70% a una concentración de 1 mM, siendo total cuando se aumentó 5 veces la concentración de Cu^{2+} .

Por otro lado, para el consumo de amonio (Figura 30), durante la primera hora de ensayo, las curvas de desaparición de NH_4^+ se mostraron similares en todos los casos, aunque durante el resto del ensayo se observó una ligera disminución en el consumo de la fuente nitrogenada, siendo más acentuado en el cultivo inoculado en presencia de Cu^{2+} 5 mM, de manera que a las 3 horas de ensayo, el cultivo control consumió todo el NH_4^+ presente en el medio, mientras que el resto de cultivos tardó 4 horas.

Los resultados obtenidos pueden observarse de manera conjunta en la Figura 31, donde se aprecia cómo las velocidades de consumo para ambas fuentes nitrogenadas se mantuvieron siempre en torno al 80% de las obtenidas en los cultivos control hasta concentraciones de Cu^{2+} de 0,5 mM. Al aumentar la concentración del metal a 1 mM, el efecto inhibitor aumentó hasta el 60% en el caso del nitrato; mientras que el consumo de amonio se mantuvo solo un 20 % inhibido.

Estos resultados contrastan con los observados en otras microalgas y plantas; así, en *C. reinhardtii*, la inhibición del consumo llegó a ser del 100% para una concentración de Cu^{2+} igual o superior a 150 μM en el medio de cultivo (Domínguez, 2008). De la misma manera, se ha descrito la inhibición del consumo de nitrógeno por Cu^{2+} en las microalgas *Closterium moniliferum* (Christenson, 1983) y *Anacystis nidulans* (Kashyap y Gupta, 1982), así como en el hongo *Neurospora crassa* (Rao et al., 1984). Otros autores también han indicado en plantas la inhibición por Cu^{2+} sobre el consumo de NH_4^+ y NO_3^- , como es el caso de *Elsoltzia haichowensis* S. (Li et al., 2007a) o *Silene vulgaris* (Weber et al., 1991). En la mayoría de los estudios publicados, la inhibición por Cu^{2+} se observa a concentraciones inferiores a las utilizadas en el caso de *C. onubensis*. Los resultados ponen de manifiesto la alta resistencia del consumo de nitrógeno en *C. onubensis* a la presencia de Cu^{2+} en el medio de cultivo.

Por otro lado, el pH es un factor muy importante que influye en la toxicidad del Cu^{2+} sobre las plantas y algas, ya que ésta es máxima a pH neutro, tal y como se ha indicado en el alga *Scenedesmus quadricauda*, en la cual se aumentó 76 veces su toxicidad por Cu^{2+} al subir el valor de pH de 5 a 6,5 (Peterson et al., 1984), lo que justificaría la menor toxicidad por cobre observada en *C. onubensis* respecto a otros organismos y plantas, ya que la microalga se encuentra crecida a pH ácido.

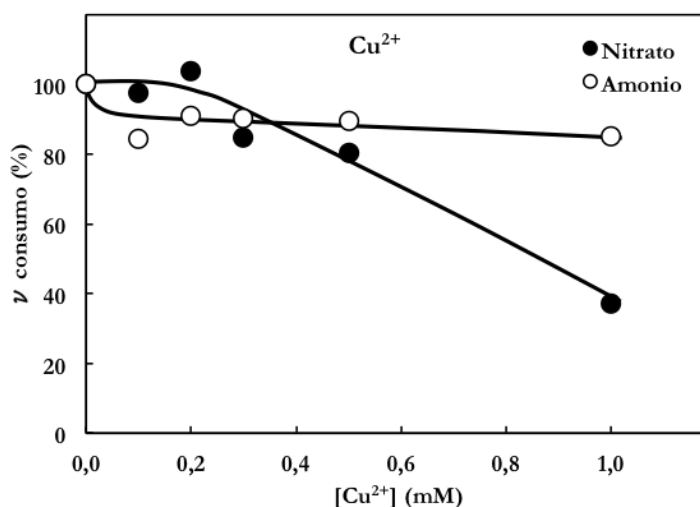


Figura 31. Efecto del cobre sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. La velocidad de consumo de cada fuente nitrogenada se obtuvo al dividir la pendiente obtenida por la concentración de clorofila media, tras la medición inicial y final de cada cultivo mostrado en las Figuras 29 y 30. El 100% corresponde a 2,88 y 3,74 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$ para nitrato y amonio, respectivamente.

Aunque algunas plantas y algas son extremadamente susceptibles a la toxicidad del Cu^{2+} , otras son capaces de crecer expuestas a un alto contenido de Cu^{2+} presentando tolerancia hacia el metal (Fernandes y Henriques, 1991). Entre los mecanismos que utilizan para minimizar los efectos del Cu^{2+} se incluyen la exclusión, la unión extracelular, la precipitación en el exterior de la membrana celular y la utilización de sitios intracelulares no sensibles al Cu^{2+} (Stokes, 1979; Rauser y Curvetto, 1980). En plantas se ha indicado la presencia de proteínas (metalotioneínas) implicadas en el secuestro del Cu^{2+} y otros metales pesados, así como de fitoquelatinas, que poseen la capacidad de unirse a cationes metálicos a través de los grupos tiólicos de los residuos de cisteína, secuestrándolos y actuando a nivel de transporte, almacenamiento y excreción del metal (Kneer y Zenk, 1992; Joshi et al., 2015).

1.3.3. Efecto del mercurio sobre el consumo de nitrato y amonio

Continuando con el estudio del estrés metálico sobre el consumo de nitrógeno en *C. onubensis*, en las Figuras 32 y 33 se muestra el efecto que provocó diferentes concentraciones de mercurio (Hg^{2+}) sobre el consumo de nitrato y amonio, respectivamente, en cultivos celulares de la microalga crecidos a pH 2,5.

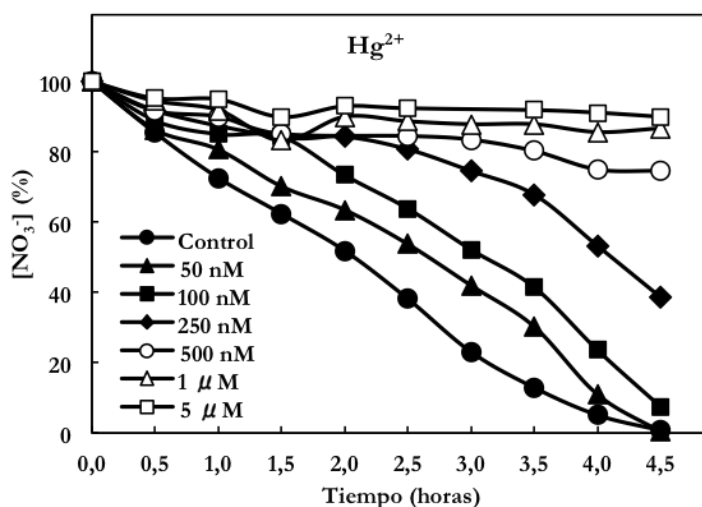


Figura 32. Efecto del mercurio sobre el consumo de nitrato por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de KNO₃ a una concentración inicial de 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de Hg²⁺, añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NO₃⁻ en los cultivos, según se describe en Materiales y Métodos.

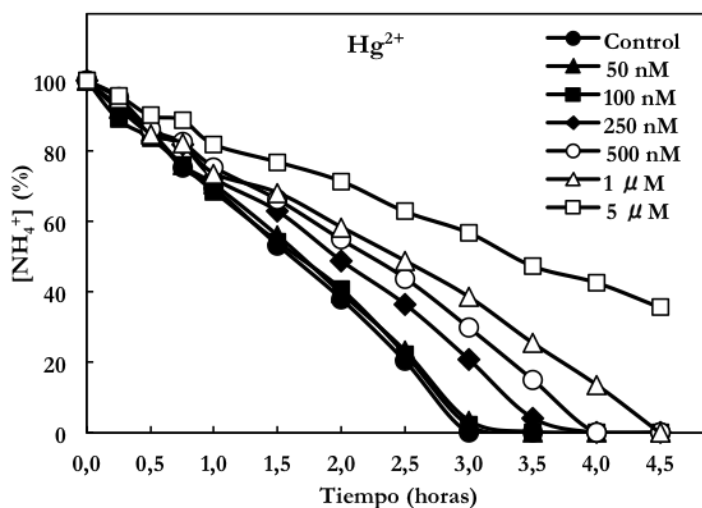


Figura 33. Efecto del mercurio sobre el consumo de amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de NH₄Cl a una concentración inicial de 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de Hg²⁺, añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NH₄⁺ en los cultivos, según se describe en Materiales y Métodos.

En la Figura 32 se observa un fuerte efecto inhibitor del mercurio sobre el consumo de NO_3^- , inhibición que se mostró proporcional a la concentración del metal. Así, los únicos cultivos que consumieron todo el NO_3^- presente en el medio, durante el tiempo que duró el ensayo, fueron el control y el cultivo crecido con Hg^{2+} 50 nM. El efecto inhibitor se mostró más significativo a concentraciones del metal superiores a 100 nM, observándose una inhibición del consumo de nitrato prácticamente del 100% a 1 y 5 μM de Hg^{2+} . Por el contrario, el consumo de amonio por *C. onubensis* se mostró menos sensible a la presencia del metal (Figura 33), así, para concentraciones iguales o inferiores a 100 nM, las curvas de desaparición de amonio coincidieron con la del cultivo control, observándose un efecto mayor con Hg^{2+} 5 μM , donde al final del ensayo se quedó sin consumir un 36% del NH_4^+ total.

La diferencia de la inhibición provocada por el Hg^{2+} sobre las velocidades de consumo de nitrato y amonio en *C. onubensis* se aprecia mejor en la Figura 34. Como se puede observar, a una concentración de 1 μM de Hg^{2+} en el medio de cultivo, la inhibición del consumo de nitrato, en *C. onubensis*, es prácticamente del 100%, mientras que la velocidad de consumo de amonio solo se afecta en un 25%, manteniéndose siempre la inhibición por debajo del 50% a la concentración de 5 μM (Figura 33). En cualquier caso, las concentraciones de Hg^{2+} utilizadas en el ensayo fueron inferiores a las utilizadas con Cd^{2+} o Cu^{2+} , indicativo de la mayor toxicidad del mercurio.

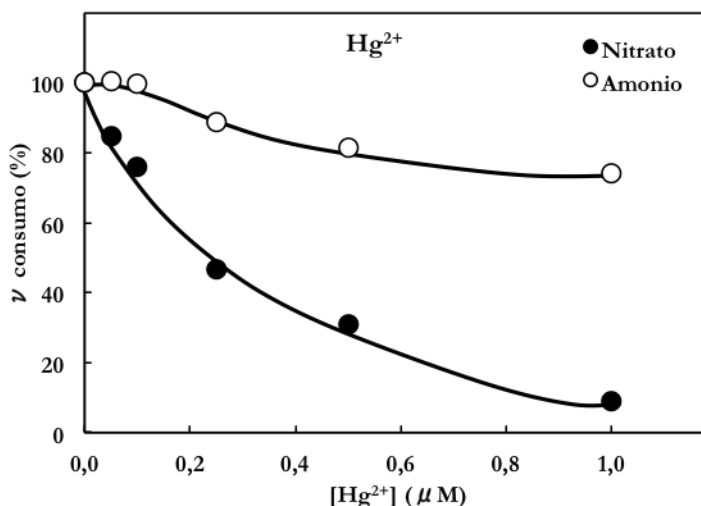


Figura 34. Efecto del mercurio sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. La velocidad de consumo de cada fuente nitrogenada se obtuvo al dividir la pendiente obtenida por la concentración de clorofila media, tras la medición inicial y final de cada cultivo mostrado en las Figuras 32 y 33. El 100% corresponde a 2,99 y 3,94 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$ para nitrato y amonio, respectivamente.

El Hg^{2+} se considera uno de los elementos más tóxicos, tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Tuzen y Soylak, 2005; Meucci et al., 2009; Niazi et al., 2009), así, su exposición, tanto en formas orgánicas como inorgánicas, es la segunda causa más común de intoxicación por metales (Storelli et al., 2002). La acumulación de Hg^{2+} ha sido estudiada en varias especies de plantas superiores tales como el guisante (*Pisum sativum* L.), la menta (*Mentha spicata* L.) (Beauford et al., 1977), el centeno (*Lolium perenne*) (Al-Attar et al., 1988), la espinaca (*Spinacia oleracea*) (Chunilall et al., 2004) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Du et al., 2005). Los efectos adversos que causa la acumulación excesiva de Hg^{2+} son la integridad de la estructura de la membrana y orgánulos celulares; el desplazamiento en la absorción de cationes esenciales, como es el caso del Mg^{2+} requerido en la síntesis de clorofila; y la reducción de la absorción de nutrientes minerales (Cho y Park, 2000; Patra y Sharma, 2000; Azevedo y Rodriguez, 2012). Aunque en algas los estudios con mercurio son más escasos, se ha indicado la generación de estrés oxidativo en *C. reinhardtii* (Elbaz et al., 2010), o la inhibición del crecimiento celular y la síntesis de clorofila en varias microalgas de origen marino (Bakar et al., 2015).

Al igual que el Cd^{2+} y Cu^{2+} , el Hg^{2+} tiene una fuerte afinidad por el azufre, por eso cabe pensar que el modo primario de acción tóxica de dicho metal en los organismos vivos es la interferencia de la función enzimática y proteínas mediante la unión a grupos tiólicos (-SH) (García y Reyes, 2001; Patra et al., 2004). Debido a la afinidad del metal por el azufre, se ha indicado como principal vía de desintoxicación de Hg^{2+} la formación de complejos con las fitoquelatinas (Cobbett y Goldsbrough, 2002; Vivares et al., 2005).

1.3.4. Efecto del arsénico sobre el consumo de nitrato y amonio

El arsénico (As) es un metaloide no esencial y generalmente tóxico para las plantas. En la naturaleza puede existir en forma orgánica e inorgánica. La exposición al As generalmente induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que pueden conducir a la producción de metabolitos antioxidantes y activación de numerosas enzimas implicadas en el estrés oxidativo. El metabolismo oxidativo del carbono, las relaciones de aminoácidos y proteínas, y las vías de asimilación de nutrientes, también se ven afectadas por la exposición al metaloide (Finnegan y Chen, 2012).

En el presente apartado se estudia el efecto que producen dos formas inorgánicas de arsénico (arsenito y arseniato) sobre el consumo de nitrógeno en la microalga *C. onubensis*. Las siguientes figuras muestran el efecto que provocó el As(III) (arsenito) sobre el consumo de NO_3^- (Figura 35) y NH_4^+ (Figura 36) en cultivos de la microalga crecidos a pH 2,5.

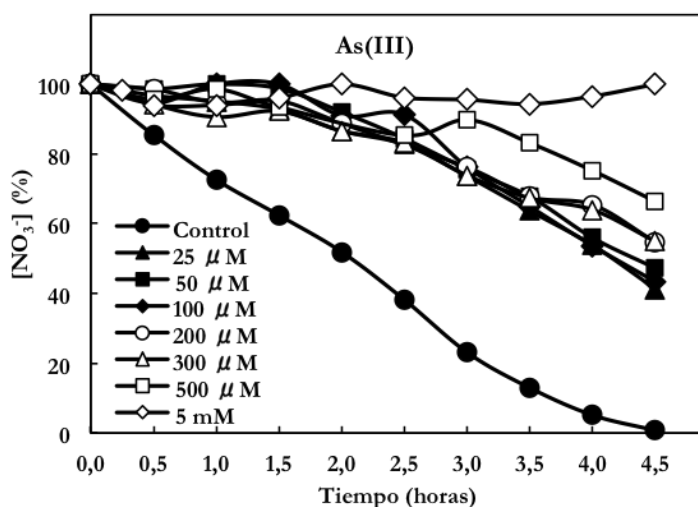


Figura 35. Efecto del arsenito sobre el consumo de nitrato por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de KNO_3 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de As(III), añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NO_3^- en los cultivos correspondientes, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

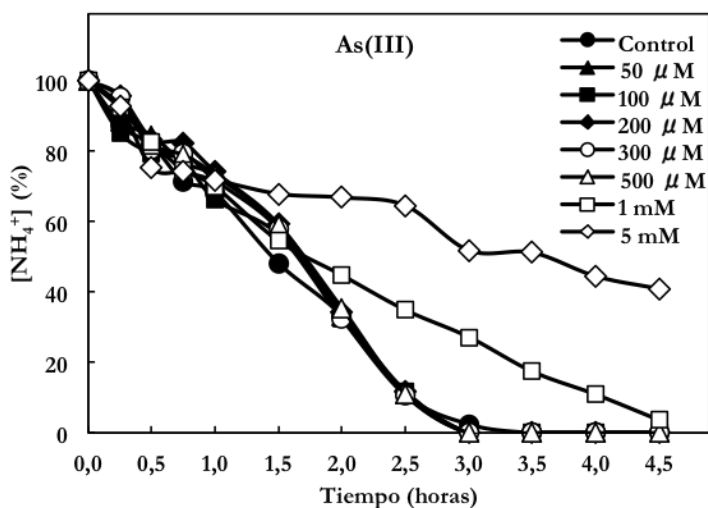


Figura 36. Efecto del arsenito sobre el consumo de amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de NH_4Cl 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de As(III), añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NH_4^+ en los cultivos correspondientes, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Como se puede apreciar en las figuras, en *C. onubensis*, el consumo de amonio presentó, de nuevo, más resistencia que el de nitrato a la presencia de As(III) en el medio de cultivo, mostrando todos los cultivos un comportamiento similar al control, a excepción del cultivo inoculado con As(III) 1 y 5 mM (Figura 36). Por el contrario, sí se observó un efecto inhibitorio sobre el consumo de NO_3^- . Así, en la Figura 35, puede apreciarse como durante todo el ensayo, en los cultivos inoculados con el metaloide, el NO_3^- se consumió más lentamente que en caso del cultivo control, siendo el efecto de inhibición total para una concentración de As(III) 5 mM. Además, a diferencia del cultivo control (o en el caso del amonio), ninguno de los cultivos expuestos al metaloide llegaron a consumir todo el NO_3^- presente en el medio durante el tiempo que duró el experimento.

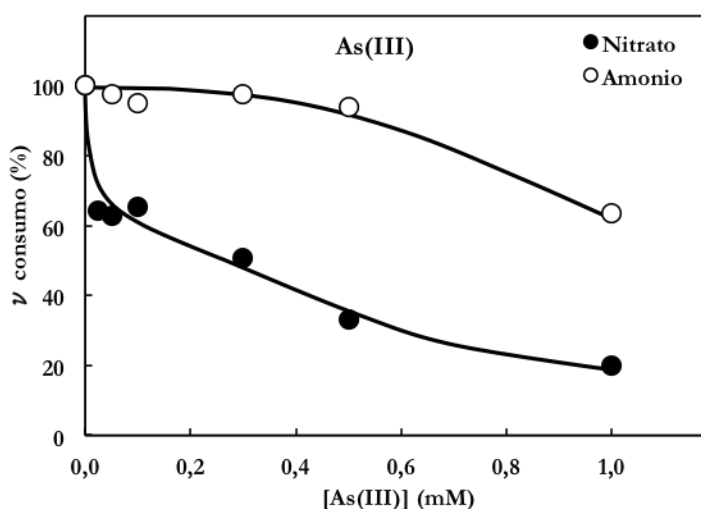


Figura 37. Efecto del arsenito sobre la velocidad de consumo de nitrato y amonio por *C. onubensis*, a pH 2,5. La velocidad de consumo de cada fuente nitrogenada se obtuvo al dividir la pendiente obtenida por la concentración de clorofila media, tras la medición inicial y final de cada cultivo mostrado en las Figuras 35 y 36. El 100% corresponde a $3,02$ y $4,07 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg chl}^{-1}$ para nitrato y amonio, respectivamente.

La Figura 37 muestra, de forma comparativa, el efecto del As(III) sobre las velocidades de consumo de ambas fuentes nitrogenadas. Como se aprecia en la figura, la velocidad de consumo de amonio, en *C. onubensis*, permaneció prácticamente constante hasta una concentración de $0,5$ mM, disminuyendo un 40% cuando se inoculó en presencia del As(III) 1 mM. Para nitrato, se aprecia una disminución inicial del 35% de la velocidad de consumo en presencia de As(III) $0,025$ mM, llegando a ser del 70% para una concentración del metaloide de $0,5$ mM y del 100%

cuando la concentración se aumentó 10 veces (Figura 35). Estos resultados de inhibición de consumo de NO_3^- por arsenito son similares a los estudiados en la microalga *C. reinhardtii*, aunque a concentraciones mayores del metaloide (Domínguez, 2008).

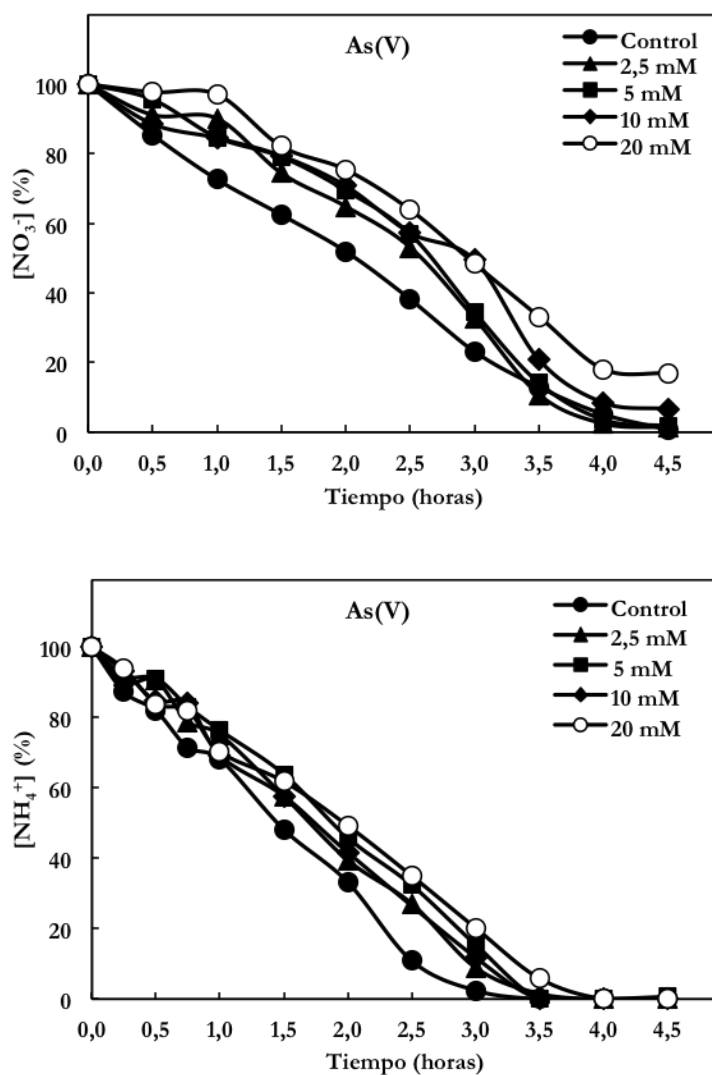


Figura 38. Efecto del arseniato sobre el consumo de nitrato y amonio por la microalga *C. onubensis*, a pH 2,5. Las células se cultivaron en presencia de la correspondiente fuente nitrogenada a una concentración de 0,25 mM (100%), en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de As(V), añadido a tiempo 0. A los tiempos señalados, se determinó la concentración de NO_3^- y NH_4^+ según se indica en Materiales y Métodos.

A diferencia de lo observado con arsenito, los cultivos de *C. onubensis* se mostraron más resistentes a la presencia de As(V), (arseniato), en el medio de cultivo. De hecho, como muestra la Figura 38, fue necesario aumentar la concentración del metaloide casi un orden de magnitud para obtener algún efecto significativo. Aún así, el comportamiento con ambas fuentes nitrogenadas fue bastante similar, viéndose ligeramente más afectado el consumo de nitrato en presencia de As(V), aspecto que también se observó cuando se calcularon las velocidades de consumo (dato no mostrado).

La diferencia observada en cuanto a la tolerancia respecto a la forma de arsénico presente en el medio de cultivo, podría estar relacionada con el tipo de transporte utilizado en cada caso. Así, se ha descrito en plantas que el transporte de arseniato se realiza a través de transportadores de fosfato, mientras que el transporte de arsenito es más eficiente y ocurre por medio de acuagliceroporinas (Abedin et al., 2002; Rosen, 2002; Wang et al., 2002). El As(V) es un análogo del fosfato inorgánico y es fácilmente transportado a través de la membrana por las proteínas del transportador de fosfato (Ullrich-Eberius et al., 1989; Wu et al., 2011). La competencia entre ambos por el mismo sistema de transporte se ha indicado en plantas hiperacumuladoras de As (Wang et al., 2002; Tu y Ma, 2003), no hiperacumuladoras tolerantes al As (Meharg y Macnair, 1992; Bleeker et al., 2003) y no acumuladoras sensible al As (Abedin et al., 2002; Esteban et al., 2003). Bajo condiciones de baja concentración de fosfato, el As(V) puede competir con él para entrar en la planta, aumentando la capacidad para privarla del fosfato. Por el contrario, una alta concentración de fosfato puede proteger a las plantas de la toxicidad de As(V), tal y como le ocurre a *Pteris vittata* (Tu y Ma, 2003; Ellis et al., 2006) y otros miembros de las Pteridáceas que hiperacumulan As (Pickering et al., 2006; Zhao et al., 2009). En este sentido, la presencia de fosfato en el medio de cultivo de la microalga (2,87 mM) implicaría una competencia con el arseniato por el transportador, lo que dificultaría su entrada y, por tanto, minimizaría su toxicidad, lo que justificaría la menor toxicidad observada con el arseniato. Así, por mutagénesis insercional de un gen homólogo del transportador de fosfato, se ha descrito que confiere a *C. reinhardtii* resistencia a arseniato (Kobayashi et al., 2003). En este contexto, se ha determinado el fosfato intracelular en mutantes de *C. reinhardtii* sensibles o resistentes a arseniato y se ha visto que los mutantes resistentes acumulaban un mayor contenido en fosfato (Kobayashi et al., 2005).

Una vez dentro de la célula vegetal, el As(V) probablemente podrá moverse fácilmente de un compartimento celular a otro cruzando las membranas internas a través de los diversos transportadores de fosfato. El resultado de este movimiento sería el rápido equilibrio del arsénico en toda la célula, exponiendo todas las partes del metabolismo celular (Palmieri et al., 2008). Se ha indicado la implicación del As(V) en la formación de ADP-As(V), complejo inestable que conduce a la interrupción de los flujos de energía en las células, compitiendo con el fosfato en la síntesis de ATP (Gresser, 1981; Quaghebeur y Rengel, 2003). De hecho, los valores

de K_m y $V_{máx}$ de esta reacción son similares tanto para el fosfato como para el arseniato (Moore et al., 1983). Los organismos fotosintéticos metabolizan el arseniato y lo transforman en arsenito por acción de la enzima arseniato reductasa, así, el arsenito formado reacciona con los grupos $-SH$ de las proteínas inactivando numerosas enzimas (Zhao et al., 2009). La síntesis de fitoquelatinas y de glutatión, capaces de formar complejos con el arsénico a través de los grupos tiólicos, se considera la principal vía de desintoxicación tanto para el As(III) como para el As(V) (Raab et al., 2007; Zhao et al., 2012).

Otro aspecto destacable de los resultados obtenidos es la diferencia observada por la presencia de arsenito en cuanto a la fuente de nitrógeno utilizada (Figura 37). Este resultado coincide, además, con el obtenido para el caso del Cu^{2+} (Figura 31) y el Hg^{2+} (Figura 34). En los que la inhibición, en *C. onubensis*, fue mayor sobre el consumo de nitrato que sobre el de amonio. Se ha descrito la capacidad que presentan estas especies para interactuar con los grupos tiólicos de proteínas y enzimas (Zhao et al., 2009; Azevedo y Rodriguez, 2012). En este sentido, el estrés metálico provoca el bloqueo de transportadores específicos de nitrato en *Arabidopsis*, indicando los centros tiólicos como dianas celulares de la inhibición (Mao et al., 2014). Menos datos existen en cuanto al efecto sobre los transportadores de amonio. Se ha indicado la inhibición del transporte de NH_3 por mercurio en nódulos de raíz de soja (Niemietz y Tyerman, 2000), si bien en este caso no se utilizan los mismos transportadores que para amonio (Howitt y Udvardi, 2000), y en arroz, la exposición a arseniato provoca una disminución del nivel de transcrito tanto para los transportadores de nitrato, como para los de amonio (Norton et al., 2008; Finnegan y Chen, 2012).

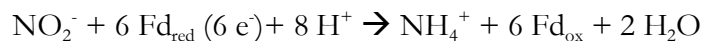
III. Resultados y Discusión
**Capítulo 2: Caracterización de enzimas
del metabolismo del nitrógeno
y estrés abiótico en *Coccomyxa onubensis***

2. Caracterización de enzimas del metabolismo del nitrógeno y estrés abiótico en *Coccomyxa onubensis*

Como se ha indicado en el Capítulo anterior, la síntesis de fitoquelatinas constituye uno de los principales mecanismos que las plantas y microalgas utilizan para minimizar los efectos provocados por el estrés metálico. Las fitoquelatinas son pequeños péptidos que poseen una estructura del tipo $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) capaces de secuestrar metales y minimizar la toxicidad de los mismos (Rausser, 1995; Le Faucheur et al., 2005). En este sentido, teniendo en cuenta la demanda de glutamato necesaria para la síntesis de fitoquelatinas, se ha realizado un estudio de estrés metálico sobre algunas enzimas que, de manera directa o indirecta, participan en la síntesis de este aminoácido. Entre ellas se han seleccionado la nitrito reductasa (NiR), que aporta el amonio requerido; la glutamina sintetasa (GS), que utiliza este amonio durante el ciclo GS/GOGAT para la síntesis de glutamato; y la glutamato deshidrogenasa (GDH), que sintetiza el glutamato directamente a partir de amonio y glutamina (para más información ver el apartado 3 de la Introducción). No obstante, teniendo en cuenta que es la primera vez que se ensayan estas enzimas en la microalga *C. onubensis*, se va a realizar un estudio previo de caracterización cinética de las mismas a efecto de garantizar la medida de actividad de las enzimas en los estudios de estrés metálico realizados en extractos crudos de la microalga. Debido a la rigidez de la pared celular de *C. onubensis*, fue preciso utilizar un método de rotura celular bastante agresivo. La rotura se realizó por vibración con perlas de vidrio en un homogeneizador Bühler, como se describe en Materiales y Métodos.

2.1. Caracterización de la actividad nitrito reductasa de *C. onubensis*

El nitrito es altamente reactivo y un ion potencialmente tóxico. Los organismos fotosintéticos transportan inmediatamente el nitrito generado por la reducción del nitrato desde el citosol a los cloroplastos, donde la enzima nitrito reductasa (NiR) lo reduce hasta amonio utilizando ferredoxina (Fd) reducida fotosintéticamente, de acuerdo con la siguiente reacción global (Fernández et al., 1998):



La Tabla 7 muestra la caracterización del ensayo de actividad de la NiR en extractos crudos de *C. onubensis*. La actividad se mostró absolutamente dependiente de la presencia de metil viológeno (MV) reducido con ditionito, que sustituye a la ferredoxina reducida en la mezcla de reacción, no observándose actividad cuando se utilizó NADH o NADPH como donadores de electrones. En ausencia del tampón Tris-HCl (pH 7,5), la actividad disminuyó un 44% respecto al ensayo general, lo que implica la necesidad de tamponar el medio de reacción, aspecto que se discutirá más adelante. Por último, a efecto de desnaturalizar las enzimas, se realizó un ensayo en el

que se sometió el extracto crudo a un calentamiento de 100 °C durante 2 minutos, mediante el cual no se observó actividad, indicando la naturaleza biológica de la reacción ensayada.

Tabla 7. Caracterización de las actividades NiR en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*.

Condiciones	NiR (U·mg ⁻¹)	NiR (%)
MV-NiR (completo)	555,50	100
menos tampón Tris-HCl, pH 7,5	311,93	56,1
menos metil viológeno	35,61	6,4
menos ditionito	2,85	0,5
menos EC; más EC calentado a 100 °C	0	0
Fd-NiR	90,16	16,2
NADH-NiR	0	0
NADPH-NiR	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 50 μ mol de tampón Tris-HCl, pH 7,5; 3 μ mol de NaNO₂; 10 μ mol de MV; 10 mg de ditionito 100 mg·ml⁻¹ y 100 μ l de extracto crudo (EC). Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos; o bien sustituyendo el MV por 20 μ mol de Fd o 0,5 μ mol de NAD(P)H. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 5 minutos, y se utilizó como fuente de enzima. Tras 10 minutos de incubación a 45 °C, se determinó la actividad NiR según se describe en Materiales y Métodos.

La ferredoxina (Fd) es una proteína sulfoférica que desempeña un papel fundamental como donador de electrones fisiológico en enzimas NiR de organismos fotosintéticos (Losada y Guerrero, 1979) tales como las microalgas *Chlorella fusca* (Zumft, 1972), *Chlamydomonas reinhardtii* (Hirasawa et al., 2010) o *Monoraphidium braunii* (Vigara et al., 2002), entre otros; no obstante, puede ser sustituido por otros donadores de electrones artificiales, siendo uno de los más eficaces el metil viológeno. Como puede observarse en la Tabla 7, al sustituir el MV por Fd, la velocidad de la reacción NiR disminuyó 6 veces, aunque hay que indicar que la Fd utilizada fue de espinacas, en lugar de la Fd de *C. onubensis*. Por este motivo, dada la diferencia de actividad, se utilizó el MV para realizar la mayoría de los estudios. Los organismos no fotosintéticos, en cambio, no utilizan la Fd como donador de electrones debido a que presentan una marcada especificidad por nucleótidos de piridina reducido, pudiéndose distinguir hasta tres tipos de enzimas: la NAD(P)H-NiR, que puede usar NADPH o NADH como donador de electrones, siendo característica del hongo *Neurospora crassa* (Greenbaum et al., 1978); la NADPH-NiR, característica de la levadura *Torulopsis nitratophila* (Rivas et al., 1973); y la NADH-NiR, encontradas en organismos procariontas tales como *Escherichia coli* K2 (Jackson et al., 1981), *Rhodobacter capsulatus* E1F1 (Olmo-Mira et al., 2006) o *Azotobacter chroococcum* (Vega et al., 1973), entre otros.

2.1.1. Propiedades cinéticas de la actividad nitrito reductasa

Parámetros cinéticos

Con la finalidad de estudiar la afinidad de la NiR por sus diferentes sustratos, se realizó un estudio enzimático para determinar los parámetros cinéticos clásicos en base a la teoría enzimática de Michaelis-Menten.

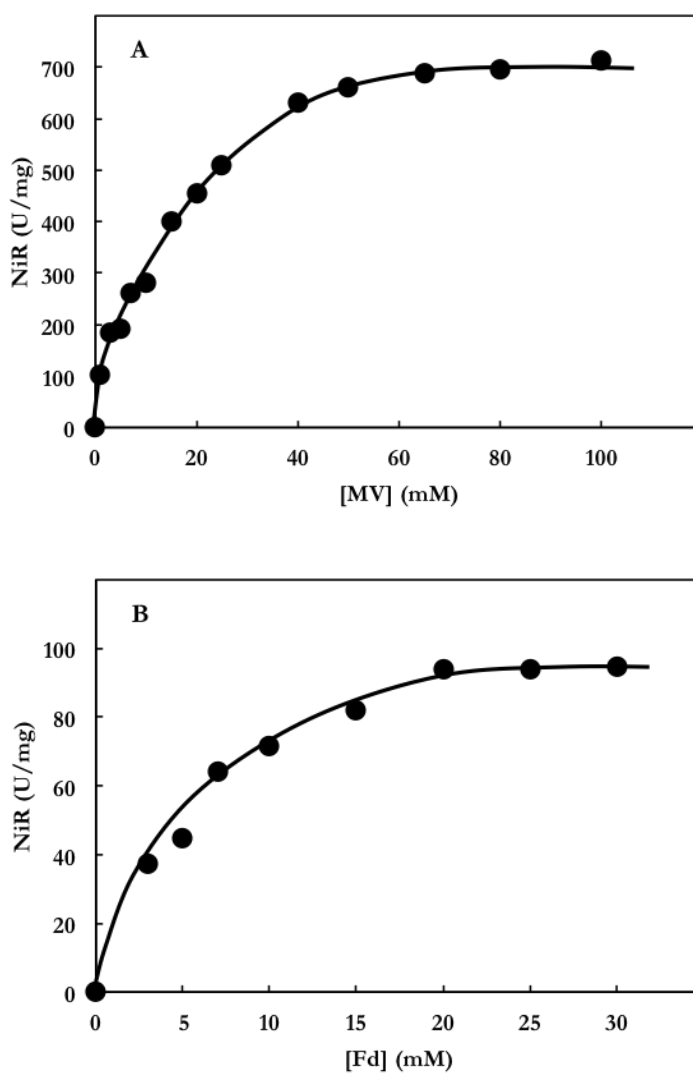


Figura 39. Representación de Michaelis-Menten de la actividad NiR de *C. onubensis* en función de la concentración de metil viológeno (A), o ferredoxina (B). La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de MV y Fd en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

La Figura 39 muestra los resultados obtenidos para la variación de la actividad enzimática de la NiR cuando se utilizaron concentraciones crecientes de MV y Fd en la mezcla de reacción. En ella puede observarse como la NiR presentó una cinética clásica de Michaelis-Menten frente a MV y Fd sin que se aprecie inhibición por sustrato. A partir de la representación de Lineweaver-Burk (Figura 40) se obtuvo un valor de K_m para MV y Fd de la NiR de *C. onubensis* de 16,9 mM y 7,2 μM , respectivamente.

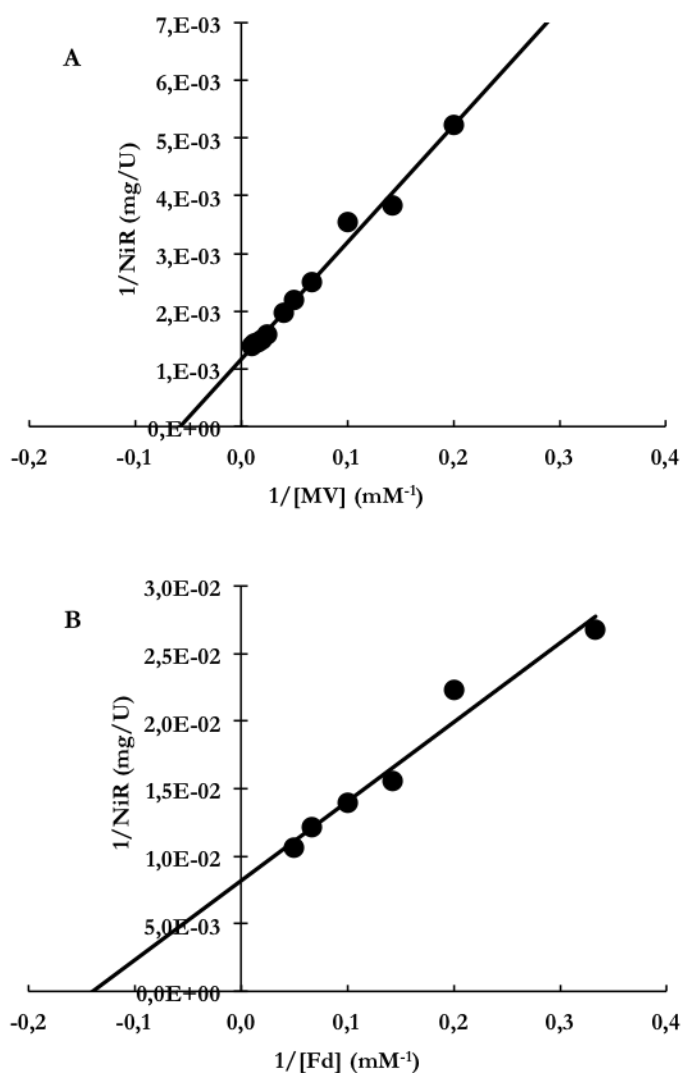


Figura 40. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para metil viológeno (A), o ferredoxina (B), de la actividad NiR de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de MV y Fd, de los valores representados en la Figura 39.

Cuando se realizó un estudio similar para el nitrito (NO_2^-), se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 41 donde, de nuevo, el comportamiento se correlacionó con una cinética de Michaelis-Menten, calculándose un valor de K_m para nitrito (Figura 41B) de la NiR de *C. onubensis* de 1,9 mM.

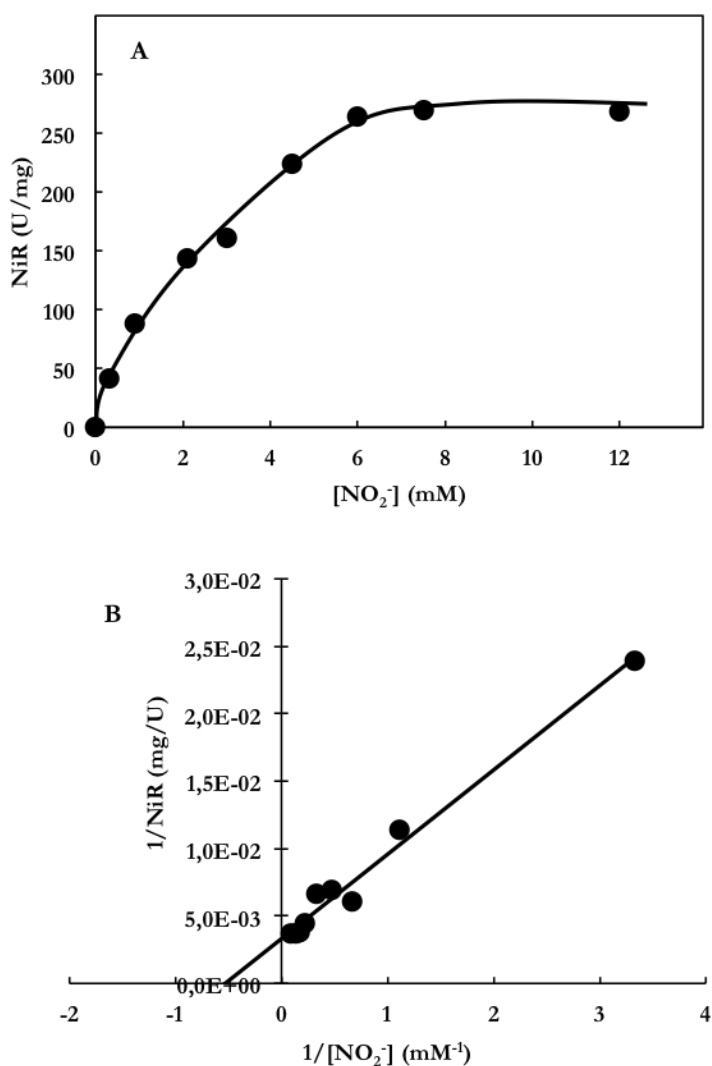


Figura 41. Representación de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) para la determinación del valor de K_m para nitrito, de la actividad NiR de *C. onubensis*. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de NO_2^- en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura. Se representa también la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de NO_2^- , de los valores representados en la Figura 41A.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad NiR, en el intervalo comprendido entre 5 y 9, se muestra en la Figura 42. En ella se aprecia como la actividad se hace máxima en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Cuando se sustituyó, para el mismo valor de pH, el tampón fosfato potásico en lugar del Tris-HCl, la actividad mantuvo un 85% de su actividad. Para valores de pH 6,5 e inferiores, y pH 8 y superiores, la actividad enzimática cayó drásticamente por debajo de un 40%, obteniéndose los valores mínimos a pH 5 y 6. La importante disminución de actividad observada a pH inferior al óptimo (7,5) justifica los resultados obtenidos en la caracterización del ensayo (Tabla 7), donde se apreciaba la necesidad de amortiguar la mezcla de reacción a pH 7,5.

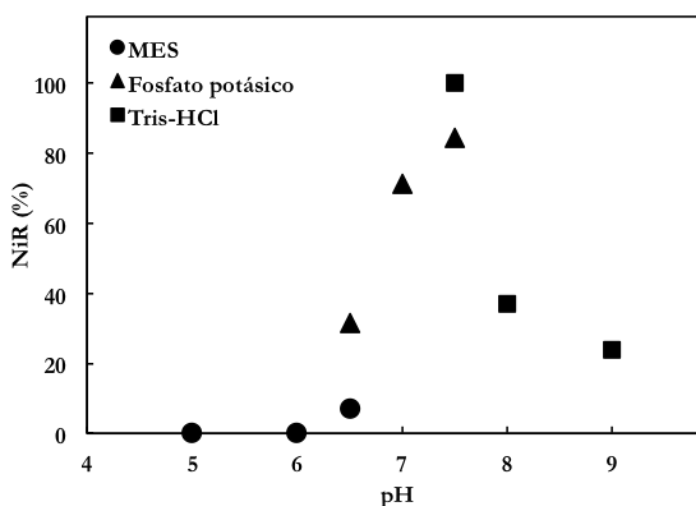


Figura 42. Determinación del pH óptimo de la actividad NiR de *C. onubensis*. Los tampones, utilizados a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción, fueron: MES, pH 5, 6 y 6,5; fosfato potásico, pH 6,5, 7 y 7,5; Tris-HCl, pH 7,5, 8 y 9. El 100% corresponde a 613,72 U·mg⁻¹ de actividad NiR. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 43A muestra la dependencia de la actividad NiR con la temperatura en el intervalo comprendido entre 0 y 70 °C. La actividad máxima se alcanzó a una temperatura de 45 °C, manteniéndose por encima del 90% cuando se midió a 50 °C.

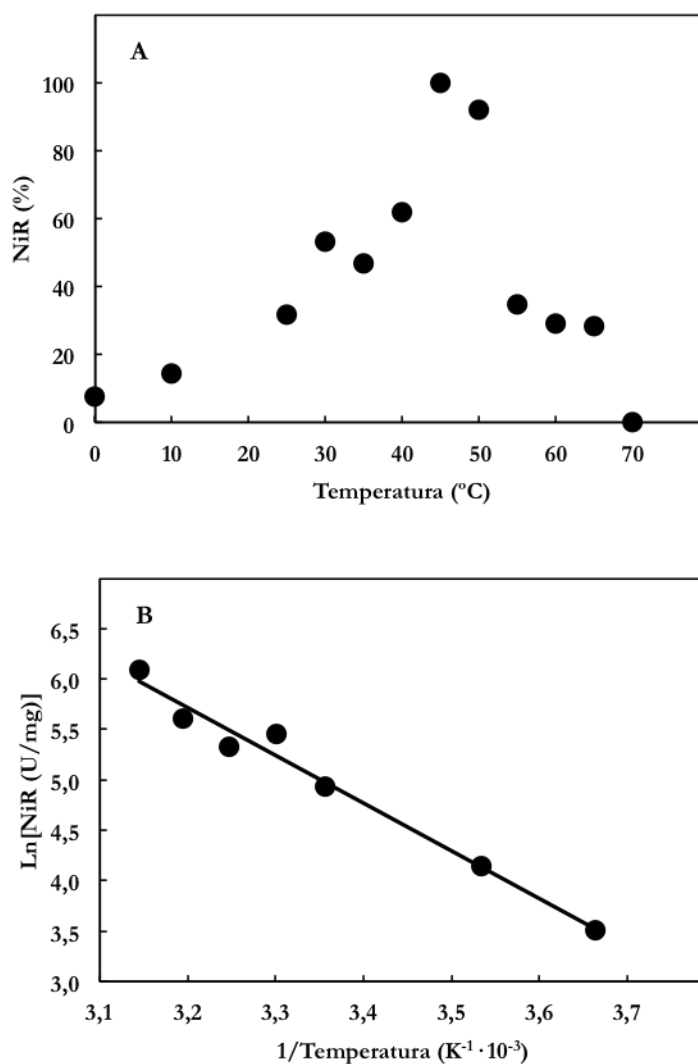


Figura 43. Determinación de la temperatura óptima (A) y energía de activación (B) de la actividad NiR de *C. onubensis*. La actividad NiR se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas; 628,10 U·mg⁻¹ corresponde al 100% de actividad NiR. Se representa también la ecuación de Arrhenius linealizada a partir del logaritmo neperiano de la actividad NiR frente a 1/Temperatura.

A valores de temperaturas entre 25 y 60 °C, la actividad NiR se mantuvo por encima del 30%, produciéndose una caída de la actividad a tiempos superiores e inferiores al intervalo, disminuyendo un 100% cuando la temperatura fue de 70 °C, posiblemente debido a un proceso de termoinactivación de la enzima. Por otra parte, la Figura 43B muestra la representación de Arrhenius de las velocidades del proceso

catalizado para cada temperatura. Los valores comprendidos entre 0 y 45 °C se disponen linealmente distinguiéndose una única pendiente, a partir de la cual se calculó la energía de activación para la reacción catalizada por la NiR, obteniéndose un valor de 39,3 kJ·mol⁻¹.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la NiR de *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. La Figura 44 muestra la dependencia de la actividad NiR a diferentes temperaturas en un intervalo de tiempo comprendido entre 0 y 480 minutos (8 h). En general, la enzima se mostró térmicamente muy sensible. Así, se aprecia como a las temperaturas de 45 y 55 °C, se produjo una caída drástica de la actividad en el intervalo de tiempo de 1 hora, concretamente un 45 y 80%. A 35 °C, se aprecia que la actividad se mantuvo en un 60% en el intervalo de tiempo de 2 horas, produciéndose una caída drástica de actividad a tiempos superiores. A la temperatura de 4 °C, la actividad se mantuvo al 100% en el intervalo de tiempo de 1 hora, decayendo poco a poco a tiempos mayores, quedando un 52% de actividad a las 8 horas de ensayo. Por último, a la temperatura de -20 °C, la actividad mantuvo el 100% en todo el intervalo de tiempo que duró el ensayo.

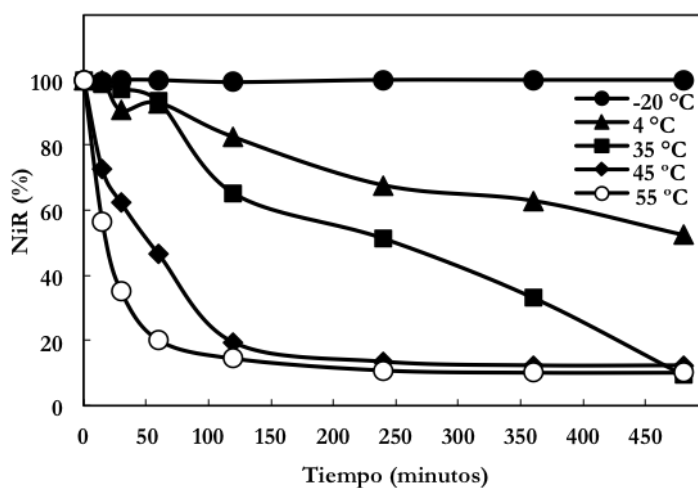


Figura 44. Estabilidad térmica de la actividad NiR de *C. onubensis*. La actividad NiR se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 475,57 U·mg⁻¹ de actividad NiR.

Según la caracterización físico-química de la NiR de la microalga *C. onubensis*, se han obtenido valores de Km para metil viológeno, ferredoxina y nitrito de 16,9 mM,

7,2 μM y 1,9 mM, respectivamente. El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 7,5 en tampón Tris-HCl 50 mM, una temperatura óptima de 45 °C y una energía de activación de 39,3 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las NiR de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	Km			T ^a Óptimo ° C	pH Óptimo
	MV	NO ₂ ⁻	Fd		
	mM		μM		
<i>Coccomyxa onubensis</i>	16,9	1,9	7,2	45	7,5
<i>Monoraphidium braunii</i>	0,26	0,70	10,0	40	7,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,91	0,38	24,0	40	8,0
<i>Spirulina platensis</i>	0,40	0,20	20,0	nd	7,8
<i>Phormidium laminosum</i>	0,22	0,04	22,0	50	7,3-7,6
<i>Porphyra yezoensis</i>	0,37	0,28	25,0	nd	7,7

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *M. braunii*, Vígara et al. (2002); *C. reinhardtii*, Romero et al. (1987); *S. platensis*, Yabuki et al. (1985); *P. laminosum*, Arizmendi y Serra (1990); *P. yezoensis*, Ide y Tamura (1987). nd indica no determinado.

La Tabla 8 muestra una comparación de estos datos con los de otras NiR de origen fotosintético. Aunque los valores óptimos de pH y temperatura obtenidos para la NiR de *C. onubensis* fueron similares a los de otras NiR, la afinidad de la enzima por sus diferentes sustratos varía notablemente, siendo los valores de Km para MV y NO₂⁻ los más altos de entre los organismos comparados, y el de Fd el más pequeño.

Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad NiR

La Tabla 9 recoge un estudio del efecto que produce distintas sustancias, tales como cationes monovalentes y divalentes, reactivos de grupos sulfhidrilos, o agentes quelantes de metales a diferentes concentraciones, sobre la actividad NiR en extractos crudos de *C. onubensis*. Como se puede apreciar, los cationes monovalentes, tales como el Na⁺ y K⁺, y el DTT⁻ (reactivo de grupos sulfhidrilos), apenas produjeron efecto significativo sobre los niveles de actividad NiR a las concentraciones estudiadas, 1 y 5 mM.

En cuanto a los cationes divalentes, el Mg²⁺ no provocó ningún efecto sobre la actividad NiR, mientras que el Cd²⁺ produjo una inhibición del 15% a la concentración de 1 mM, aumentando la inhibición hasta un 55%, respecto al ensayo control, al aumentar 5 veces la concentración del inhibidor. En guisante (Chugh et al., 1992) se ha observado la inhibición *in vitro* por cadmio de la nitrato reductasa, mientras que la nitrito reductasa permanece inalterada, si bien a concentraciones del metal (0,25 mM) inferiores a las utilizadas en el ensayo de la enzima de *C. onubensis*.

Tabla 9. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad NiR de *C. onubensis*.

Agente	NiR (%)	
	1 mM	5 mM
Ninguno (control)	100	100
Na ⁺	97,5	95,1
K ⁺	97,3	95,8
Mg ²⁺	97,8	94,2
Cd ²⁺	85,6	43,9
DTT	96,8	96,4
KCN	0	0
NaN ₃	92,4	80,1

Se determinó la actividad NiR según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a 549,11 U·mg⁻¹ de actividad NiR.

De los agente quelantes de metales estudiados, inhibidores clásicos de enzimas que poseen grupo hemo, el cianuro inhibió un 100% la actividad NiR a una concentración de 1 mM, lo cual es consecuente con la posible existencia de un grupo hemo en la enzima de *C. onubensis*, como ocurre con la NiR de otros microorganismos. Así, a esa misma concentración de cianuro, la NiR de *C. fusca* (Zumft, 1972) se inhibió un 90%; no obstante, la enzima de *P. laminosum* (Arizmendi y Serra, 1990) llegó a inhibirse un 92% a una concentración 10 veces menor. En el caso de la azida, apenas mostró un efecto destacable en la actividad NiR de *C. onubensis*, siendo la inhibición de un 7,6% a una concentración de 1 mM y de un 19,9% a la concentración de 5 mM, manteniéndose al mismo nivel cuando la concentración se aumentó a 10 mM (dato no mostrado). Dicho comportamiento también se ha observado en el alga roja *P. yezoensis* (Ho et al., 1976), la cual no se vio afectada por azida 0,33 mM, pero mostró un 19% de inhibición a una concentración 10 veces superior.

Ensayo de actividad en gel

La Figura 45 muestra el resultado de un ensayo de actividad NiR en gel de poliacrilamida, en condiciones nativas, de la enzima NiR de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*. Como puede apreciarse en la figura, se ha obtenido en los extractos crudos de la microalga *C. onubensis* una única banda de actividad NiR de menor movilidad electroforética que la NiR de *C. reinhardtii*. Este resultado es consecuente con el hecho de que en *C. onubensis* existe también una única isoforma para la NiR, tal y como ocurre con la NiR en otros organismos como *C. reinhardtii* (Romero et al., 1987), *M. braunii* (Vigara et al., 2002), *Anabaena* sp. 7119 (Méndez y Vega, 1981), espinacas (Vega y Kamin, 1977; Ida y Mikami, 1986); o la bacteria *Rhodospseudomonas sphaeroides* (Sawada et al., 1978). En cambio, en el hongo *Candida utilis* (Sengupta et al., 1996), se han identificado dos isoformas de NiR.

Aunque la electroforesis nativa no es una técnica que permita calcular de forma fiable el peso molecular de una proteína, se ha realizado un cálculo aproximado de este parámetro. Así, se ha estimado, a partir de los patrones utilizados, un peso molecular aparente para la NiR de la microalga *C. onubensis* en torno a 75 kDa, algo superior a los estimados para la NiR de otros organismos fotosintéticos, que varía entre 50 y 63 kDa (Vigara et al., 2002), siendo el peso molecular de la NiR de la microalga *C. reinhardtii* de 63 kDa (Romero et al., 1987).

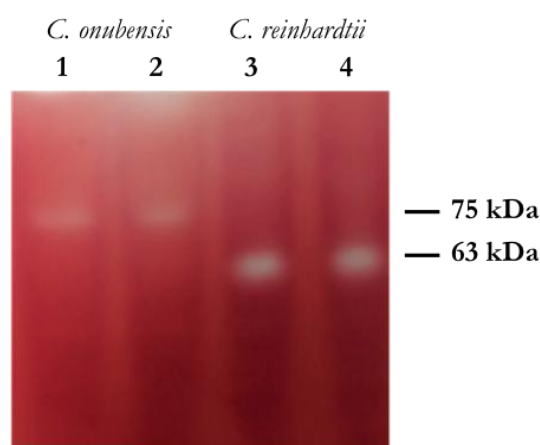


Figura 45. Ensayo de actividad NiR en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*. Calles 1 y 2, actividad NiR en extractos crudos de *C. onubensis* (27,7 μg); calles 3 y 4, actividad NiR en extractos crudos de *C. reinhardtii* (15,6 μg). La actividad NiR en gel se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

2.2. Caracterización de la actividad glutamina sintetasa de *C. onubensis*

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima que cataliza la síntesis de L-glutamina a partir de L-glutamato y amonio en presencia de ATP (actividad sintética); no obstante, la enzima se ensayó mediante su actividad transferasa, que cataliza la síntesis de γ -glutamihidroxamato (γ -GHA) a partir de glutamina (Gln) e hidroxilamina (NH_2OH), en base al ensayo descrito por Shapiro y Stadtman (1970).

La caracterización del ensayo de actividad transferasa de la GS en extractos crudos de *C. onubensis* se muestra en la Tabla 10. La actividad se mostró absolutamente dependiente de la presencia de sus sustratos hidroxilamina, glutamina, ADP y Mn^{2+} , así como de HAsO_4^{2-} . Por otro lado, cuando no se adicionó tampón MOPS (pH 7), la actividad disminuyó un 53%, mostrando la necesidad de tamponar el medio de reacción. La eliminación del DTE provocó una disminución del 20% de la actividad GS, lo que justifica la necesidad de la presencia de un reactivo de grupos sulfhidrilos como activador del proceso catalizado; en cambio, al eliminar el NaOH,

se produjo un aumento del 30% de la actividad respecto al ensayo general, por lo que se evitó su utilización a pesar de que está descrito su uso en el ensayo de actividad transferasa de la GS (Shapiro y Stadman, 1970). Por último, a efecto de desnaturalizar las enzimas, se realizó un ensayo en el que se sometió el extracto crudo a un calentamiento de 100 °C durante 2 minutos, mediante el cual no se observó actividad, indicando la naturaleza biológica de la reacción realizada.

Tabla 10. Caracterización de las actividades GS en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*.

Condiciones	GS (U·mg ⁻¹)	GS (%)
Completo	1,09	100
menos glutamina	0,13	11,4
menos MnCl ₂	0,14	1,5
menos ADP	0,19	16,9
menos tampón MOPS, pH 6	0,51	46,9
menos hidroxilamina	0,02	1,83
menos NaOH	1,40	127,9
menos DTE	0,89	81,46
menos HAsO ₄ ²⁻	0,07	6,1
menos EC; más EC a 100 °C	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 0,6 ml de mezcla de ensayo (40 mM de Gln; 4 mM de MnCl₂; 0,5 mM de ADP; 66 mM de tampón MOPS, pH 6); 60 μmol de NH₂OH; 60 μmol de NaOH; 50 μl de extracto crudo (EC); 5 μmol de DTE; y 50 μmol de HAsO₄²⁻. Después de 10 minutos de incubación a 40 °C, se determinó el γ-GHA formado, según se describe en Materiales y Métodos. Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada hasta un volumen final de 1 ml. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad GS.

2.2.1. Propiedades cinéticas de la actividad glutamina sintetasa

Parámetros cinéticos

La Figura 46 muestra los resultados obtenidos sobre la velocidad de reacción de la actividad GS cuando se utilizaron concentraciones variables de glutamina (Figura 46A), hidroxilamina (Figura 46B), ADP (Figura 46C) y el catión divalente manganeso (Figura 46D), respectivamente, en la mezcla de reacción. En la figura puede observarse como en todos los casos ensayados, la GS presentó un comportamiento clásico de Michaelis-Menten. No obstante, en el caso de la glutamina (Gln), se observó un aumento progresivo de la velocidad de reacción sin llegar a obtener la línea constante característica de una cinética michaeliana. En el caso de la hidroxilamina (NH₂OH), se muestra como a partir de concentraciones superiores a 45 mM se produce una disminución de la velocidad de reacción de la GS, indicativo de una inhibición por sustrato del proceso catalizado.

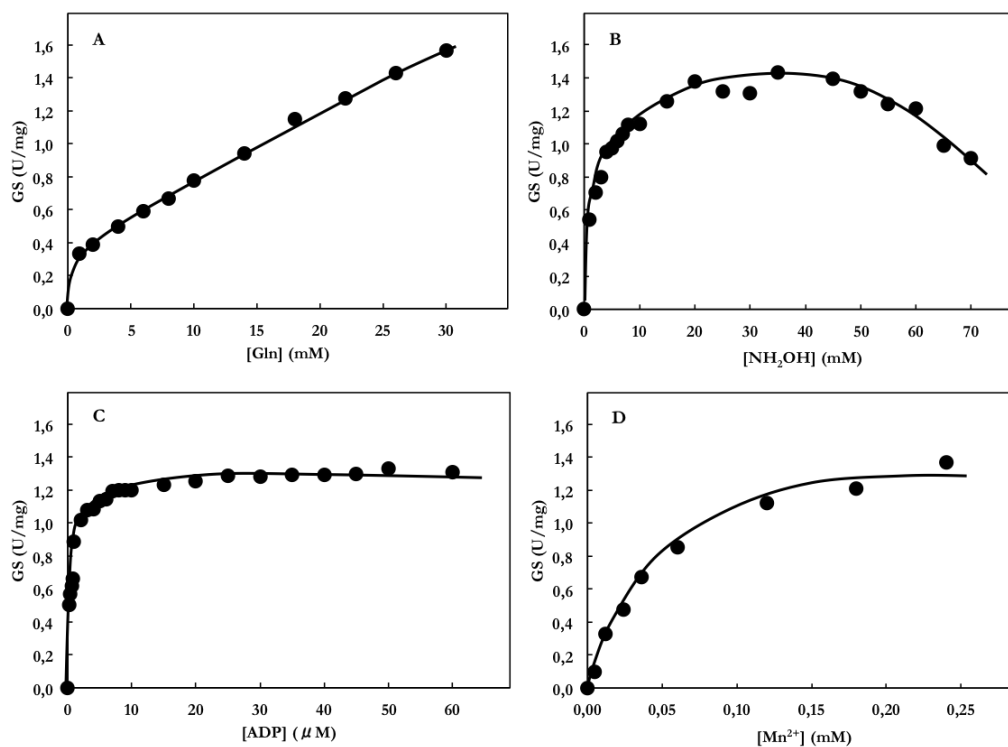


Figura 46. Representación de Michaelis-Menten de la actividad GS de *C. onubensis* en función de la concentración de glutamina (A), hidroxilamina (B), ADP (C), o el catión divalente manganeso (D). La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de Gln, NH₂OH, ADP y Mn²⁺, en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

La determinación de los valores de Km se realizó a partir de la representación de dobles inversos de los resultados mostrados en la Figura 46 para cada uno de los sustratos, tal y como se muestra en la Figura 47. Así, se obtuvo un valor de Km de 19,3 mM para Gln; de 2 mM para NH₂OH; de 0,6 μM para ADP; y de 59,7 μM para Mn²⁺.

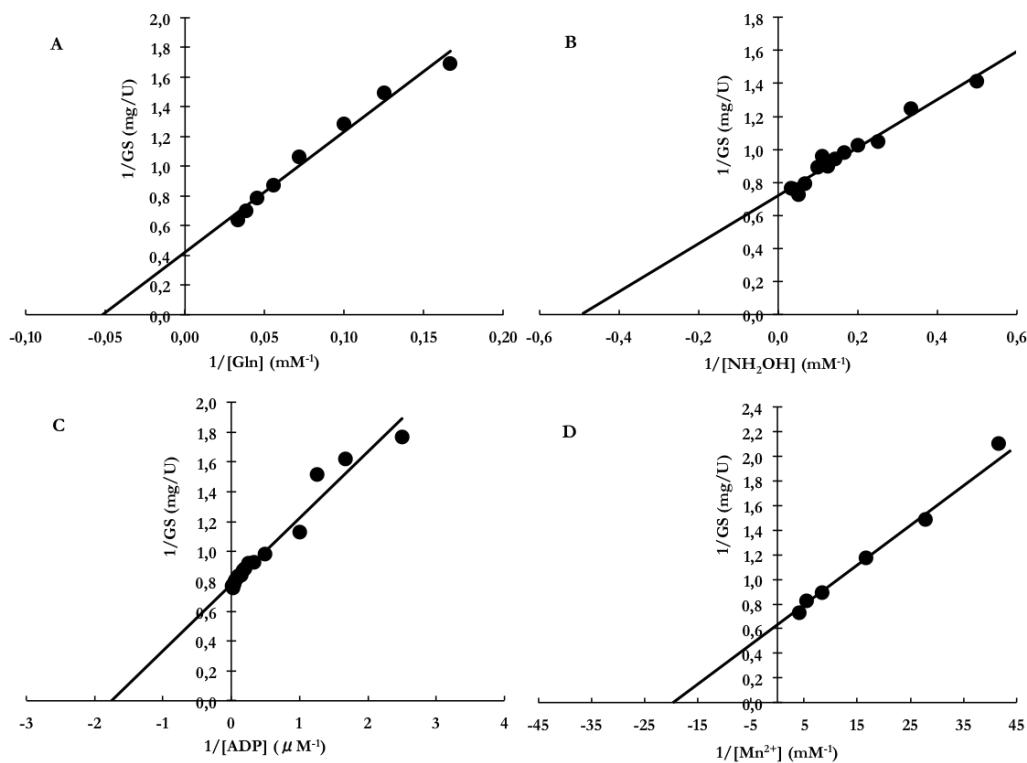


Figura 47. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para glutamina (A), hidroxilamina (B), ADP (C), o el catión divalente manganeso (D), de la actividad GS de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de Gln, NH_2OH , ADP y Mn^{2+} , de los valores representados en la Figura 46.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad GS, en el intervalo de 4 a 8,5, queda reflejado en la Figura 48. Como se puede apreciar, la actividad alcanzó un valor máximo en tampón MOPS 40 mM, pH 6; no obstante, cuando se realizó el ensayo a pH 6,5, la enzima mantuvo su actividad por encima del 90%. En el rango de pH entre 7 y 7,5, la actividad disminuyó en torno al 50% y, para valores superiores e inferiores del intervalo de pH entre 6 y 7,5, la actividad decayó drásticamente por debajo del 40%, obteniéndose valores mínimos a pH 4 y 8,5.

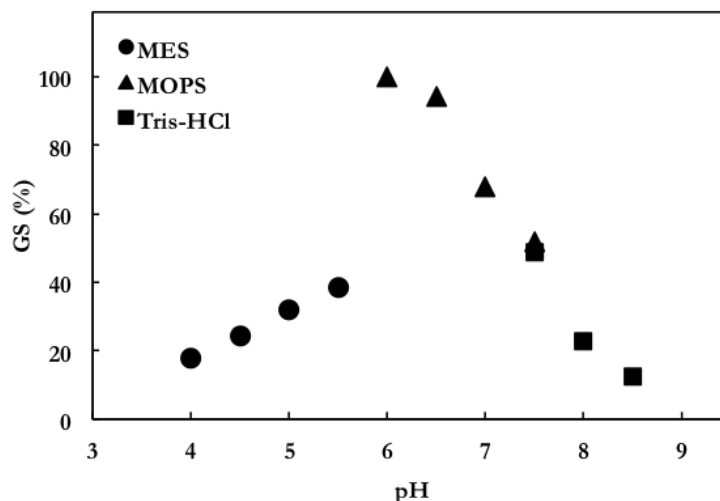


Figura 48. Determinación del pH óptimo de la actividad GS de *C. onubensis*.

Los tampones, utilizados a una concentración de 40 mM en la mezcla de reacción, fueron: MES, pH 4, 4,5, 5 y 5,5; MOPS, pH 6, 6,5, 7 y 7,5; Tris-HCl, pH 7,5, 8 y 8,5. El 100% corresponde a 1,25 U·mg⁻¹ de actividad GS. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 49A muestra la dependencia de la actividad GS con la temperatura en el intervalo comprendido entre 4 y 65 °C. La actividad máximase alcanzó a una temperatura de 40 °C, manteniéndose por encima del 75% cuando se midió entre 30 y 45 °C. Valores inferiores o superiores a este intervalo provocaron una drástica pérdida de actividad, así, fuera del rango entre 25 y 55 °C, la actividad disminuyó sobre un 70%.

A partir de los valores de actividad obtenidos en la zona ascendente de la curva de la Figura 49A, se obtuvo la representación de Arrhenius (Figura 49B) para el proceso catalizado por la GS de *C. onubensis*, obteniéndose un valor de energía de activación de 28,2 kJ·mol⁻¹.

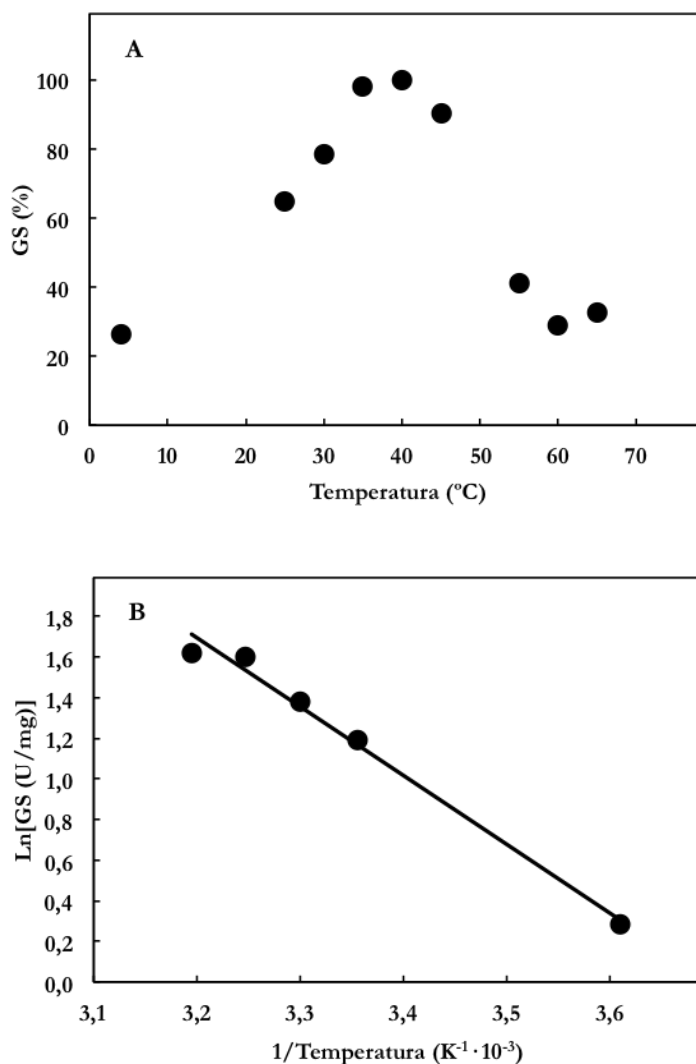


Figura 49. Determinación de la temperatura óptima (A) y energía de activación (B) de la actividad GS de *C. onubensis*. La actividad GS se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas; el 100% corresponde a 1,06 U·mg⁻¹ de actividad GS. Se representa también la ecuación de Arrhenius linealizada a partir del logaritmo neperiano de la actividad GS frente a 1/Temperatura.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la GS de la microalga *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. Como se aprecia en la Figura 50, a 60 °C se produjo una caída drástica de la actividad en el intervalo de tiempo de 15 minutos,

perdiendo toda la actividad a tiempos mayores. A la temperatura de 40 °C, aunque la actividad prácticamente no se afectó durante los primeros minutos, a partir del minuto 15 de incubación se apreció una pérdida de actividad, que llegó a ser del 50% tras una hora de incubación, y del 86% tras 3 horas de ensayo. Por último, a la temperatura de -20 y 4 °C, la actividad mantuvo el 100% en todo el intervalo de tiempo que duró el ensayo.

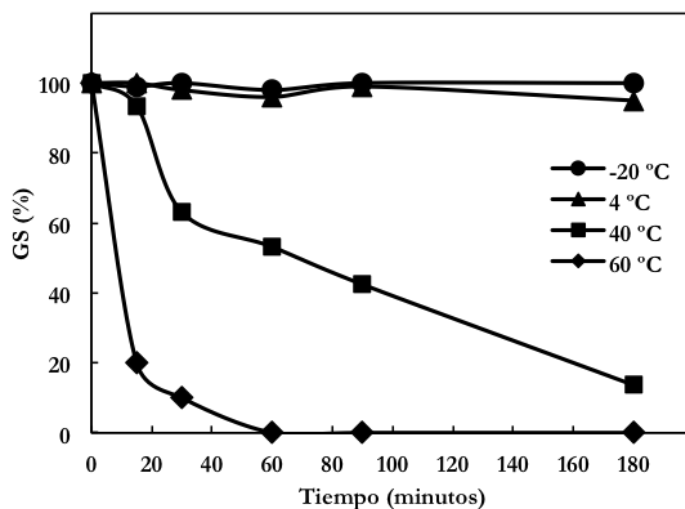


Figura 50. Estabilidad térmica de la actividad GS de *C. onubensis*. La actividad GS se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 1,50 U·mg⁻¹ de actividad GS.

Según la caracterización físico-química realizada para la actividad GS de la microalga *C. onubensis*, se han obtenido valores de Km para glutamina, hidroxilamina, ADP y el catión divalente manganeso de 19,3 mM, 2,0 mM, 0,6 μM y 59,7 μM, respectivamente. El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 6 en tampón MOPS a una concentración de 40 mM, una temperatura óptima de 40 °C y una energía de activación de 28,2 kJ·mol⁻¹.

La Tabla 11 muestra una comparación de estos datos con los de otras GS de organismos fotosintéticos. Los datos de valores óptimos de pH y temperatura, así como los de Km para sus diferentes sustratos, varían notablemente de un organismo a otro. El organismo que presenta el valor más alto de Km para la glutamina de la GS es el altramuz amarillo, seguido de las microalgas *C. onubensis* y *M. braunii*, así como de la cianobacteria *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Por otro lado, la GS de la microalga *C. onubensis*, junto con la de *C. reinhardtii*, son las que presentaron un menor valor de Km para la hidroxilamina, siendo la cianobacteria *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 la que presenta el mayor valor. En cuanto a los valores de Km para los sustratos

ADP y Mn^{2+} , aunque existen pocos datos para la actividad GS transferasa, la enzima de *C. onubensis* mostró mayor afinidad para Mn^{2+} que las isoenzimas de *C. reinhardtii*, con una K_m 3 veces inferior; mientras que para ADP, la GS de *C. onubensis* mostró una K_m 3 veces superior a la de la cianobacteria *Synechocystis* y 100 superior a la de la microalga filamentosa *Calothrix*, o en el caso de la planta del altramuz.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la actividad transferasa de las GS de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	K _m				T ^a Óptimo °C	pH Óptimo
	Gln	NH ₂ OH	ADP	Mn ²⁺		
	mM		μM			
<i>Coccomyxa onubensis</i>	19,3	2,0	0,6	59,7	40	6,0
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>						
GS1	2,5	2,1	nd	210	nd	6,0
GS2	10,0	2,0	nd	200	nd	5,5
<i>Monoraphidium braunii</i>	19,2	6,6	nd	nd	nd	7,0
<i>Prochlorococcus</i> spp.	2,8	3,3	nd	nd	55	7,5
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	14,3	14,5	0,2	nd	34	6,5
<i>Synechococcus</i> RF-1	8,7	7,0	nd	nd	nd	8,4
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	10,0	12,5	0,06	nd	40	6,5
Altramuz amarillo	48,6	3,4	0,06	nd	nd	6,5

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *C. reinhardtii*, Florencio y Vega (1983); *M. braunii*, García-Fernández et al. (1997); *Prochlorococcus* spp., El Alaoui et al. (2003); *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, Mérida et al. (1990); *Synechococcus* RF-1, Yuan et al. (2001); *Calothrix* sp. Strain PCC 7601, Mérida et al. (1990); Altramuz amarillo, Chen y Kennedy (1985). nd indica no determinado.

Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad GS

La Tabla 12 recoge un estudio del efecto que producen distintas sustancias, a diferentes concentraciones, sobre la actividad GS en extractos crudos de *C. onubensis*. Como se puede apreciar, los cationes monovalentes produjeron un ligero aumento de la actividad GS respecto al control. Cuando se adicionó ditiotreititol (DTT) a la mezcla de reacción, la actividad GS no se vio afectada a una concentración de 1 mM, si bien la enzima se activó un 20%, respecto al control, al aumentar 5 veces la concentración del agente, por lo que en el ensayo de actividad GS de *C. onubensis* puede utilizarse DTT como agente activador del proceso. La metionina sulfoximina (MSO) produjo una inhibición en torno al 50% de la actividad a una concentración de 1 mM, llegando a ser del 74% con MSO 5 mM. El MSO es un inhibidor que compite con el glutamato o glutamina por el centro activo, siendo el isómero S el que provoca una mayor inhibición en la GS (Liaw y Eisenberg, 1994; Eisenberg et al., 2000). En este sentido, los resultados obtenidos para la GS de *C. onubensis* fueron muy similares a los observados en otros organismos como en la microalga *M. braunii* (García-Fernández

et al., 1997) o la arquea *Haloferax mediterranei* (Martínez-Espinosa et al., 2006), en la cual el MSO llegó a inhibir la actividad GS un 80%, a una concentración de 5 mM.

Tabla 12. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad GS de *C. onubensis*.

Agente	GS (%)	
	1 mM	5 mM
Ninguno (control)	100	100
Na ⁺	103,0	105,9
K ⁺	103,0	106,8
DTT	109,2	119,8
MSO	51,2	26,0

Se determinó la actividad GS según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a 1,17 U·mg⁻¹ de actividad GS.

Tabla 13. Efecto de diferentes cationes divalentes sobre la actividad GS de *C. onubensis*

Cationes divalentes (5 mM)	GS (%)
Control (con Mn) menos Mn	100 1,5
Ba	13,9
Ca	3,4
Cd	12,4
Co	20,4
Cu	3,6
Fe	18,1
Hg	1,1
Zn	1,8
Mg	96,8
menos Mn; más Mg	4,3

Se determinó la actividad GS según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a 1,17 U·mg⁻¹ de actividad GS.

Dada la importancia que tiene el Mn²⁺ en el ensayo de actividad GS, tal y como se indicó en la caracterización del ensayo de actividad (Tabla 10), se realizó un estudio de inhibición adicionando diferentes cationes divalentes (a una concentración de 5 mM) a la mezcla de reacción del ensayo de actividad GS, que contenía Mn²⁺. El estudio se recoge en la Tabla 13. Como se puede apreciar, la mayoría de los cationes divalentes utilizados mostraron un efecto inhibitor (superior al 80%) sobre la actividad GS, siendo máximo el efecto para el Hg²⁺, inhibición que posiblemente se deba al bloqueo del dominio de interacción de la enzima con el Mn²⁺. A diferencia del resto de metales, el Mg²⁺ no provocó efecto alguno sobre la actividad de la

enzima, aunque no fue capaz de sustituir al Mn^{2+} en el ensayo de actividad, indicando la fuerte especificidad de la actividad GS transferasa de *C. onubensis* por el manganeso.

El Mn^{2+} está considerado como el principal cofactor metálico para la actividad transferasa de la GS, tal y como ocurre en algunos organismos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Rachim y Nicholas, 1985) o *H. mediterranei* (Martínez-Espinosa et al., 2006); si bien, a diferencia de lo observado en *C. onubensis*, en *Lupinus luteus* (Chen y Kennedy, 1985) o *S. sclerotiorum* (Rachim y Nicholas, 1985), el Mg^{2+} puede sustituirlo en el medio de reacción, mientras que en la microalga *M. braunii*, el Mg^{2+} solo puede hacerlo eficazmente a altas concentraciones (García-Fernández et al., 1997).

Resultados similares se han obtenido para la arquea *H. mediterranei*, donde se ha estudiado el efecto que provocaron el Ni^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y el Cu^{2+} , al ser adicionados a la mezcla de reacción del ensayo de actividad transferasa. Al igual que ocurrió en *C. onubensis*, todos los cationes tuvieron efecto negativo sobre la actividad GS, si bien el Co^{2+} y Zn^{2+} fueron los que mostraron los mayores efectos inhibidores a concentraciones superiores a 3 mM (Martínez-Espinosa et al., 2006). De la misma manera, en la cianobacteria *Synechococcus* RF-1, el Fe^{2+} , el Cu^{2+} y el Zn^{2+} (1mM), también inhibieron notablemente la actividad GS (Yuan et al., 2001).

Ensayo de actividad en gel

La Figura 51 muestra el resultado de un ensayo de actividad de la GS de las microalgas *C. onubensis* (calle 1) y *C. reinhardtii* (calle 2), en gel de poliacrilamida y en condiciones nativas. Como puede apreciarse, el extracto de *C. onubensis* presentó una única banda con actividad GS, indicativo de la existencia de una única isoforma con actividad GS, a diferencia de lo observado para el extracto de *C. reinhardtii*, en el que aparecen las dos bandas de actividad características de las dos isoformas de GS que posee la microalga. Aunque la presencia de varias isoformas con actividad GS ha sido documentado en algas, como en el caso de *Chlamydomonas* (Florencio y Vega, 1983), o *Chlorella* (Sumar et al., 1984), y en plantas superiores (Monza y Márquez, 2004); en la microalga *M. braunii* se ha detectado solo una única isoforma (García-Fernández et al., 1995), al igual que lo observado en *C. onubensis*.

De las distintas isoformas de GS, la denominada GSII es la típica de los eucariotas. Su estructura cuaternaria está compuesta por ocho subunidades con una masa molecular de, aproximadamente, 350 kDa (Forde y Cullimore, 1989). Tanto en plantas como en *Chlamydomonas* existen dos isoformas que difieren en su localización intracelular, la GS1 citosólica de 373 kDa y la GS2 cloroplástica de 380 kDa (Florencio y Vega, 1983; Monza y Márquez, 2004). Las subunidades de la GS cloroplástica tienen una masa molecular alrededor de 43-45 kDa, ligeramente superior que las citosólicas (37-40 kDa). Aunque la movilidad electroforética en condiciones nativas no permite obtener un valor real del peso molecular de la enzima, en la Figura 51 se puede apreciar como la GS de *C. onubensis* presentó menor movilidad electroforética que en el caso de las isoenzimas de *C. reinhardtii*,

presentando un peso molecular estimado de 440 kDa, lo que indicaría que, suponiendo que está formada por 8 subunidades como ocurre en las GS eucarióticas, cada subunidad tendría un peso molecular aproximado de 55 kDa.

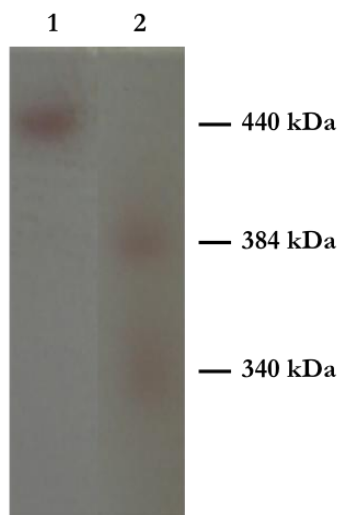


Figura 51. Ensayo de actividad GS en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*. Calle 1, actividad GS en extracto crudo de *C. onubensis* (27 μ g); calle 2, actividad GS en extracto crudo de *C. reinhardtii* (25 μ g). La actividad GS en gel se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

2.3. Caracterización de la actividad glutamato deshidrogenasa de *C. onubensis*

La glutamato deshidrogenasa (GDH) es una enzima que cataliza la reacción entre el 2-oxoglutarato y el amonio para formar glutamato, utilizando piridín nucleótido como cofactor enzimático. La enzima es reversible, así, en el proceso anabólico (sentido aminante), actuaría como ruta alternativa al ciclo GS/GOGAT para la asimilación de amonio; mientras que en el proceso catabólico (sentido desaminante), actuaría desaminando el glutamato (Oaks, 1994; Robinson et al., 1992).

Las Tablas 14 y 15 recogen la caracterización del ensayo de actividad GDH aminante y desaminante, respectivamente, en extractos crudos de *C. onubensis*.

Tabla 14. Caracterización de las actividades GDH aminantes en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*

Condiciones	GDH (U·mg ⁻¹)	GDH (%)
NADH-GDH (completo)	12,67	100
menos tampón Tris-HCl, pH 9	0	0
menos 2-oxoglutarato	1,05	8,3
menos NH ₄ Cl	2,52	19,9
menos NADH	0,03	0,2
menos EC; más EC a 100 °C	0	0
NADPH-GDH	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 50 µmol de tampón Tris-HCl, pH 9; 100 µl de extracto crudo (EC); 10 µmol de 2-oxo; 100 µmol de NH₄Cl; y 0,3 µmol de NADH. Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada; o bien sustituyendo el NADH por 0,3 µmol de NADPH. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad GDH aminante. Más detalles sobre el ensayo de actividad en Materiales y Métodos.

Tabla 15. Caracterización de las actividades GDH desaminantes en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*

Condiciones	GDH (U·mg ⁻¹)	GDH (%)
NAD⁺-GDH (completo)	5,47	100
menos tampón Tris-HCl, pH 9,5	0	0
menos glutamato	0,05	0,9
menos NAD ⁺	0	0
menos EC; más EC a 100 °C	0	0
NADP⁺-GDH	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 50 µmol de tampón Tris-HCl, pH 9,5; 100 µl de extracto crudo (EC); 50 µmol de Glu; y 2 µmol de NAD⁺. Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada; o bien sustituyendo el NAD⁺ por 2 µmol de NADP⁺. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad GDH desaminante. Más detalles sobre el ensayo de actividad en Materiales y Métodos.

La actividad aminante (Tabla 14) se mostró absolutamente dependiente de la presencia de sus sustratos 2-oxoglutarato (2-oxo) y NADH en la mezcla de reacción, con respecto al ensayo general; no obstante, en ausencia de amonio, se observó una actividad residual, posiblemente debida a la presencia de amonio en el extracto crudo. En ausencia del tampón Tris-HCl 50 mM (pH 9) en el medio de reacción, la actividad disminuyó notablemente, indicando la absoluta necesidad de tamponar el

medio de reacción. Por último, el ensayo realizado con la enzima desnaturalizada confirmó la naturaleza biológica de la reacción catalizada.

En cuanto a la caracterización de la actividad GDH desaminante (Tabla 15), la enzima se mostró también dependiente de la presencia de sus sustratos glutamato (Glu) y NAD^+ en la mezcla de reacción, respecto al ensayo completo. Al igual que ocurrió con la actividad aminante, la desaminante también requiere que el medio esté tamponando para desarrollar el proceso catalítico.

2.3.1. Propiedades cinéticas de la actividad glutamato deshidrogenasa aminante

Parámetros cinéticos

La Figura 52 muestra los resultados obtenidos para la actividad GDH aminante cuando se utilizaron concentraciones variables de 2-oxoglutarato (Figura 52A), NADH (Figura 52B) y amonio (Figura 52C), en la mezcla de reacción.

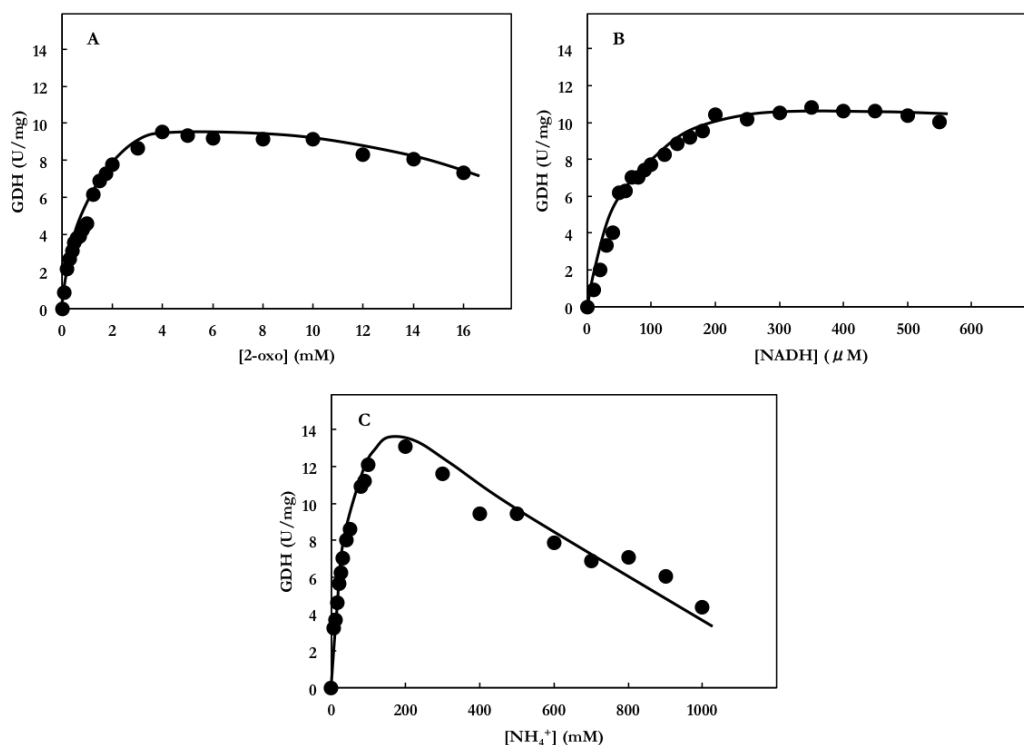


Figura 52. Representación de Michaelis-Menten de la actividad GDH aminante de *C. onubensis* en función de la concentración de 2-oxoglutarato (A), NADH (B), o amonio (C). La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de 2-oxo, NADH y NH_4Cl , en la mezcla de reacción, que variaron según se indica.

Como puede observarse, en todos los casos ensayados, la GDH presentó una cinética clásica de Michaelis-Menten. Además, es importante señalar que, a excepción del NADH, en el caso del 2-oxoglutarato y amonio se aprecia una curvatura descendente, indicativa de una posible inhibición por sustrato a partir de concentraciones superiores de 12 mM para 2-oxoglutarato y de 300 mM para NH_4Cl , siendo más significativo en este último caso.

Para determinar el valor de K_m se realizó la representación de dobles inversos para cada sustrato tal y como se muestra en la Figura 53, obteniéndose los valores de K_m de 1,1 mM para 2-oxoglutarato; 54,2 μM para NADH; y 29,0 mM para amonio.

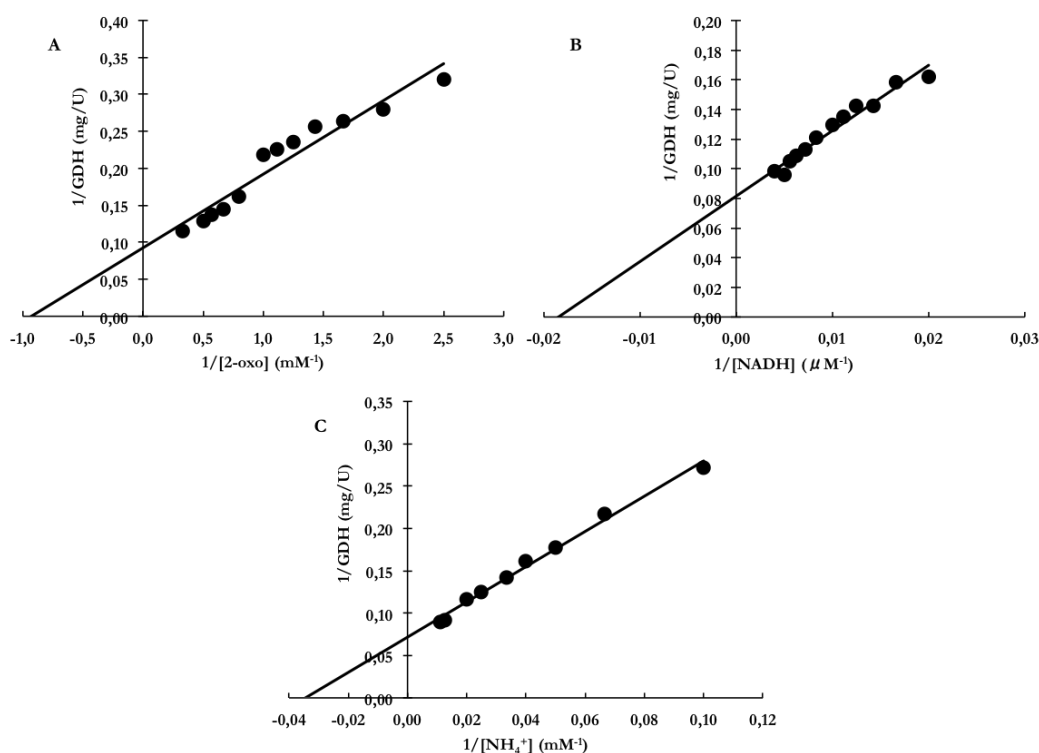


Figura 53. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para 2-oxoglutarato (A), NADH (B), o amonio (C), de la actividad GDH aminante de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de 2-oxo, NADH y NH_4Cl , de los valores representados en la Figura 52.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad GDH aminante, en el intervalo de 3 a 12,5, queda reflejado en la Figura 54. Como se puede apreciar, la actividad GDH se mantiene máxima en el rango de pH entre 9 y 11, en tampón Tris-HCl 50 mM. Entre pH 8 y 12, la actividad enzimática se mantuvo superior al 85% respecto al valor máximo, para caer drásticamente a valores superiores e inferiores de este intervalo, así, por debajo de pH 7,5 o por encima de pH 12, la actividad decayó más del 65%, obteniéndose los valores mínimos en el rango de pH entre 3 y 6.

Es importante destacar como, para los mismos valores de pH, cuando se utilizó tampón fosfato potásico en lugar del Tris-HCl, se produjo un efecto inhibitor de la actividad GDH del 20% a pH 7,5 y del 50% a pH 8.

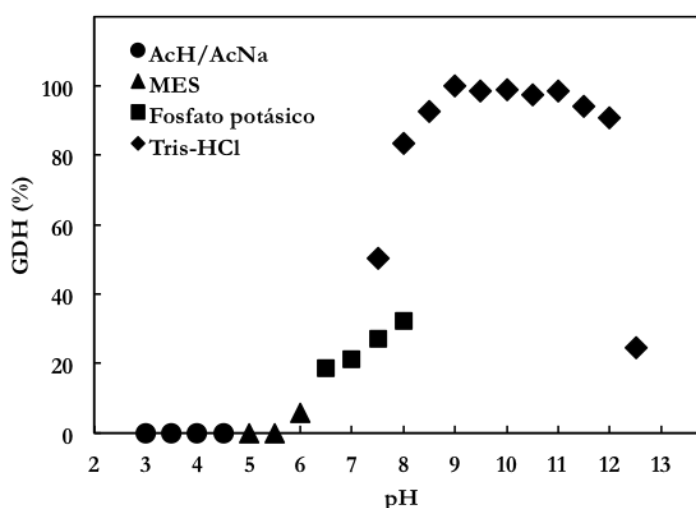


Figura 54. Determinación del pH óptimo de la actividad GDH aminante de *C. onubensis*. Los tampones, utilizados a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción, fueron: AcH/AcNa, pH 3, 3,5, 4 y 4,5; MES, pH 5, 5,5 y 6; fosfato potásico, pH 6,5, 7, 7,5 y 8; Tris- HCl, pH 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12 y 12,5. El 100% corresponde a 11,30 U·mg⁻¹ de actividad GDH. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 55 muestra la dependencia de la actividad GDH aminante con la temperatura en el intervalo comprendido entre 10 y 75 °C. La actividad máxima se alcanzó a una temperatura de 60 °C, manteniéndose por encima del 75% cuando se midió entre 40 y 75 °C. Valores inferiores a este intervalo provocaron una disminución de la actividad hasta un 70%.

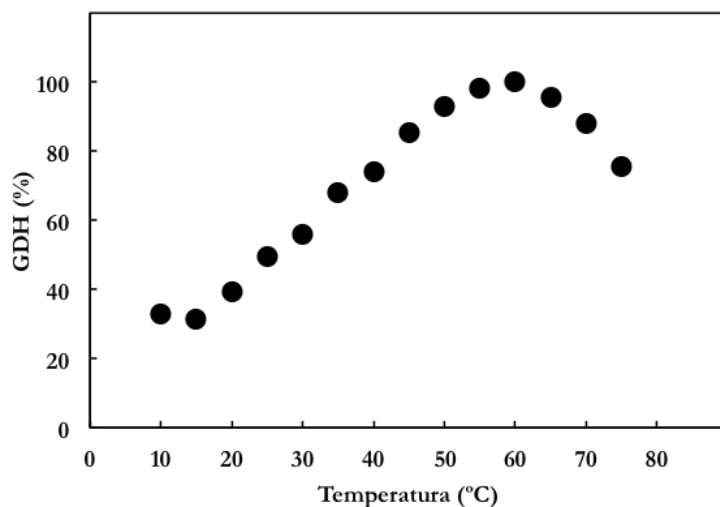


Figura 55. Determinación de la temperatura óptima de la actividad GDH aminante de *C. onubensis*. La actividad GDH se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a $12,94 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad GDH.

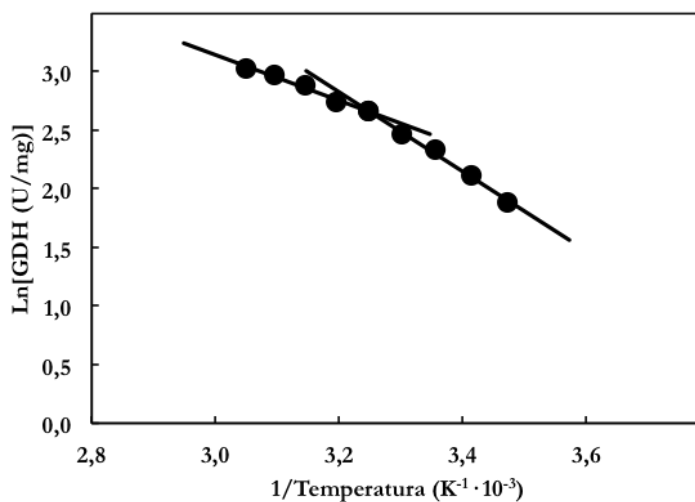


Figura 56. Determinación de la energía de activación de la actividad GDH aminante de *C. onubensis*. Representación de Arrhenius del logaritmo neperiano de la actividad GDH frente a $1/\text{Temperatura}$, de los valores obtenidos en la Figura 55.

A partir de los valores de actividad obtenidos en la zona ascendente de la curva, se obtuvo la representación de Arrhenius, mostrada en la Figura 56. Los valores comprendidos entre 15 y 55 °C se disponen linealmente distinguiéndose dos

pendientes distintas. A partir de estos resultados obtenidos en esta representación, se calcularon las energías de activación para la reacción catalizada por la GDH aminante, obteniéndose un valor de $28,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre 15 y 35 °C, y de $16,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre 35 y 55 °C, lo que parece indicar que el proceso catalizado se realiza en dos etapas.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la actividad GDH aminante de *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. La Figura 57 muestra el estudio realizado, donde se aprecia cómo a las temperaturas de 50 y 60 °C se produjo una caída drástica de la actividad en el intervalo de tiempo de 30 minutos, concretamente un 53,5 y 70%, respectivamente, disminuyendo la actividad poco a poco, manteniendo un 19 y 8% de actividad, respectivamente, cuando finalizó el ensayo. A las temperaturas de -20, 4, 24 y 40 °C, se aprecia que la actividad se mantuvo por encima de un 60% durante todo el intervalo de tiempo que duró el ensayo (5,5 horas), indicando con ello la alta estabilidad de la GDH en comparación con lo observado para la NiR y la GS de la microalga *C. onubensis*.

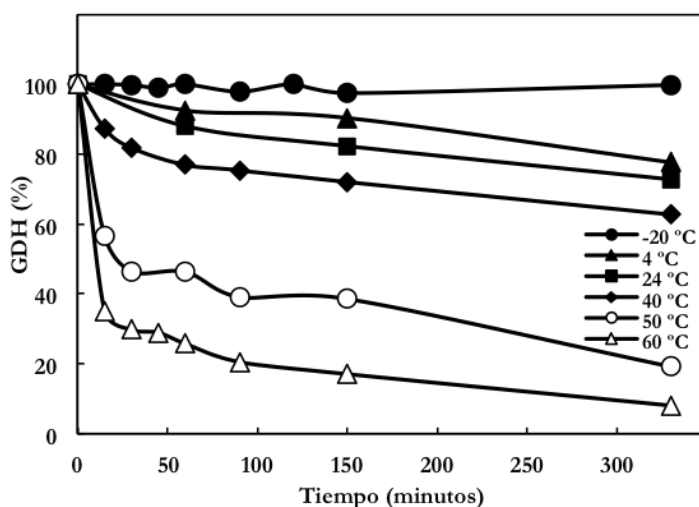


Figura 57. Estabilidad térmica de la actividad GDH de *C. onubensis*. La actividad GDH se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a $13,68 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de actividad aminante de GDH.

Según la caracterización físico-química realizada para la actividad GDH aminante de *C. onubensis*, se han obtenido valores de K_m para 2-oxoglutarato, NADH y amonio de 1,1 mM, $54,2 \mu\text{M}$ y 29,0 mM, respectivamente. El proceso catalítico requiere un rango de pH óptimo entre 9 y 11 en tampón Tris-HCl 50 mM, una

temperatura óptima de 60 °C y dos energías de activación de 28,1 y 16,2 kJ·mol⁻¹, respectivamente. La Tabla 16 muestra una comparación de los datos obtenidos para la actividad GDH aminante de *C. onubensis* con los reportados para otras GDH de origen fotosintético. En relación al pH, se puede comprobar que la gran mayoría de las enzimas poseen un valor de pH óptimo entre 8 y 9, valores muy similares a los obtenidos en el caso de *C. onubensis*. Por otro lado, la temperatura óptima obtenida para la actividad GDH aminante de *C. onubensis* coincide también con los valores reportados para las isoformas de *C. reinhardtii*.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la actividad aminante de las GDH de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	Km			T ^a	pH Óptimo
	2-oxo	NH ₄ ⁺	NADH		
	mM	μM	μM	°C	
<i>Coccomyxa onubensis</i>	1,1	29,0	54,2	60	9,0-11,0
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>					
GDH1	0,36	30,0	70,0	60	8,5
GDH2	1,23	13,0	140,0	62	8,5
GDH3	0,59	44,0	90,0	61	8,5
<i>Chlorella sorokiniana</i>	2,0	40,0	150,0	nd	8,0
<i>Stichococcus bacillaris</i> Naeg.	0,38	33,0	19,0	nd	8,1
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1,0	35,0	30,0	nd	7,25-7,75
<i>Vitis vinifera</i>	2,1	45,0	195,0	nd	8,0
<i>Brassica napus</i>					
GDH1	0,87	nd	24,0	nd	9,0
GDH2	0,64	nd	21,0	nd	9,0
<i>Brassica rapa</i>	2,0	nd	90,0	nd	8,0
Hojas de maíz	1,5	101,0	36,5	nd	8,1
Plántulas de soja	3,6	35,5	70,0	nd	8,0

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *C. reinhardtii*, Moyano et al. (1992); *C. sorokiniana*, Meredith et al. (1978); *S. bacillaris* Naeg., Ahmad y Hellebust (1986); *S. microadriaticum*, Dudler y Miller (1988); *V. vinifera*, Loulakis y Roubelakis-Angelakis (1990); *B. napus*, Watanabe et al. (1999); *B. rapa*, Itagaki et al. (1988); Hojas de maíz, Bulen (1956); Plántulas de soja, Turano et al. (1996). nd indica no determinado.

En la mayoría de los organismos fotosintéticos reseñados, los valores de Km para el amonio de la actividad GDH aminante se encuentran comprendidos entre 30 y 45 mM, como es el caso de la microalga *C. onubensis*. Mayor diferencia existe para NADH y 2-oxoglurato, donde la actividad GDH aminante de *C. onubensis* mostró valores intermedios.

2.3.2. Propiedades cinéticas de la actividad glutamato deshidrogenasa desaminante

Parámetros cinéticos

La Figura 58 muestra los resultados obtenidos para la actividad GDH desaminante cuando se utilizaron concentraciones variables de glutamato (Figura 58A) y NAD^+ (Figura 58B) en la mezcla de reacción.

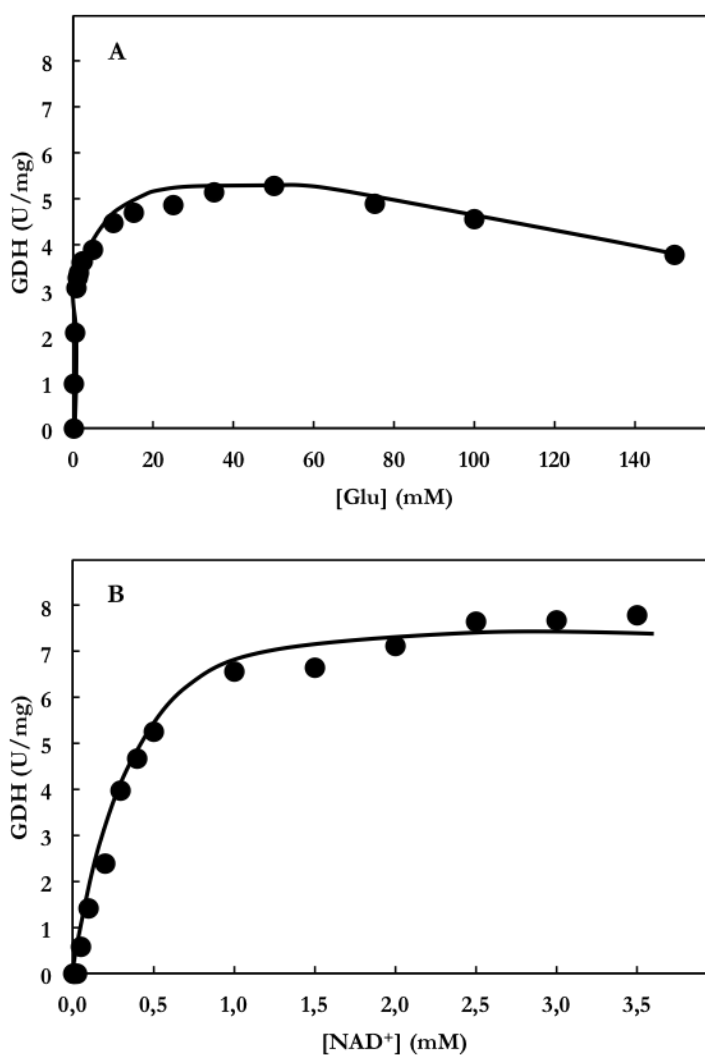


Figura 58. Representación de Michaelis-Menten de la actividad GDH desaminante de *C. onubensis* en función de la concentración de glutamato (A), o NAD^+ (B). La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de Glu y NAD^+ en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

Como ocurrió en la actividad aminante, la desaminante también presentó un comportamiento cinético clásico de Michaelis-Menten. La actividad presentó inhibición por glutamato a partir de concentraciones superiores a 50 mM. La determinación de los valores de K_m se realizó a partir de la representación de Lineweaver-Burk, tal y como se muestra en la Figura 59, obteniéndose un valor de 1,1 mM para glutamato y de 0,8 mM para NAD^+ .

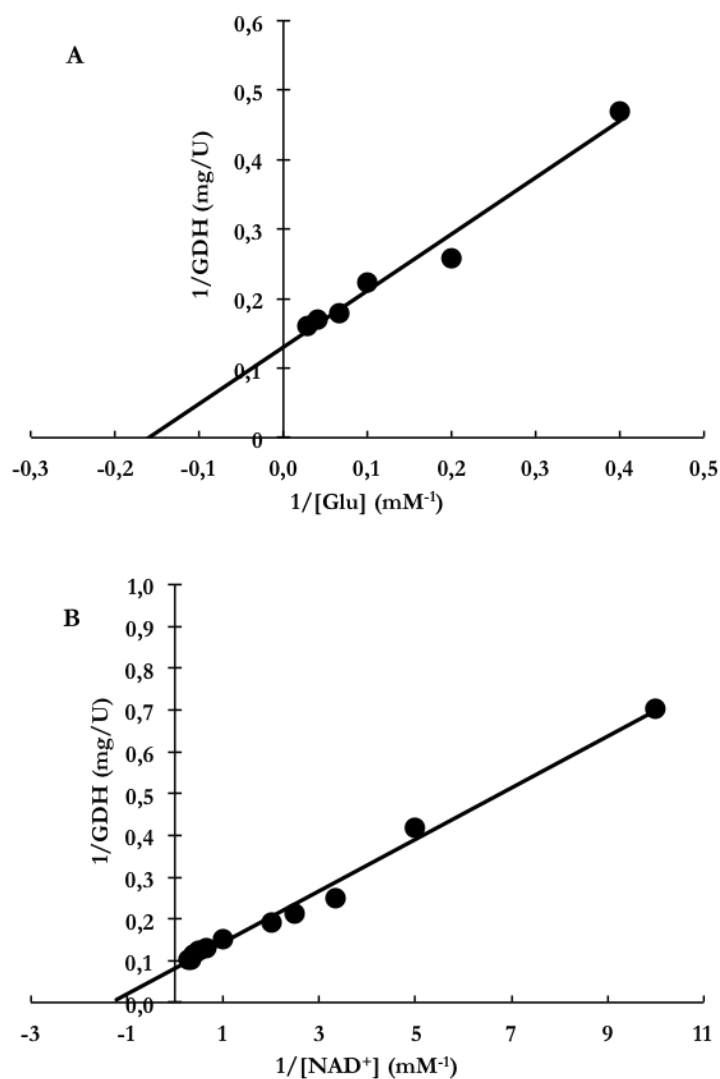


Figura 59. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para glutamato (A), o NAD^+ (B), de la actividad GDH desaminante de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de Glu y NAD^+ , de los valores representados en la Figura 58.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad GDH desaminante, en el intervalo de 3 a 12,5, queda reflejado en la Figura 60, donde se aprecia como la actividad alcanza un valor máximo en el rango de pH entre 9,5 y 11,5, en tampón Tris-HCl 50 mM. A valores de pH entre 9 y 12,5, la actividad enzimática se mantuvo al 90% respecto al valor máximo, para ir cayendo drásticamente a valores inferiores de este intervalo, así, por debajo de pH 7,5, la actividad decayó hasta un 60%, obteniéndose los valores mínimos en el rango de pH entre 3 y 7.

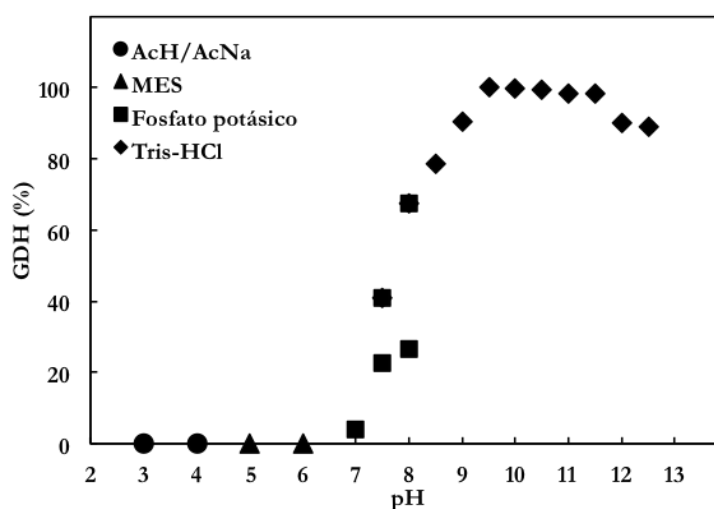


Figura 60. Determinación del pH óptimo de la actividad GDH desaminante de *C. onubensis*. Los tampones, utilizados a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción, fueron: AcH/AcNa, pH 3, 3,5, 4 y 4,5; MES, pH 5, 5,5 y 6; fosfato potásico, pH 6,5, 7, 7,5 y 8; Tris-HCl, pH 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12 y 12,5. El 100% corresponde a 5,28 U·mg⁻¹ de actividad GDH. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 61 muestra la dependencia de la actividad GDH desaminante con la temperatura en el intervalo comprendido entre 10 y 75 °C. La actividad máxima se alcanzó a una temperatura de 50 °C, manteniéndose por encima del 85% cuando se midió entre 40 y 65 °C. A diferencia de la actividad GDH aminante, la desaminante cayó drásticamente a temperaturas superiores a 65 °C. Por otro lado, al igual que ocurrió con la actividad aminante, también se obtuvieron dos pendientes a partir de la representación de Arrhenius (Figura 62) correspondiente, con valores de energía de activación de 19,6 kJ·mol⁻¹ y de 13,3 kJ·mol⁻¹.

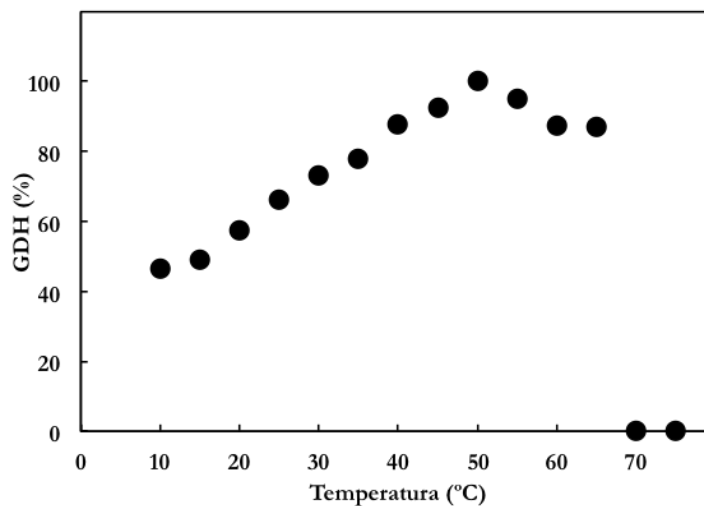


Figura 61. Determinación de la temperatura óptima de la actividad GDH desaminante de *C. onubensis*. La actividad GDH se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a $6,71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad GDH.

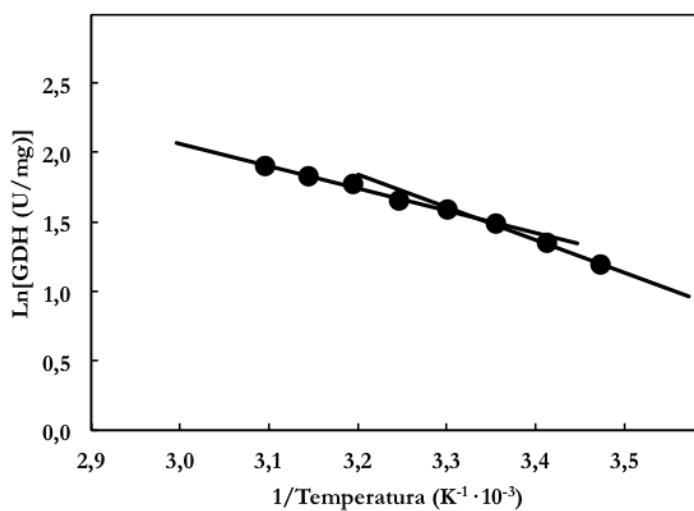


Figura 62. Determinación de la energía de activación de la actividad GDH desaminante de *C. onubensis*. Representación de Arrhenius del logaritmo neperiano de la actividad GDH frente a $1/\text{Temperatura}$, de los valores obtenidos en la Figura 61.

En base a estos resultados, la actividad GDH desaminante de *C. onubensis* posee valores de Km para glutamato y NAD⁺ de 1,1 mM y 0,8 mM, respectivamente. El proceso catalítico requiere un rango de pH óptimo entre 9,5 y 11,5 en tampón Tris-HCl 50 mM, una temperatura óptima de 50 °C y dos energías de activación de 19,6 y 13,3 kJ·mol⁻¹, respectivamente.

A modo de resumen comparativo, la Tabla 17 muestra los datos de caracterización cinética para distintas GDH desaminantes de origen fotosintético. En relación al valor de pH óptimo, la gran mayoría de GDH posee un valor comprendido entre 9 y 9,5, muy similares al valor obtenido para la actividad de la microalga *C. onubensis*, y algo superior a los observados para la actividad aminante. Por otro lado, la temperatura de las tres isoformas de *C. reinhardtii* presentan valores superiores a la de *C. onubensis*, cuya temperatura óptima fue de 50 °C.

En cuanto a los valores de Km para glutamato, los organismos fotosintéticos señalados presentan valores muy diferentes entre sí, siendo la microalga *C. sorokiniana* la que presenta un mayor valor de Km. Hay que destacar que la actividad GDH de la microalga *C. onubensis* presentó mayor afinidad por el glutamato que el resto de enzimas, siendo comparable con el valor reportado para la isoforma GDH1 de la microalga *C. reinhardtii*. Por otro lado, en cuanto al sustrato NAD⁺, *C. onubensis* fue la que presentó un mayor valor de Km con respecto a los organismos señalados.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la actividad desaminante de las GDH de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	Km		T ^a °C	pH Óptimo
	Glu	NAD ⁺		
	mM			
<i>Coccomyxa onubensis</i>	1,1	0,80	50	9,5-11,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>				
GDH1	0,64	0,20	60	9,0
GDH2	3,52	0,26	62	9,0
GDH3	3,00	0,32	61	9,0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	60,0	0,15	nd	9,0
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	39,0	0,21	nd	9,0-9,5
<i>Vitis vinifera</i>	18,0	0,07	nd	9,3
<i>Brassica napus</i>				
GDH1	3,23	0,12	nd	9,5
GDH2	3,32	0,15	nd	9,5
<i>Brassica rapa</i>	28,2	0,25	nd	9,5
Plántulas de soja	15,8	0,10	nd	9,3

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *C. reinhardtii*, Moyano et al. (1992); *C. sorokiniana*, Meredith et al. (1978); *S. microadriaticum*, Dudler y Miller (1988); *V. vinifera*, Loulakakis y Roubelakis-Angelakis (1990); *B. napus*, Watanabe et al. (1999); *B. rapa*, Itagaki et al. (1988); Plántulas de soja, Turano et al. (1996). nd indica no determinado.

Ensayo de actividad en gel

La Figura 63 muestra el resultado de un ensayo de actividad GDH desaminante en gel de poliacrilamida, en condiciones nativas, de la enzima GDH de *C. onubensis*. Como puede apreciarse, la existencia de una única banda de actividad es consecuente con el hecho de que en *C. onubensis* existe una única isoforma de la GDH, tal y como se ha descrito en otros organismos como *C. sorokiniana* (Meredith et al., 1978) o la planta *V. vinifera* (Loulalakis y Roubelakis-Angelakis, 1990). En cambio, en la microalga *C. reinhardtii* (Moyano et al., 1992), *B. napus* (Watanabe et al., 1999), o plántulas de soja (Turano et al., 1996), se han identificado varias isoformas de la enzima. Además, se ha descrito que la configuración de la enzima de diversos organismos puede ser hexamérica, tal y como ocurre con la GDH de *C. reinhardtii* (Moyano et al., 1992) o *Chlorella pyrenoidosa* (Shatilov y Kretovich, 1977); o tetramérica, como ocurre en *C. sorokiniana* (Meredith et al., 1978) o *Neurospora* (Smith et al., 1975).

A partir de los patrones utilizados se pudo estimar un peso molecular aparente para la GDH de *C. onubensis* de 285 kDa, algo superior al descrito para la GDH de otros organismos fotosintéticos con una configuración hexamérica, que varía entre 240-270 kDa (Moyano et al., 1992).



Figura 63. Ensayo de actividad GDH desaminante en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* (27,7 µg). La actividad GDH desaminante se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

2.4. Efecto del estrés abiótico sobre los niveles de actividad NiR, GS y GDH de *C. onubensis*

Una vez caracterizados los ensayos de actividad de la nitrato reductasa, glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa, en los correspondientes extractos crudos de *C. onubensis*, a continuación se muestra un estudio sobre el efecto que provocó la presencia, en el medio de cultivo, de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) (arsenito) o As(V) (arseniato), sobre las actividades de las tres enzimas. En todos los casos ensayados, las células se mantuvieron creciendo a pH ácido durante 8 días, en ausencia (control) o presencia del metal o metaloide. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron, se prepararon los extractos crudos correspondientes y se determinaron los niveles de actividad de las enzimas indicadas, respecto al control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El estudio sobre la actividad NiR se muestra en la Figura 64. Como puede apreciarse, en todos los casos ensayados se observó un descenso en la actividad NiR a medida que fue aumentando la concentración del metal o metaloide en el medio de cultivo. El mayor efecto inhibitor lo produjo el mercurio, provocando un descenso de la actividad NiR del 30% a una concentración de 0,5 μM , siendo necesario concentraciones de 200 μM de Cu^{2+} y 500 μM de Cd^{2+} para apreciar un efecto similar al observado con mercurio. También se observaron diferencias en cuanto a las dos formas de arsénico utilizadas (arsenito y arseniato), como se muestra en la Figura 64. El As(III) 500 μM provocó un descenso de la actividad NiR del 60%, mayor al observado con cobre o cadmio, mientras que a una concentración 10 veces superior (5 mM) de As(V), la enzima mantuvo casi el 80 % de su actividad.

La Figura 65 muestra el estudio realizado sobre la actividad GS. Como se aprecia en la figura, al igual que ocurrió en el caso de la NiR, la presencia de Hg^{2+} en el medio de cultivo provocó el mayor efecto sobre los niveles de actividad de la GS de *C. onubensis*, reduciéndola un 30% a una concentración de 0,5 μM . Por el contrario, el Cu^{2+} no provocó efecto significativo sobre los niveles de actividad de la GS, observándose un ligero descenso a concentraciones superiores a 1 mM. El Cd^{2+} y el As(III) provocaron un descenso de la actividad GS, si bien en este caso, el efecto fue mayor en el caso del Cd^{2+} , ya que a una concentración de 500 μM se redujo la actividad GS un 45%, mientras que el As(III) solo provocó un descenso del 35%. Por su parte, el As(V), al igual que el cobre, no produjo efecto alguno sobre los niveles de actividad GS de *C. onubensis*.

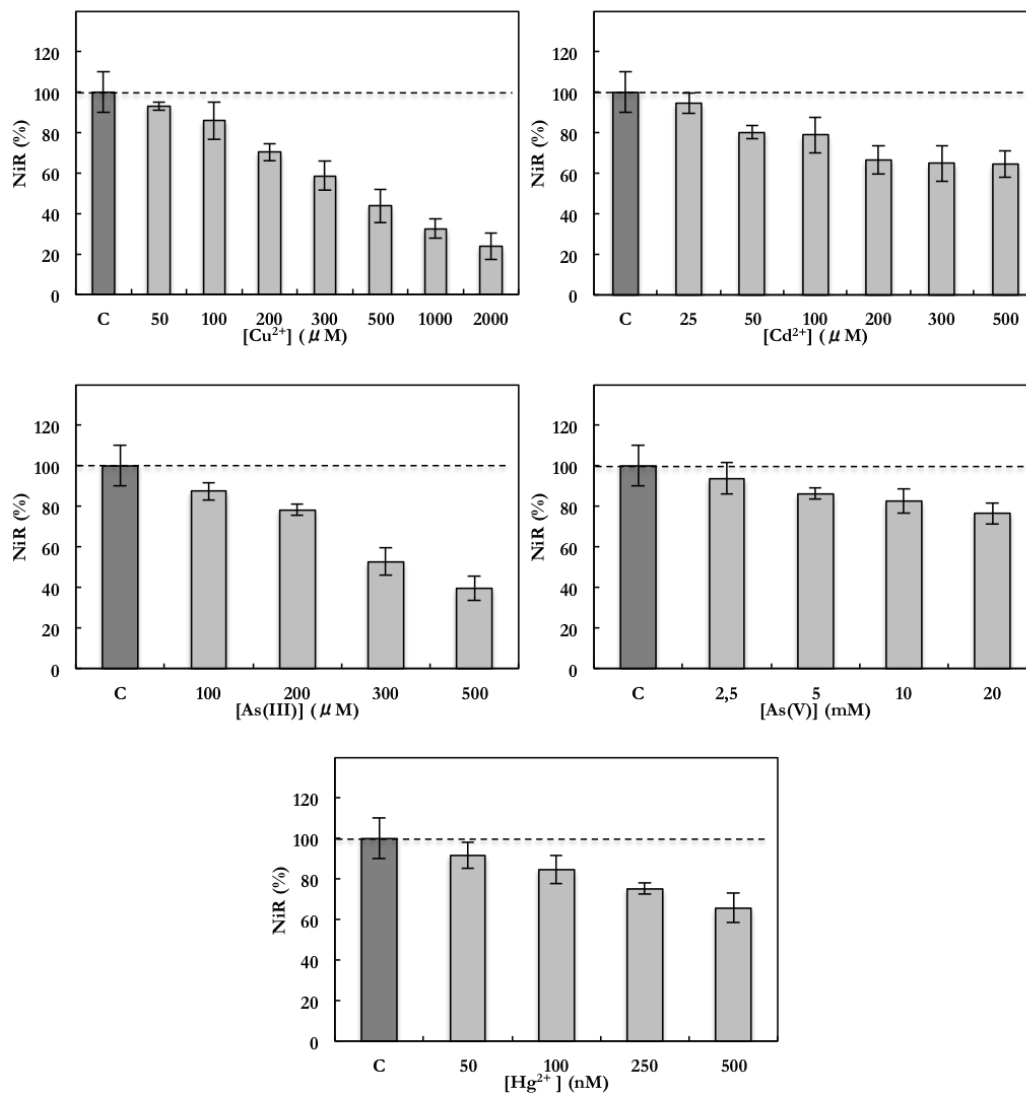


Figura 64. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad NiR en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO_3 , en ausencia (control) o presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) o As(V) , a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad NiR en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. $568,69 \pm 5,37 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ corresponde al 100% de actividad NiR.

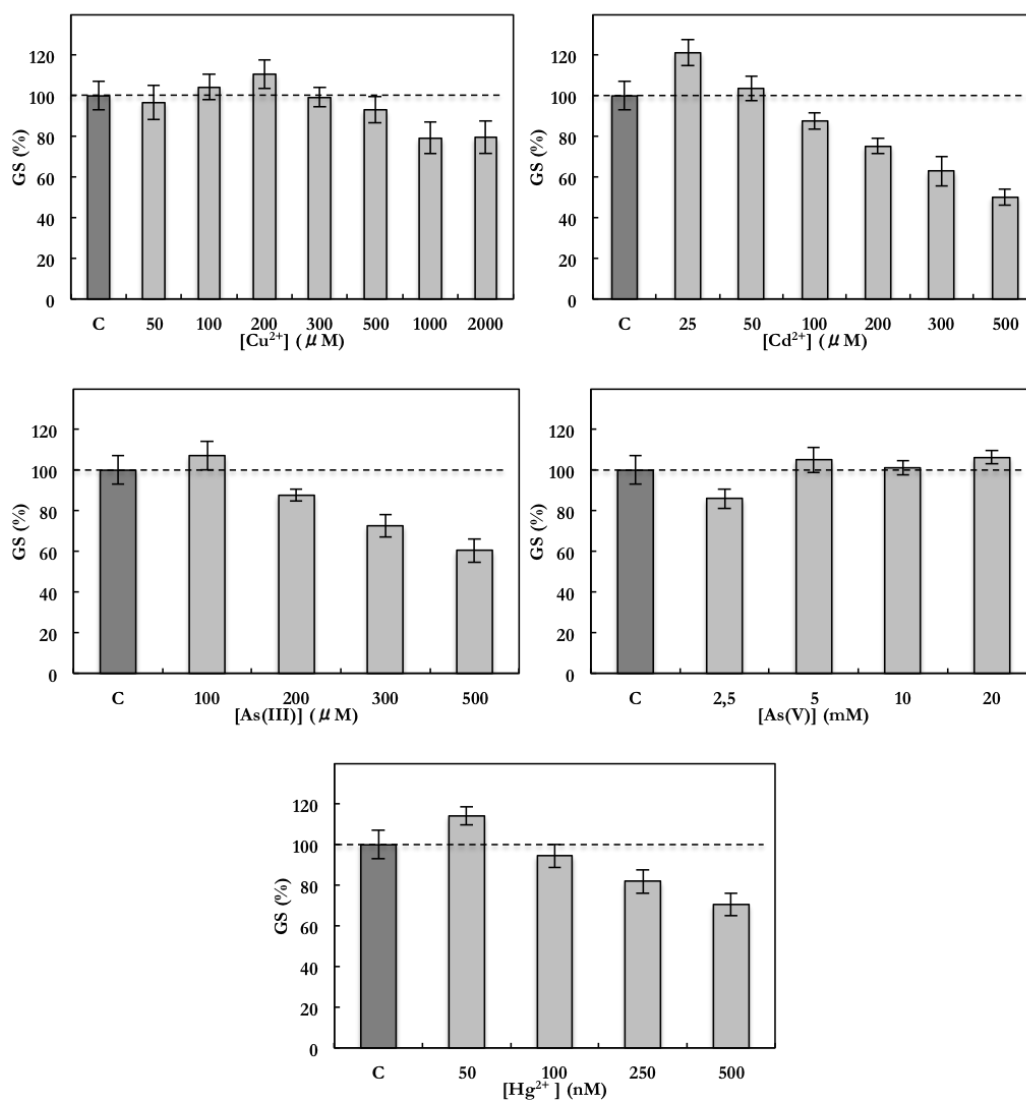


Figura 65. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GS en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO_3 , en ausencia (control) o presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) o As(V) , a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad GS en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. $1,52 \pm 0,15 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ corresponde al 100% de actividad GS.

El efecto del estrés metálico sobre la nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa se ha estudiado en varias especies de plantas. Así, la presencia de Cd^{2+} disminuye los niveles de actividad de la NR y de la NiR en tomate, judía y maíz (Chugh et al., 1992; Boussama et al., 1999; Chaffei et al., 2004; Mohammad, 2013), mientras que en guisante, la presencia del metal produce un mayor efecto inhibitorio sobre la NR que sobre la NiR (Gouia et al., 2000). En *C. reinhardtii* (Devriese et al., 2001) se ha observado como a una concentración de Cd^{2+} de 100 μM no causa un efecto significativo sobre la actividad NiR, si bien en el caso del tomate, se necesitan concentraciones de 50 mM para ver un efecto inhibitorio de la actividad NiR del 67% en los brotes, y del 32% en las raíces (Chaffei et al., 2004). En el caso del Cu^{2+} , la esponja vegetal *Luffa cylindrica* tuvo una inhibición de la actividad NiR de un 15,6% cuando estuvo en presencia del metal a una concentración de 25 μM , aumentando hasta un 49,2% a concentraciones de Cu^{2+} de 100 μM .

Por su parte, el ciclo GS-GOGAT también se ve afectado por el estrés metálico. Así, en hojas de maíz se ha indicado que la exposición a cantidades crecientes de Cd^{2+} , provoca una disminución de los niveles de actividad de ambas enzimas (Boussama et al., 1999). La disminución de la actividad GS por exposición a Cd^{2+} también se ha indicado en otras plantas superiores tales como el guisante (Chugh et al., 1992), arroz (Kumar y Dubey, 1999; Chien et al., 2002) y tomate (Chaffei et al., 2004); y en la microalga *C. reinhardtii* (Devriese et al., 2001). Esta inhibición producida en la GS puede ser debida a que un exceso del metal o metaloide puede provocar una inhibición general de la asimilación primaria del nitrógeno (Li et al., 2007a), o bien, en el caso del Cd^{2+} , sobre la base de una inhibición competitiva de la actividad GS por dicho metal (Devriese et al., 2001). Por el contrario, en la esponja vegetal *L. cylindrica* (Zhang et al., 2014), la exposición a Cu^{2+} incrementó la actividad GS en un 52,7% con respecto al control.

El As(V) fue la única especie que no produjo efecto significativo sobre la actividad NiR y GS de *C. onubensis* a las concentraciones estudiadas, siendo éstas superiores a la de las demás especies estudiadas. La diferencia de toxicidad observada entre el As(V) y el As(III) puede deberse a que estas especies se suministran a la microalga en sus correspondientes oxisales como arseniato y arsenito. Estas especies son absorbidas de distinta forma, así, como se ha indicado previamente, el arseniato lo toman las plantas a través de los transportadores específicos de fosfato, mientras que el arsenito lo hacen a través de acuagliceroporinas (Abedin et al., 2002; Rosen, 2002; Wang et al., 2002). De tal forma que la presencia de fosfato en el medio de cultivo de *C. onubensis* podría competir con el arseniato, dificultando su entrada, reduciendo su transporte y minimizando de esta forma su toxicidad.

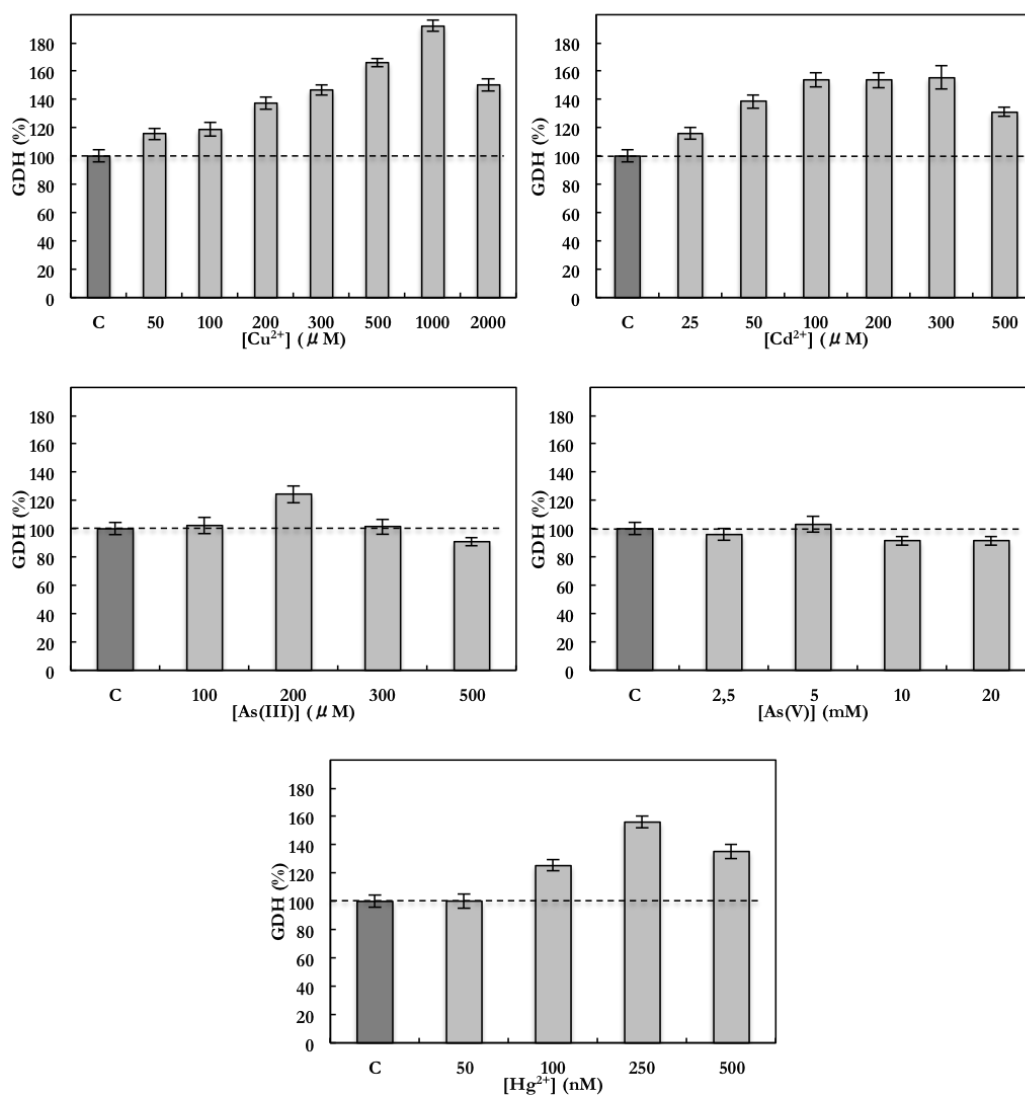


Figura 66. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GDH aminante en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO_3 , en ausencia (control) o presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) o As(V) , a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad GDH aminante en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El 100% corresponde a $13,59 \pm 1,44 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad GDH.

La Figura 66 muestra el efecto provocado sobre la actividad GDH aminante de *C. onubensis* cuando las células se sometieron a la presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) o As(V) . A diferencia de lo observado en el caso de la NiR y la GS, se apreció un aumento significativo de los niveles de actividad GDH de *C. onubensis* a medida

que fue aumentando la concentración de Hg^{2+} , Cu^{2+} o Cd^{2+} , en el medio de cultivo. Así, se obtuvo un incremento de la actividad de hasta el 90% en presencia de 1 mM de Cu^{2+} , y hasta el 60% con Cd^{2+} 300 μM o Hg^{2+} 250 nM, si bien se observó en los tres casos un descenso de la actividad a partir de estas concentraciones. Por su parte, el As(III) 200 μM provocó un aumento de la actividad GDH del 25%, mientras que el As(V) no afectó a la enzima.

El incremento de la actividad GDH aminante, por exposición a Cd^{2+} , también se ha indicado en otros organismos fotosintéticos. En tomate (Chaffei et al., 2004), frijol negro (Mobin, 2013) y en la hierba mora (Wang et al., 2008), la actividad GDH aumentó considerablemente cuando estuvieron en presencia de Cd^{2+} , llegando a alcanzar un 150%, con respecto al control, a una concentración del metal de 20 μM . Esto también ocurrió con la actividad GDH del maíz (Mocquot et al., 1996) cuando se puso en presencia de Cu^{2+} , la cual aumentó al aumentar la concentración del metal. Por otro lado, el As(III) también provocó un aumento en la actividad GDH de arroz a una concentración de 25 μM , si bien a concentraciones superiores de 50 μM , este efecto comenzó a ser inhibitorio (Jha y Dubey, 2004).

Como se ha indicado anteriormente, la NiR y la GS de *C. onubensis* se afectan negativamente por la presencia de metales pesados en el medio de cultivo celular, al igual que ocurre con otras enzimas de la asimilación fotosintética de nitrógeno (Devriese et al., 2001; Mohammad, 2013), por lo que el aporte de glutamato por esta vía se ve afectado en estas condiciones de estrés. El glutamato (junto con la cisteína) es esencial para la síntesis de fitoquelatinas, pequeños péptidos encargados de secuestrar los metales tóxicos y almacenarlos en las vacuolas (Mishra et al., 2006; Perales-Vela et al., 2006). La producción de fitoquelatinas se estimula por la presencia de metales pesados o de arsénico (Cobbet y Goldsbrough, 2002; Mobin, 2013), por lo que el requerimiento de glutamato (y cisteína) se incrementa en condiciones de estrés metálico. El hecho de que la actividad GDH de *C. onubensis* se active por la presencia de metales pesados garantizaría el aporte del glutamato que requieren las microalgas para la síntesis de las fitoquelatinas en estas condiciones de estrés. No obstante, su papel en la tolerancia puede variar entre las especies de organismos vegetales y el tipo de metal o metaloide (Ebbs et al., 2002; Schat et al., 2002), tal y como le ocurre a *C. onubensis* con el As(III). Una vez dentro de la vacuola, los ácidos orgánicos presentes (malato, citrato, oxalato) retienen a los iones metálicos y disocian el complejo (Salt y Rauser, 1995), donde posiblemente las fitoquelatinas pueden ser degradadas en la vacuola, o bien retornadas al citoplasma para formar nuevos complejos con los iones de los metales (Gadapati y Macfie, 2006). En maíz se ha observado que el incremento de la actividad aminante de la GDH, por exposición a Cd^{2+} , está acompañado por un incremento en la síntesis de γ -glutamilcisteína y glutatión (Boussama et al., 1999), precursores de las fitoquelatinas; mientras que en *C. reinhardtii*, la GDH incrementa su nivel de actividad en células expuestas a metales junto con las enzimas del complejo cisteína sintasa, implicadas en la síntesis de cisteína (Domínguez et al., 2003).

III. Resultados y Discusión
**Capítulo 3: Caracterización de enzimas del
sistema antioxidante y estrés abiótico
en *Coccomyxa onubensis***

3. Caracterización de enzimas del sistema antioxidante y estrés abiótico en *Coccomyxa onubensis*

La presencia de metales pesados provoca un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dietz et al., 1999). Este proceso está bien estudiado en plantas y parece ser una de las respuestas más rápidas derivadas del estrés metálico (Opdenakker et al., 2012). Las ROS producen reacciones de oxidación indeseadas provocando daños en lípidos (Moran et al., 1994; Munné-Bosch y Alegre, 2002), proteínas (Berlett y Stadtman, 1997), ácidos nucleicos (Sies, 1993), carbohidratos, ADN y otras macromoléculas (Hariyadi y Parkin, 1993; O’Kane et al., 1996). Los organismos han desarrollado eficientes sistemas antioxidantes contra las ROS, que les permite minimizar el daño oxidativo que provocan dichas especies (Slater, 1984; Halliwell, 1999). De todas las especies reactivas de oxígeno, el H₂O₂ desempeña el papel más importante en la señalización de los cambios estresantes debido a su elevada estabilidad y largo tiempo de vida media (Hung et al., 2005).

En este sentido, se ha decidido estudiar tres enzimas que, de forma directa o indirecta, están implicadas en la eliminación de H₂O₂: la catalasa (CAT), enzima que participa en la eliminación directa del peróxido de hidrógeno (Arora et al., 2002); y la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR), debido a la importancia que ambas enzimas poseen en el ciclo ascorbato-glutatión (Figura 5, del apartado 2.2 de la Introducción), el cual es considerado como el principal sistema de defensa para la efectiva desactivación de las ROS en general y del H₂O₂ en particular (Gill y Tuteja, 2010).

En el presente capítulo se presenta, en primer lugar, la caracterización cinética de las actividades desarrolladas por la CAT, GR y APX, de la microalga *C. onubensis* y, posteriormente, se muestra un estudio del efecto que producen sobre los niveles de actividad de dichas enzimas, distintas especies metálicas cuando están presentes en el medio de cultivo celular de la microalga.

3.1. Caracterización de la actividad catalasa de *C. onubensis*

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno actuando sin necesidad de aporte de cofactores que ayuden al proceso, en base a la siguiente reacción:



La caracterización del ensayo de actividad de la CAT de *C. onubensis* se muestra en la Tabla 18. Obviamente, la ausencia del único sustrato que posee la enzima se utilizó para realizar los correspondientes controles de actividad, observándose como la eliminación del tampón Tris-HCl (pH 12) provocó una disminución de la actividad

del 70%, lo que implica que la reacción catalizada necesita de un tampón a pH básico para que pueda realizarse, como se demostrará posteriormente. La desnaturalización de la enzima, realizada cuando el extracto crudo se sometió a un calentamiento de 100 °C durante 2 minutos, demostró la naturaleza biológica del proceso estudiado.

Tabla 18. Caracterización de las actividades CAT en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*.

Condiciones	CAT (U·mg ⁻¹)	CAT (%)
Completo	8350,54	100
menos H ₂ O ₂	0	0
menos tampón Tris-HCl, pH 12	130,23	1,6
menos EC; más EC a 100 °C	0	0

El ensayo completo contenía en 525 µl de volumen final: 10,5 µmol de H₂O₂ preparado en tampón Tris-HCl 52,5 mM, pH 12; y 25 µl de extracto crudo (EC). Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad CAT. Más detalles sobre el ensayo de actividad en Materiales y Métodos.

3.1.1. Propiedades cinéticas de la actividad catalasa

Parámetros cinéticos

La Figura 67 muestra los resultados obtenidos sobre la actividad CAT de *C. onubensis* cuando se utilizaron concentraciones variables de H₂O₂ en la mezcla de reacción. En ella puede observarse como la CAT presentó una cinética clásica de Michaelis-Menten. Además, es importante señalar que a partir de concentraciones de H₂O₂ superiores a 50 mM, se aprecia una curvatura descendente indicativa de una inhibición por sustrato.

Para determinar el valor de Km se realizó la representación de dobles inversos para el H₂O₂ tal y como se muestra en la Figura 68, obteniéndose un valor de Km de 17,1 mM.

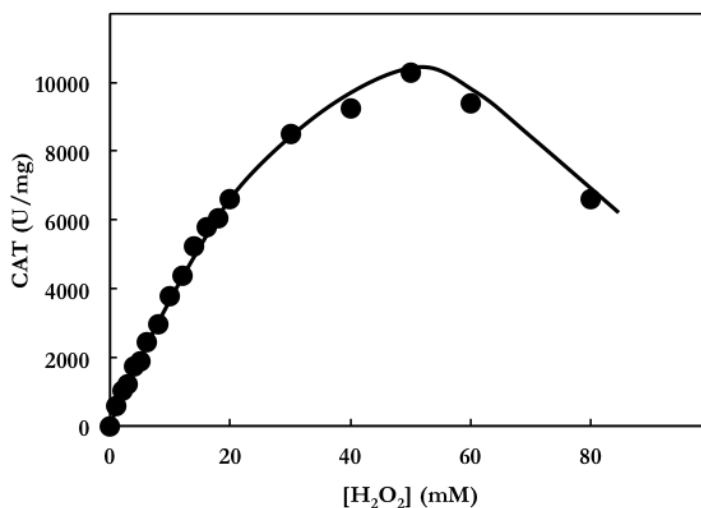


Figura 67. Representación de Michaelis-Menten de la actividad CAT de *C. onubensis* en función de la concentración de H₂O₂. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de H₂O₂ en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

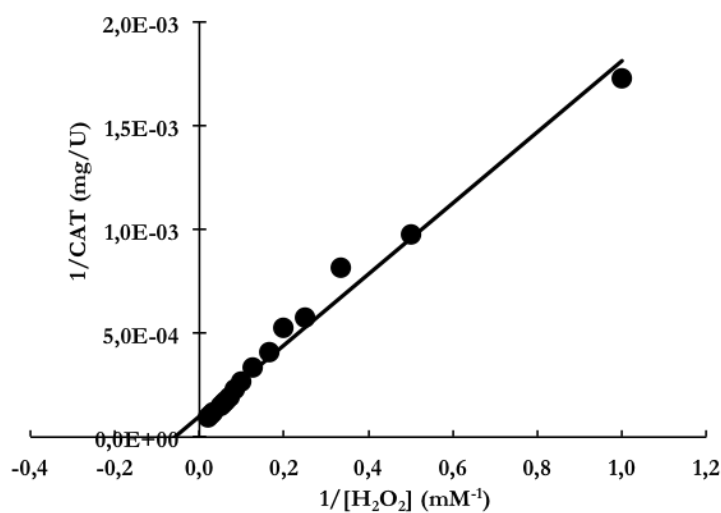


Figura 68. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de Km para H₂O₂ de la actividad CAT de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de H₂O₂, de los valores representados en la Figura 67.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad CAT, en el intervalo de 3 a 12,5, queda reflejado en la Figura 69. En ella se aprecia como la actividad alcanza un valor máximo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 12,5. Entre los valores de pH 10,5 y 12,5, la actividad enzimática se mantuvo superior al 80% del valor máximo, para decaer a valores inferiores de pH 10,5, obteniéndose los valores mínimos en el rango de pH entre 3 y 6.

Es importante destacar como, para los mismos valores de pH, cuando se utilizó Tris-HCl en lugar del fosfato potásico en el rango de pH de 7,5 y 8, se produjo un efecto inhibitor de la actividad CAT en Tris-HCl aproximadamente del 25%.

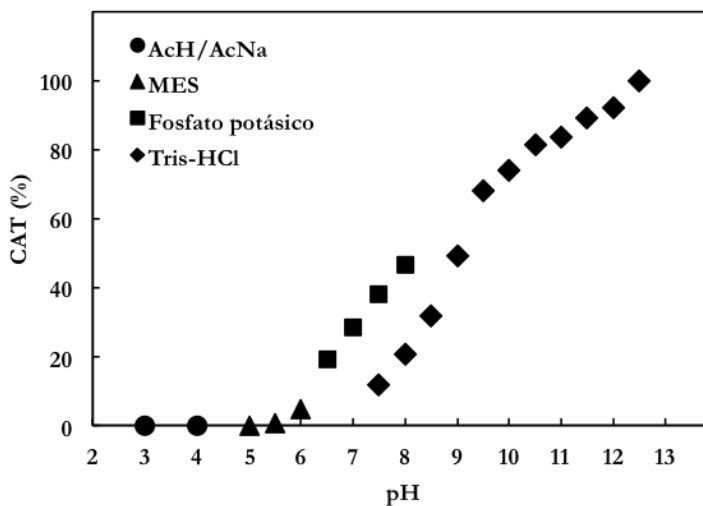


Figura 69. Determinación del pH óptimo de la actividad CAT de *C. onubensis*.

Los tampones, utilizados a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción, fueron: AcH/AcNa, pH 3 y 4; MES, pH 5, 5,5 y 6; fosfato potásico, pH 6,5, 7, 7,5 y 8; Tris-HCl, pH 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12 y 12,5. El 100% corresponde a 9354,10 U·mg⁻¹ de actividad CAT. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 70 muestra la dependencia de la actividad CAT con la temperatura en el intervalo comprendido entre 10 y 90 °C. La actividad máxima se alcanzó a una temperatura de 60 °C, manteniéndose por encima del 85% cuando se midió entre 50 y 70 °C. Valores inferiores o superiores a este intervalo provocaron una pérdida de actividad, así, fuera del rango entre 40 y 80 °C, la actividad disminuyó sobre un 50%.

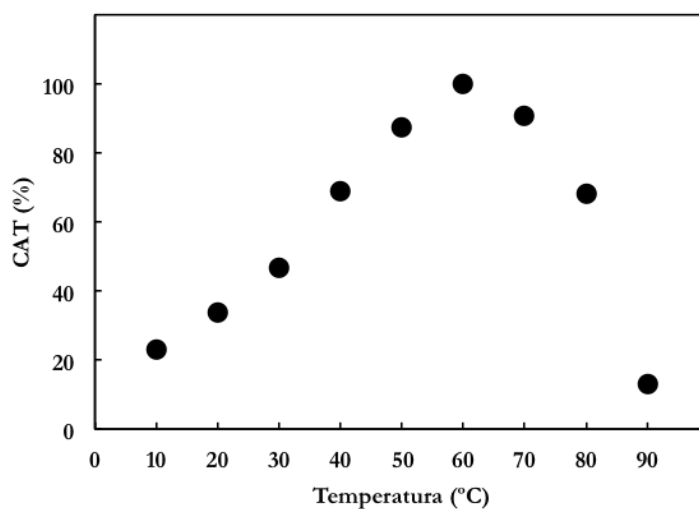


Figura 70. Determinación de la temperatura óptima de la actividad CAT de *C. onubensis*. La actividad CAT se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 9984,59 U·mg⁻¹ de actividad CAT.

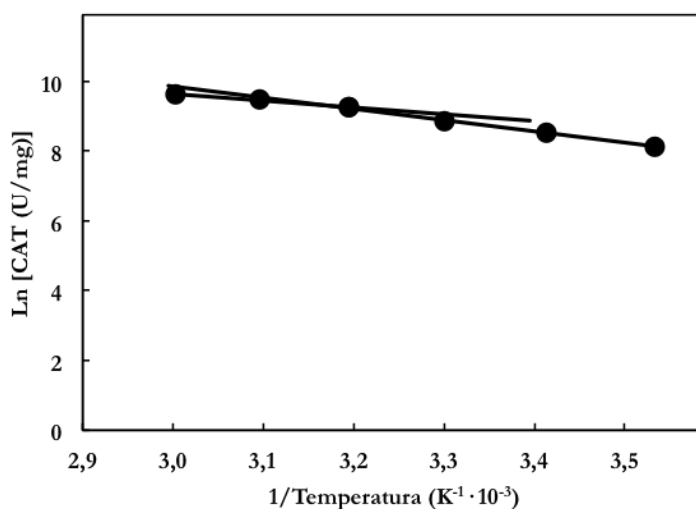


Figura 71. Determinación de la energía de activación de la actividad CAT de *C. onubensis*. Representación de Arrhenius a partir del logaritmo neperiano de la actividad CAT frente a 1/Temperatura, de los valores obtenidos en la Figura 70.

A partir de los valores de actividad obtenidos en la zona ascendente de la curva, se obtuvo la representación de Arrhenius mostrada en la Figura 71. Así, en el intervalo comprendido entre 10 y 60 °C, se calcularon dos valores de energía de activación, uno de 26,8 kJ·mol⁻¹ entre 10 y 40 °C, y otro de 16,1 kJ·mol⁻¹ entre 40 y

60 °C, para la reacción catalizada por la CAT de la microalga *C. onubensis*. Los resultados son acordes con la existencia de dos etapas enzimáticas, como previamente se ha descrito para la actividad CAT (Mallick y Mohn, 2000), así, en primer lugar, el hierro hemínico interactúa con H₂O₂ para formar un intermediario peróxido del tipo CAT-Fe-OOH que, a su vez, en una segunda etapa, interacciona con otra molécula de H₂O₂ produciendo agua y oxígeno.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la CAT de la microalga *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. La Figura 72 muestra la dependencia de la actividad CAT a diferentes temperaturas en un intervalo de tiempo entre 0 y 300 minutos. En ella se aprecia como a las temperaturas de 50 y 60 °C, se produjo una caída drástica de la actividad en el intervalo de tiempo de 75 minutos, perdiendo toda la actividad a tiempos mayores a la temperatura de 60 °C, y manteniendo un 20% de actividad CAT a 50 °C. A la temperatura de 40 °C se aprecia como la actividad permaneció por encima del 75% durante todo el tiempo que duró el ensayo. Por último, a las temperaturas de -20, 4 y 24 °C (T^a ambiente), la actividad se mantuvo al 100% durante todo el intervalo de tiempo que duró el ensayo.

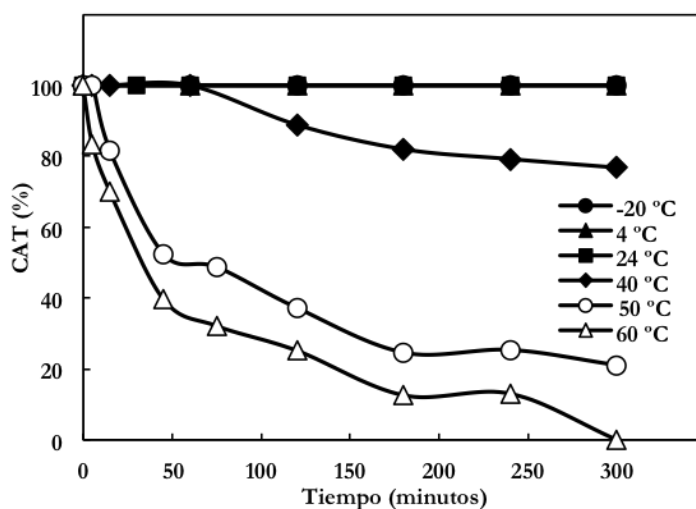


Figura 72. Estabilidad térmica de la actividad CAT de *C. onubensis*. La actividad CAT se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 8750,37 U·mg⁻¹ de actividad CAT.

Según la caracterización físico-química realizada para la actividad CAT de la microalga *C. onubensis*, se ha obtenido un valor de K_m para H₂O₂ de 17,1 mM. El

proceso catalítico requiere un pH óptimo de 12,5 en tampón Tris-HCl 50 mM, una temperatura óptima de 60 °C y dos energías de activación de 26,8 y 16,1 kJ·mol⁻¹, respectivamente.

La Tabla 19 muestra una comparación de estos datos con los de otras CAT de origen fotosintético. Aunque existen pocos datos a nivel de microalgas en comparación con los de plantas, se aprecia que los valores mostrados difieren de uno a otros organismos. La actividad CAT de *C. onubensis* presentó el valor más alto de temperatura y pH óptimo. En cuanto a los valores de Km para H₂O₂, también se aprecian diferencias. La enzima de *C. onubensis* obtuvo un valor de Km bastante similar al frijol negro y al de la tercera isoforma de la col, mostrando más afinidad por el H₂O₂ que, por ejemplo, la CAT de la acelga y la espinaca; de hecho, está indicada la baja afinidad por el sustrato que presentan, en general, las catalasas (Arora et al., 2002).

Tabla 19. Parámetros cinéticos de las CAT de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	Km	T ^a	pH
	H ₂ O ₂ mM	°C	Óptimo
<i>Coccomyxa onubensis</i>	17,1	60	12,5
Frijol negro	16,2	40	7,0
Acelga	50,0	30	6,0-8,0
Col			
CAT1	1,0	nd	4,5
CAT2	0,6	nd	6,5
CAT3	13,4	nd	10,0
Espinaca	47,0	nd	8,2

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; frijol negro, Kandukuri et al. (2012); acelga, Dinçer y Aydemir (2001); col, Tayefi-Nasrabadi (2008); espinaca, Sheptovitsky y Brudvig (1996). nd indica no determinado.

Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad CAT

La Tabla 20 recoge un estudio del efecto que producen distintas especies químicas, tales como cationes monovalentes y divalentes, reactivos de grupos sulfhidrilos, o agentes quelantes de metales, a diferentes concentraciones, sobre la actividad CAT de *C. onubensis*. Como se puede apreciar, tanto la azida (NaN₃) como el cianuro (KCN), inhibidores de enzimas que poseen hierro-hemínico, inhibieron claramente la actividad, sobre un 98%, a una concentración de 1 mM en la mezcla de reacción. Esta inhibición se mantuvo cuando la concentración se aumentó 5 veces. Los resultados son consecuentes con la naturaleza hemínica de la CAT de *C. onubensis* en particular y de las catalasas en general (Mallick y Mohn, 2000). De hecho, estos datos son coincidentes con los publicados para otros organismos, como es el caso del

frijol negro (Kanduruki et al., 2012), la acelga (Dinçer y Aydemir, 2001) y la patata (Beaumont et al., 1990), donde estos dos compuestos inhiben casi por completo la actividad CAT a concentraciones muy pequeñas.

El DTT (ditiotreitolo), reactivo de grupos sulfhidrilos, produjo una inhibición del 15% de la actividad a una concentración de 1 mM, inhibiéndose la actividad un 25 y 28% cuando se aumentó la concentración a 5 y 10 mM, respectivamente. Estos datos son contrarios a los observados en la acelga (Dinçer y Aydemir, 2001) o en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Shao et al., 2008), donde el DTT provoca una fuerte inhibición a esa concentración, indicando que los grupos sulfhidrilos, por algún motivo, se encuentran más protegidos en *C. onubensis*.

Los cationes Na^+ y K^+ 1 mM apenas produjeron efecto alguno sobre los niveles de actividad CAT. En cualquier caso, cabe destacar una ligera inhibición de la actividad de un 20%, en ambos casos, a una concentración de 10 mM. Un efecto similar se observó en el caso del Mg^{2+} . Por su parte, el Mn^{2+} produjo una inhibición del 20% de la actividad a una concentración de 1 mM, siendo destacable la pérdida total de la actividad cuando la concentración se aumentó a 5 mM.

Tabla 20. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad CAT de *C. onubensis*.

Agente	CAT (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Ninguno (control)	100	100	100
Na^+	94,5	85,6	78,8
K^+	94,6	80,4	79,2
Mg^{2+}	91,9	78,1	70,1
Mn^{2+}	80,7	0	
DTT	86,5	75,1	72,0
KCN	2,3	2,0	
NaN_3	1,9	1,1	

Se determinó la actividad CAT según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a $8633,94 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad CAT.

Debido a la fuerte inhibición que presenta la enzima en presencia de Mn^{2+} , se procedió a realizar un estudio más detallado sobre la variación de la curva de Michaelis-Menten para H_2O_2 , utilizando concentraciones variables del sustrato en ausencia y presencia del Mn^{2+} , a una concentración de 1 y 2,5 mM. La Figura 73 y Figura 74 muestran el estudio correspondiente.

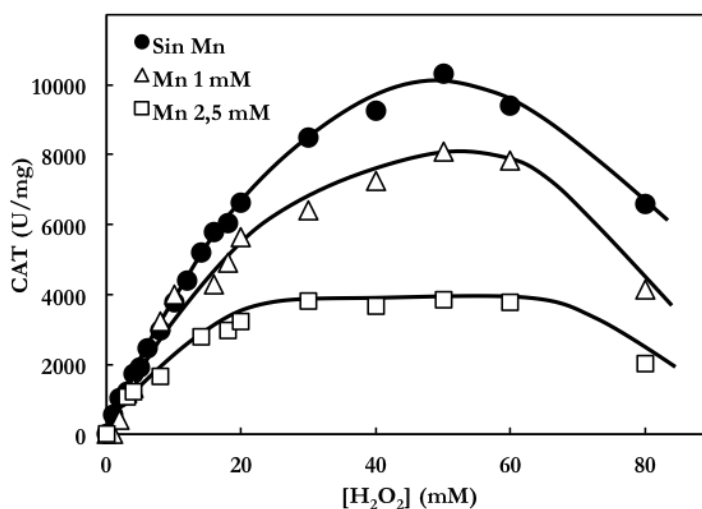


Figura 73. Efecto del Mn²⁺ sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad CAT de *C. onubensis* respecto a H₂O₂. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de H₂O₂ en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura, y en las concentraciones fijas del Mn²⁺ (1 y 2,5 mM).

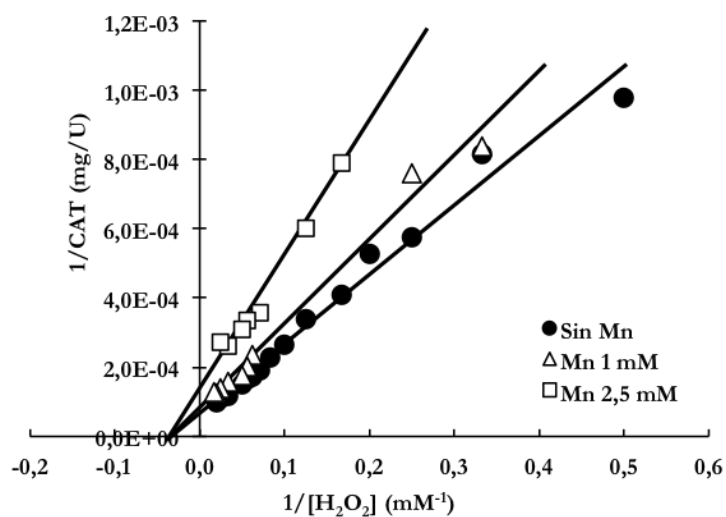


Figura 74. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del tipo de inhibición del Mn²⁺ sobre la actividad CAT de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de H₂O₂, de los valores representados en la Figura 73.

Como muestra la Figura 73 la disminución de la velocidad máxima es clara a medida que aumenta la concentración del inhibidor (Mn^{2+}). La correspondiente representación de Lineweaver-Burk (Figura 74) permite corroborar este hecho y, además, muestra cómo el valor de la K_m permanece constante, siendo de 17,7 mM en ausencia de Mn^{2+} , y 19,5 y 17,1 mM en presencia del Mn^{2+} 1 y 2,5 mM, respectivamente, ya que las líneas observadas en ausencia y presencia del inhibidor cortan en el mismo punto al eje de abscisas, confirmando que la inhibición producida por el Mn^{2+} sobre la CAT de *C. onubensis* es de tipo no-competitiva, donde el inhibidor se une a la enzima en un sitio diferente al dominio de interacción con su sustrato, el H_2O_2 .

La CAT tienen un ion metálico hemínico en el sitio activo (Patel et al., 2016), por lo que la adición de otros iones metálicos a la enzima podría afectar a la estabilidad de la estructura o afectar al estado redox del metal en el sitio activo, lo que conduciría a un cambio en la actividad (Medyantseva et al., 1998). Aunque la mayoría de los cationes estudiados (Tabla 20) no provocaron un efecto significativo sobre la actividad CAT de *C. onubensis*, el Mn^{2+} mostró el mayor efecto inhibitorio, como también se ha indicado en acelgas (Dinçer y Aydemir, 2001), presentando una inhibición de tipo no-competitiva, sin afectar al dominio de interacción del H_2O_2 , aunque podría desplazar al Fe^{2+} necesario para que la enzima desarrolle su función catalítica.

Ensayo de actividad en gel

Como muestra la Tabla 19, se ha descrito la presencia de varias isoenzimas con actividad CAT. Así, aunque la enzima es especialmente abundante en los peroxisomas para eliminar el H_2O_2 producido durante la fotorrespiración (Feierabend, 2005; Engel et al., 2006; Vuleta et al., 2010), también se han localizado isoformas en el citosol y en las mitocondrias, aunque su presencia no ha podido ser constatada en los cloroplastos (Perl-Treves y Perl, 2002). En microalgas, los datos son mucho más escasos, habiéndose detectado en *C. reinhardtii* dos isoformas de localización mitocondrial (Kato et al., 1997). En este sentido, la Figura 75 muestra un ensayo de actividad CAT, en geles de poliacrilamida y en condiciones nativas, de extractos crudos de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*.

Como se aprecia en la figura, para el caso de *C. reinhardtii* (calles 3 y 4) solo se obtuvo una banda con actividad CAT a la altura de la de *C. onubensis* (calles 1 y 2). Esta única banda de actividad para *C. reinhardtii* ha sido reportada por Kato et al. (1997), afirmando la existencia de dos isoformas idénticas con un peso molecular de 120 kDa cada una. Curiosamente, en los extractos crudos de la microalga *C. onubensis* aparecen dos bandas con actividad CAT, aunque una de ellas, la de mayor peso molecular (122 kDa), se mostró mucho más activa; y otra de menor peso molecular (94 kDa), indicando la posible existencia de dos isoformas de la CAT, o bien que exista algún proceso proteolítico que afecte a la de mayor peso molecular, aunque no

puede descartarse tampoco la presencia de dos isoenzimas con igual peso molecular, como ocurre en el caso de *C. reinhardtii*.

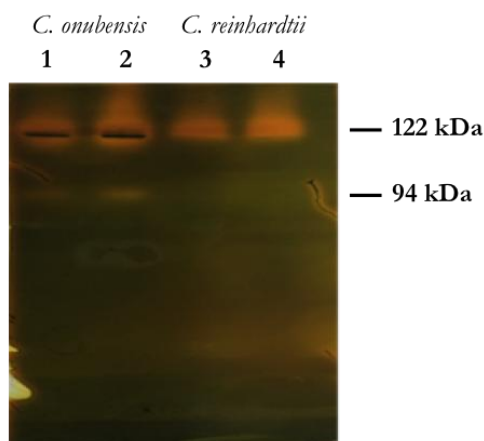


Figura 75. Ensayo de actividad CAT en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*. Calles 1 y 2, actividad CAT en extractos crudos de *C. onubensis* (27,7 µg); calles 3 y 4, actividad CAT en extractos crudos de *C. reinhardtii* (15,6 µg). La actividad CAT en gel se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

3.2. Caracterización de la actividad glutatión reductasa de *C. onubensis*

Como se ha indicado anteriormente, la glutatión reductasa (GR) participa en el ciclo ascorbato-glutatión aportando el glutatión reducido que requiere el ciclo para la eliminación de H₂O₂, vía ascorbato peroxidasa (Gill y Tuteja, 2010). La enzima contribuye de manera activa al mantenimiento de una elevada relación intracelular de glutatión reducido/oxidado, [GSH]/[GSSG], esencial para el perfecto control de las ROS en condiciones de estrés oxidativo (Couto et al., 2016). La GR requiere de NADPH para catalizar la conversión entre las dos especies, según la reacción:



La caracterización del ensayo de actividad GR de *C. onubensis* se muestra en la Tabla 21. La actividad se mostró absolutamente dependiente de la presencia de GSSG en la mezcla de reacción con respecto al ensayo completo. No se realizó ensayo en ausencia de NADPH, pues la actividad de la enzima se mide precisamente en función de la desaparición de este sustrato; no obstante, tampoco se obtuvo actividad cuando se reemplazando el NADPH por NADH, por lo que se concluye que la GR es absolutamente dependiente de NADPH como donador de electrones, como también ocurre en otras microalgas tales como *Anabaena* sp. Strain 7119 (Serrano et al., 1984), *Spirulina maxima* (Rendón et al., 1986) y *C. reinhardtii* (Takeda et

al., 1993). En ciertos organismos, como *Englena gracilis* z (Shigeoka et al., 1987), *Anabaena* PCC 7120 (Jiang y Mannervik, 1999), o el guisante (Bielawski y Joy, 1986), el NADH puede actuar también como donador de electrones.

Por otro lado, también se observó que, al no añadir el tampón Tris-HCl (pH 7,5), la actividad disminuyó un 15%. Esto es debido a que el pH del tampón Tris-HCl estaba próximo al del agua, por lo que su pérdida de actividad se ve muy poco afectada. La eliminación del EDTA provocó una disminución del 17% de la actividad. Este reactivo se utiliza normalmente para proteger cofactores metálicos de las enzimas, por lo que esta leve disminución de actividad puede deberse a la protección parcial que ejercería el EDTA. Por último, a efecto de desnaturalizar las enzimas, se mostró la naturaleza biológica de la reacción estudiada.

Tabla 21. Caracterización de las actividades GR en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*.

Condiciones	GR (U·mg ⁻¹)	GR (%)
NADPH-GR (completo)	17,37	100
menos tampón Tris-HCl, pH 7,5	14,82	85,3
menos EDTA	14,50	83,5
menos GSSG	0	0
menos EC; más EC a 100 °C	0	0
NADH-GR	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 25 μ mol de tampón Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 μ mol de EDTA; 0,25 μ mol de NADPH; 1 μ mol de GSSG; y 100 μ l de extracto crudo (EC). Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada; o bien sustituyendo el NADPH por NADH a igual concentración. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad GR. Más detalles sobre el ensayo de actividad en Materiales y Métodos.

3.2.1. Propiedades cinéticas de la actividad glutatión reductasa

Parámetros cinéticos

La Figura 76 muestra la variación de la actividad GR cuando se utilizaron concentraciones crecientes de GSSG (Figura 76A) y de NADPH (Figura 76B) en la mezcla de reacción. En ella puede observarse como para los dos sustratos, la actividad GR presentó una cinética clásica de Michaelis-Menten.

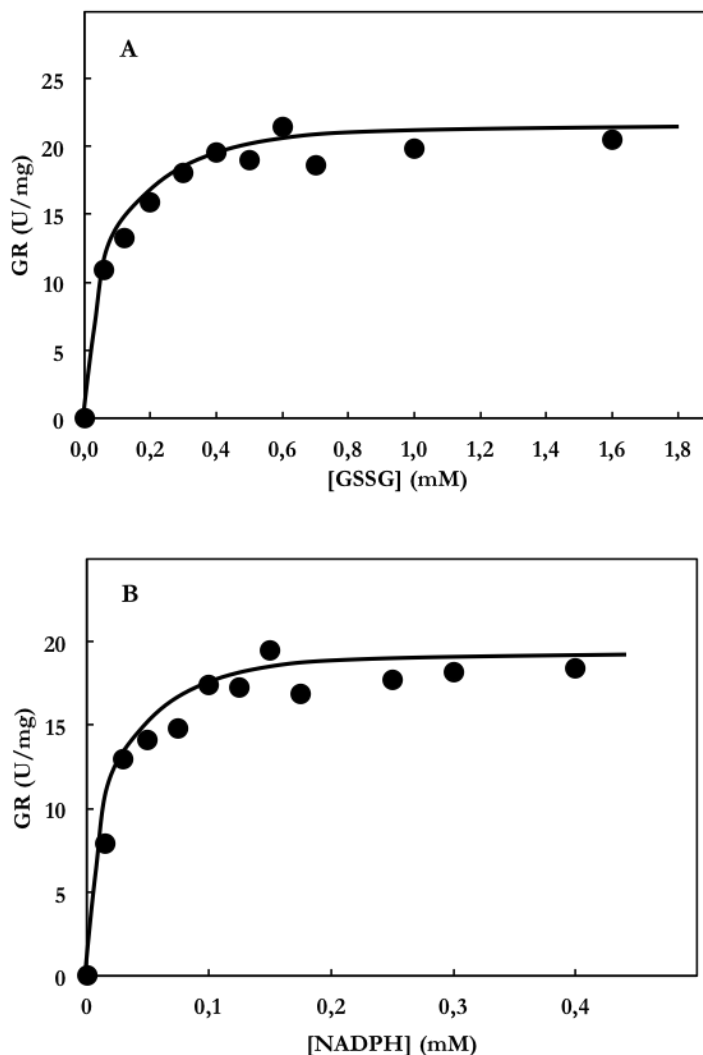


Figura 76. Representación de Michaelis-Menten de la actividad GR de *C. onubensis* en función de la concentración de GSSG (A), o NADPH (B). La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de GSSG y NADPH en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

Para determinar los valores de K_m , se realizó la representación de dobles inversos en ambos casos. La Figura 77A muestra los resultados obtenidos para el GSSG, obteniéndose un valor de K_m aparente para la actividad GR de *C. onubensis* de $59,7 \mu\text{M}$. Cuando se realizó el estudio para el caso del NADPH (Figura 77B), se obtuvo un valor aparente de K_m de $22,2 \mu\text{M}$.

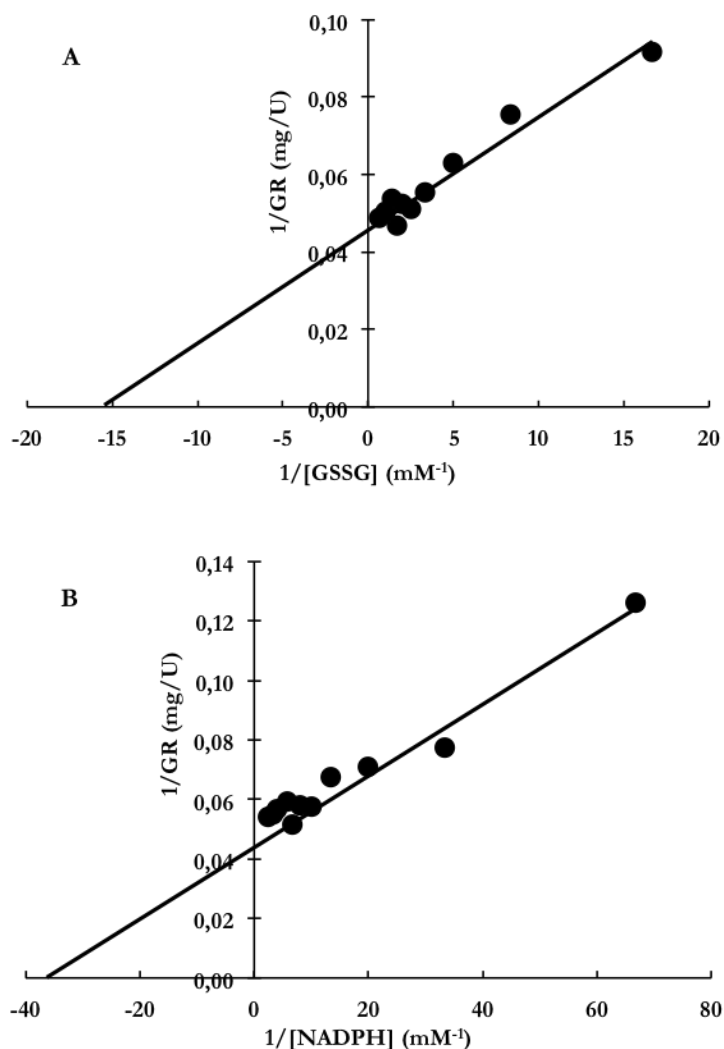


Figura 77. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para GSSG (A), o NADPH (B), de la actividad GR de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de GSSG y NADPH, de los valores representados en la Figura 76.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad GR, en el intervalo comprendido entre 3 y 9, se muestra en la Figura 78. En ella se aprecia como la actividad se hace máxima en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Entre los valores de pH 7 y 8, la actividad enzimática se mantuvo superior al 65% respecto al valor máximo, para decaer drásticamente a valores inferiores y superiores de ambos pH, obteniéndose los valores mínimos a pH entre 3 y 4,5. Es importante destacar como, para los mismos

valores de pH (entre 7 y 9), cuando se utilizó fosfato potásico en lugar del Tris-HCl, se produjo una notable disminución de la actividad GR.

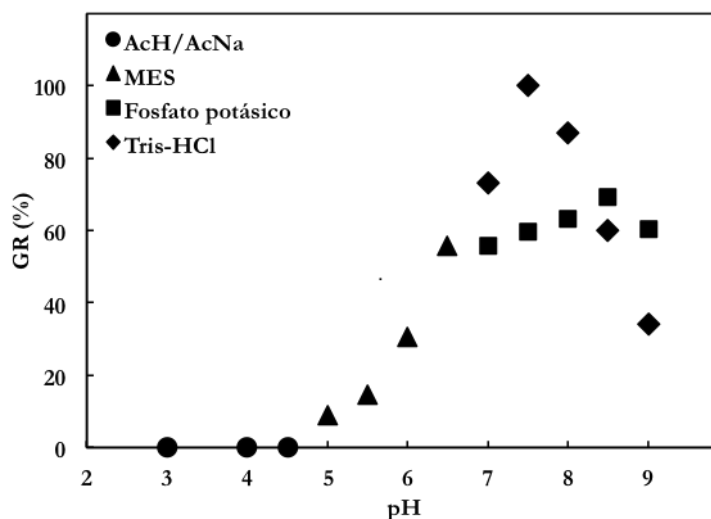


Figura 78. Determinación del pH óptimo de la actividad GR de *C. onubensis*.

Los tampones, utilizados a una concentración de 25 mM en la mezcla de reacción, fueron: AcH/AcNa, pH 3, 4 y 4,5; MES, pH 5, 5,5, 6 y 6,5; fosfato potásico, pH 7, 7,5, 8, 8,5 y 9; Tris-HCl, pH 7, 7,5, 8, 8,5 y 9. El 100% corresponde a 17,79 U·mg⁻¹ de actividad GR. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 79 muestra la dependencia de la actividad GR con la temperatura en el intervalo comprendido entre 20 y 66 °C. La actividad máxima se alcanzó a una temperatura de 60 °C, manteniéndose por encima del 75% cuando se midió entre 50 y 66 °C. Por otra parte, la Figura 80 muestra la representación de Arrhenius de las velocidades a cada temperatura. Los valores comprendidos entre 20 y 60 °C se disponen linealmente distinguiéndose dos pendientes con una energía de activación de 35,2 kJ·mol⁻¹ entre 20 y 40 °C, y de 13,8 kJ·mol⁻¹ entre 40 y 60 °C, característico de un proceso catalizado en dos etapas. Estos datos concuerdan con los estudios realizados por Gill y colaboradores (Gill et al., 2013) para la reacción catalizada por la GR, donde, en primer lugar, el cofactor FAD se reduce mediante NADPH, tras lo cual se vuelve a oxidar reduciendo un puente disulfuro, produciendo un anión tiolato (RS⁻) en una cisteína para, a continuación, producirse la reducción del GSSG.

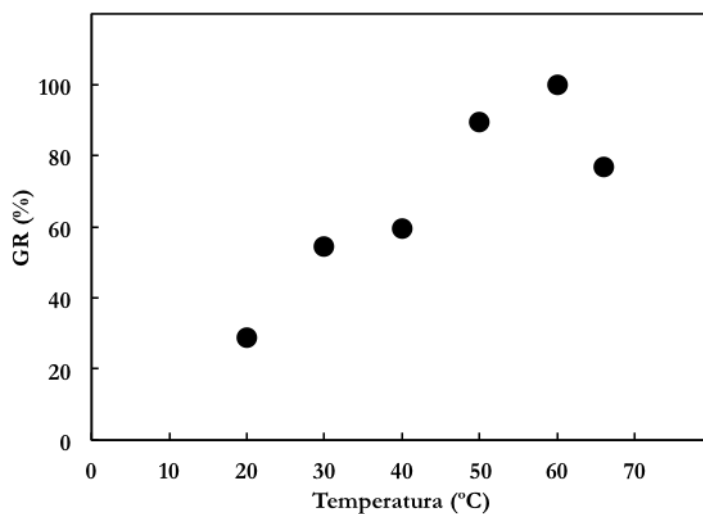


Figura 79. Determinación de la temperatura óptima de la actividad GR de *C. onubensis*. La actividad GR se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a $17,80 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad GR.

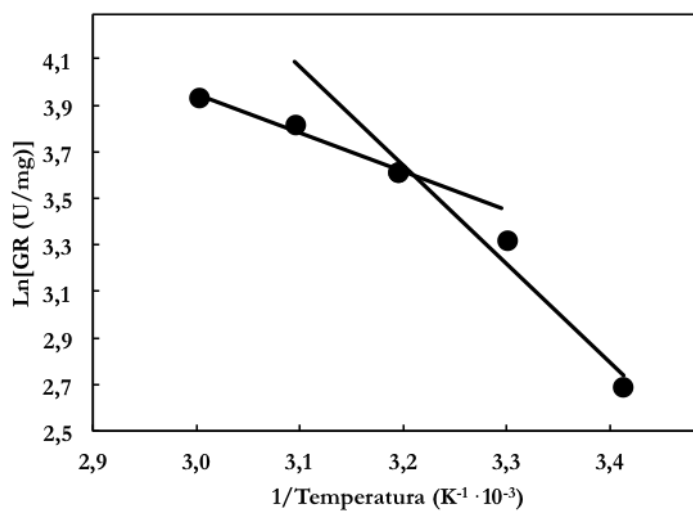


Figura 80. Determinación de la energía de activación de la actividad GR de *C. onubensis*. Representación de Arrhenius del logaritmo neperiano de la actividad GR frente a $1/\text{Temperatura}$, de los valores obtenidos en la Figura 79.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la GR de la microalga *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. La Figura 81 muestra la dependencia de la actividad GR a diferentes temperaturas en un intervalo de tiempo entre 0 y 240 horas (10 días). En la figura se aprecia como a la temperatura de -20 °C la estabilidad es máxima, perdiendo solo un 10% de actividad durante todo el tiempo que duró el ensayo. Por otro lado, a 4 °C, la actividad disminuyó un 50% después de 120 horas (5 días) de incubación. A las temperaturas de 18 y 30 °C, la actividad se mantuvo por encima de un 60% en un intervalo de tiempo de 24 horas, produciéndose una caída drástica de actividad del 75% a tiempos de incubación superiores. Por último, a la temperatura de 60 °C, la actividad se mantuvo por encima del 40% en un intervalo de tiempo de 8 horas, indicando con ello una gran estabilidad de la enzima GR.

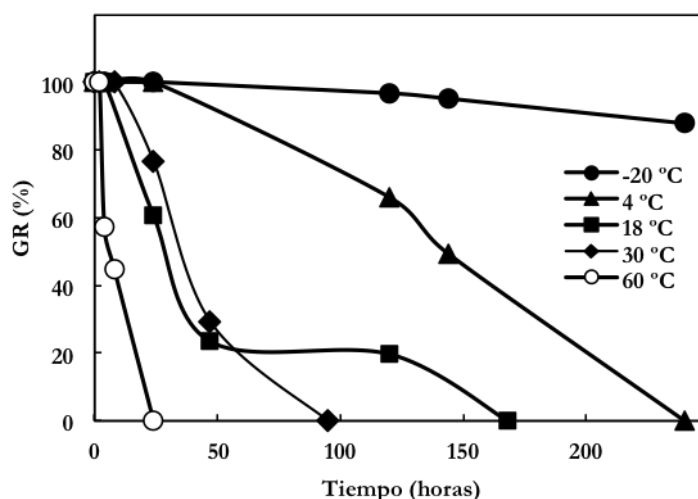


Figura 81. Estabilidad térmica de la actividad GR de *C. onubensis*. La actividad GR se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 17,85 U·mg⁻¹ de actividad GR.

Según la caracterización físico-química realizada para la actividad GR de la microalga *C. onubensis*, se han obtenido valores de K_m para GSSG y NADPH de 59,7 y 22,2 μM , respectivamente. El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 7,5 en tampón Tris-HCl 25 mM, una temperatura óptima de 60 °C y dos energías de activación de 35,2 y 13,8 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

La Tabla 22 muestra una comparación de estos datos con los de otras GR de origen fotosintético. Como se puede apreciar, el rango de pH óptimo para los organismos señalados está entre 7 y 9, siendo el rango más usual para la mayoría,

incluida *C. onubensis*, entre 7,5 y 8,2. Por otro lado, a pesar de que no hay muchos datos respecto a la temperatura óptima del proceso, la obtenida para la actividad GR de *C. onubensis* fue superior a la repostada para *C. reinhardtii*.

En cuanto a los valores de Km para el sustrato GSSG, hay que destacar que prácticamente todos los valores de GR de las microalgas señaladas, además de la de *C. onubensis*, son similares entre sí; no obstante, las cianobacterias *Anabaena* sp. Strain 7119 y *S. maxima*, además de la espinaca, son los organismos que tienen unos valores de Km mayores. Por otro lado, en cuanto al NADPH, se aprecian mayores diferencias en cuanto a la afinidad de la GR por este sustrato, siendo el valor de Km para la GR de *C. onubensis* similar al publicado para la GR2 de *C. reinhardtii* y al de la GR de *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L.

Tabla 22. Parámetros cinéticos de las GR de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	Km		T ^a Óptimo °C	pH Óptimo
	GSSG	NADPH		
	μM			
<i>Coccomyxa onubensis</i>	59,7	22,2	60	7,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	54,1	10,6	49	8,2
GR1	53,0	7,0	nd	7,5
GR2	58,0	28,0	nd	8,5
<i>Chlamydomonas</i> sp. Strain ICE-L	66,0	22,3	nd	7,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	60,0	14,0	nd	8,0
<i>Euglena gracilis</i> z	55,0	14,0	nd	8,2
<i>Anabaena</i> sp. Strain 7119	210,0	9,4	nd	9,0
<i>Spirulina maxima</i>	121,0	3,3	nd	7,0
Espinaca	110,0	11,0	nd	8,1
Guisante	28,0	2,7	nd	8,0
Trigo	10,5	3,9	nd	7,5
Arroz	34,0	13,0	nd	7,9

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *C. reinhardtii*, Takeda et al. (1993), Serrano y Llobell (1993); *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L, Ding et al. (2007); *P. tricornutum*, Arias et al. (2010); *E. gracilis* z, Shigeoka et al. (1987); *Anabaena* sp. Strain 7119, Serrano et al. (1984); *S. maxima*, Rendón et al. (1986); espinaca, Wirth y Latzko (1978); guisante, Bielawski y Joy (1986); trigo, Lamotte et al. (2000); arroz, Ida y Morita (1971). nd indica no determinado.

Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad GR

La Tabla 23 recoge un estudio del efecto que producen distintos compuestos, tales como cationes monovalentes y divalentes, reactivos de grupos sulfhidrilos, o agentes quelantes de metales, a diferentes concentraciones, sobre la actividad GR de *C. onubensis*. Como se puede apreciar en la tabla, la mayoría de las especies utilizadas no provocaron un efecto significativo sobre la actividad de la enzima a excepción del Mg²⁺ (5 mM), que activó la enzima un 35% respecto al control; y el Mn²⁺, que

provocó una total inhibición a la misma concentración en el medio de reacción. Debido a la fuerte inhibición provocada por el Mn^{2+} , se procedió a realizar un estudio de inhibición (Figura 82) más detallado empleando concentraciones crecientes del catión. En la figura puede apreciarse cómo a concentraciones superiores a 2,5 mM, la inhibición de la actividad GR fue del 100%.

Tabla 23. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad GR de *C. onubensis*.

Agente	GR (%)	
	1 mM	5 mM
Ninguno (control)	100	100
Na^+	97,3	101,8
K^+	95,2	103,2
Mg^{2+}	99,7	135,5
Mn^{2+}	96,8	0
DTT	91,4	98,9
KCN	94,6	106,2
NaN_3	90,8	105,4

Se determinó la actividad GR según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a $19,80 U \cdot mg^{-1}$ de actividad GR.

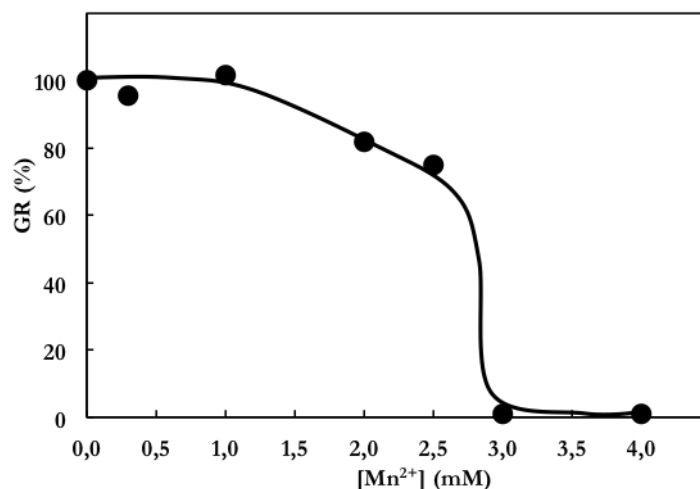


Figura 82. Efecto del Mn^{2+} sobre la actividad GR de *C. onubensis*. Se determinó la actividad GR, según se describe en Materiales y Métodos, en presencia de cantidades crecientes de Mn^{2+} . El 100% corresponde a $16,92 U \cdot mg^{-1}$ de actividad GR.

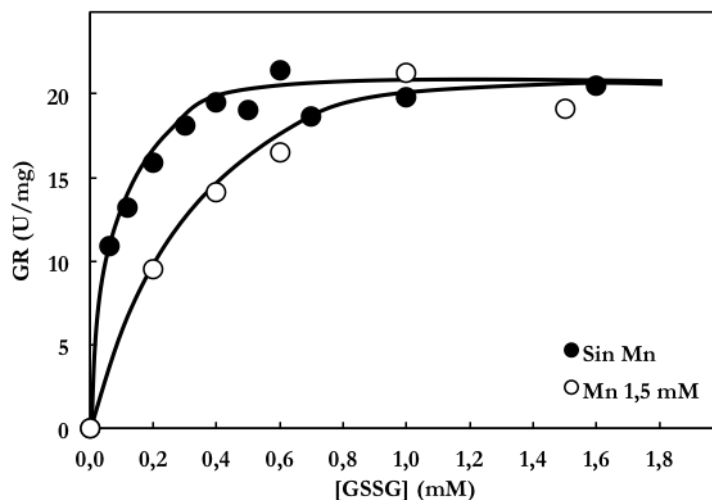


Figura 83. Efecto del Mn^{2+} sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad GR de *C. onubensis* respecto a GSSG. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de GSSG en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura, y en la concentración fija del Mn^{2+} (1,5 mM).

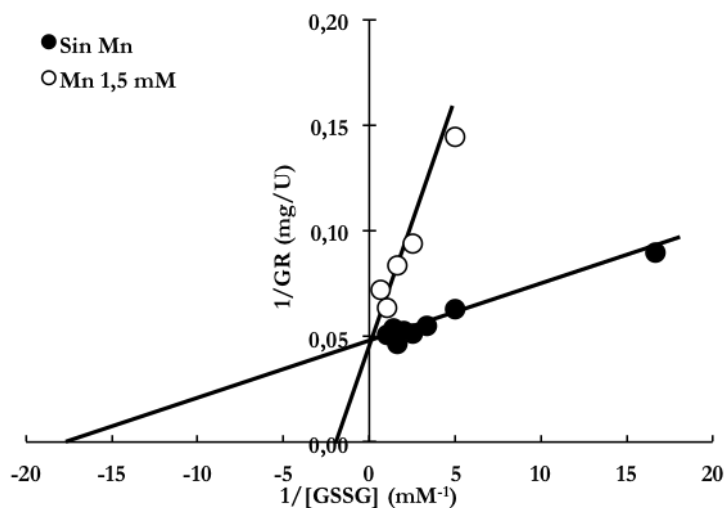


Figura 84. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del tipo de inhibición del Mn^{2+} sobre la actividad GR de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la velocidad de reacción, de los valores representados en la Figura 83.

La Figura 83 muestra los resultados obtenidos cuando se utilizaron concentraciones variables de GSSG y concentraciones fijas de Mn^{2+} (1,5 mM) en la mezcla de reacción. En la figura puede observarse como la GR mantiene la $V_{m\acute{a}x}$ constante, pero se aprecia un aumento aparente de la K_m de la enzima para GSSG para el inhibidor. Así, al realizar la correspondiente representación de dobles inversos (Figura 84), se pudo obtener un valor de K_m para GSSG de 60,2 μM para el proceso sin inhibir y de 0,34 mM para el proceso inhibido, indicativo de que el Mn^{2+} está afectando de forma directa al dominio de interacción de la GR con el GSSG, disminuyendo apreciablemente la afinidad de la enzima por el sustrato.

Ensayo de actividad en gel

A efectos de poder obtener un valor aproximado del peso molecular de la GR de *C. onubensis*, se diseñó un ensayo de actividad en geles de poliacrilamida y en condiciones nativas, utilizando un ensayo similar al realizado para la determinación de la actividad NiR en gel, es decir, se substituyó el donador electrónico, en este caso el NADPH, por metil viológeno reducido con ditionito. Este ensayo no puede utilizarse en el método clásico descrito para el ensayo de la GR, ya que la substitución del NADPH imposibilita el seguimiento de su desaparición cinética. En cambio, en el gel, el resultado de la actividad sería la aparición de una banda acromática en la zona de consumo de metil viológeno reducido, de la misma manera que ocurre para el caso de la actividad NiR. Como control se realizó un ensayo en gel sin glutatión oxidado. Hasta la fecha no se ha reportado la utilización de metil viológeno para ensayar la actividad GR, por lo que el ensayo de actividad en gel para la enzima, mostrado en la Figura 85, es la primera vez que se describe.

Como se aprecia en la figura, aparece una banda acromática en cada calle, si bien la de las calles 3 y 4, pertenecientes a la GR de *C. reinhardtii*, no se observan con total claridad. Las bandas de actividad de las dos microalgas presentan distinta movilidad electroforética, mostrando la GR de *C. onubensis* un menor peso molecular, indicando, además, la existencia de una única isoforma de GR, como en el caso de *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L (Ding et al., 2007) o *P. tricornutum* (Arias et al., 2010). La GR de *C. reinhardtii* es una flavoproteína homodimérica de 127 kDa, con monómeros de 66 kDa (Serrano y Llobell, 1993), lo cual podría justificar la diferencia observada entre las bandas de actividad. Se ha determinado un valor de peso molecular aparente para la GR de *C. onubensis* de 65 kDa, apareciendo, en comparación con la enzima de *C. reinhardtii*, en forma monomérica.

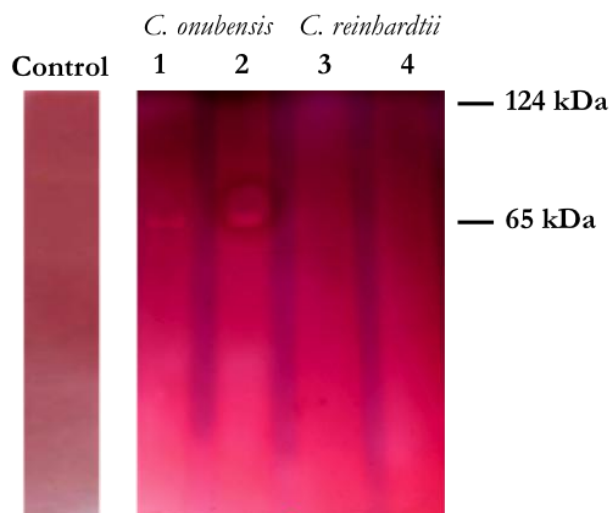
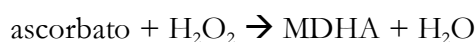


Figura 85. Ensayo de actividad GR en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* y *C. reinhardtii*. Calles 1 y 2, actividad GR en extractos crudos de *C. onubensis* (27,7 μg); calles 3 y 4, actividad GR en extractos crudos de *C. reinhardtii* (15,6 μg). La actividad GR se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

3.3. Caracterización de la actividad ascorbato peroxidasa de *C. onubensis*

La ascorbato peroxidasa (APX) es una hemoproteína que participa en el ciclo ascorbato-glutación catalizando la descomposición de H_2O_2 , utilizando ascorbato como donador electrónico, y produciendo monodehidroascorbato (MDHA) y agua (Gill y Tuteja, 2010), según la reacción:



La caracterización de la actividad APX en extractos crudos de la microalga acidófila *C. onubensis* se muestra en la Tabla 24. El ensayo de actividad se realiza en base a la cinética de desaparición del ascorbato (Amako et al., 1994), mostrándose dependiente de la presencia de H_2O_2 en la mezcla de reacción. La falta de tampón fosfato potásico (pH 7) provocó una disminución del 20% de la actividad, indicativo de la proximidad al pH del agua; mientras que en ausencia de EDTA, la actividad descendió un 45%, posiblemente debido a la protección que ejerce sobre el hierro hemínico de la enzima. La desnaturalización térmica de la enzima indicó la naturaleza biológica de la reacción catalizada.

Tabla 24. Caracterización de las actividades APX en extractos crudos de la microalga *C. onubensis*.

Condiciones	APX (U·mg ⁻¹)	APX (%)
Completo	562,24	100
menos tampón fosfato potásico, pH 7	452,66	80,5
menos EDTA	307,53	54,7
menos H ₂ O ₂	0	0
menos EC; más EC a 100 °C	0	0

El ensayo completo contenía en 1 ml de volumen final: 50 μmol de tampón fosfato potásico, pH 7; 1 μmol de EDTA; 10 μmol de H₂O₂; 0,24 μmol de ascorbato; y 10 μl de extracto crudo (EC). Los demás ensayos se realizaron eliminando los diferentes reactivos y sustituyéndolos por agua destilada. En uno de los ensayos, el EC se calentó a 100 °C durante 2 minutos y se centrifugó a 13400 rpm durante 3 minutos, tras lo cual se determinó la actividad APX. Más detalles sobre el ensayo de actividad en Materiales y Métodos.

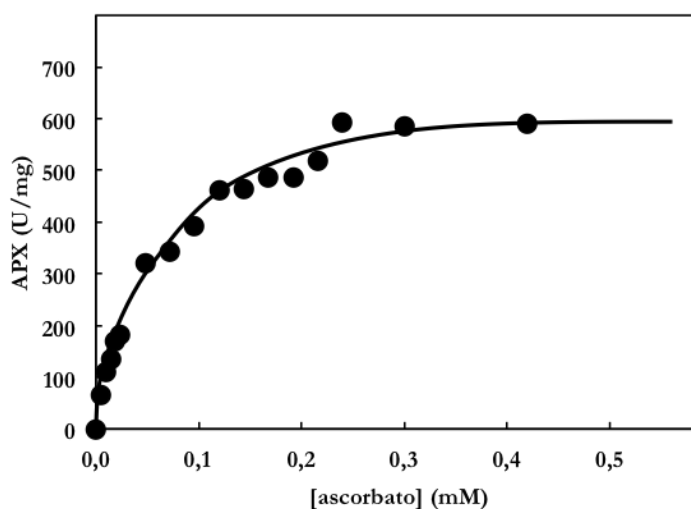


Figura 86. Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX de *C. onubensis* en función de la concentración de ascorbato. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de ascorbato en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

3.3.1. Propiedades cinéticas de la actividad ascorbato peroxidasa

Parámetros cinéticos

La Figura 86 muestra el efecto que, sobre la actividad APX, provoca la variación de la concentración de ascorbato en el medio de reacción. La actividad APX mostró

una cinética clásica de Michaelis-Menten permitiendo obtener, a partir de la correspondiente representación de dobles inversos (Figura 87), un valor de K_m para ascorbato de $37,0 \mu\text{M}$.

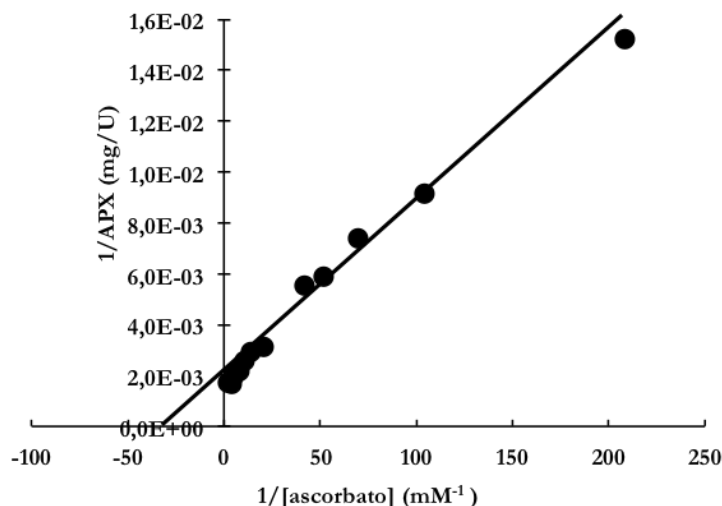


Figura 87. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_m para ascorbato de la actividad APX de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de ascorbato, de los valores representados en la Figura 86.

Cuando se realizó el estudio variando la concentración de H_2O_2 (Figura 88), la curva de saturación de la actividad APX mostró una cinética sigmoideal característica de un comportamiento alostérico, indicativo de la posible existencia de varios dominios de interacción entre la APX y el H_2O_2 , así como de la existencia de cooperatividad por parte del sustrato. Para estudiar este tipo de cinética, se utilizó el modelo descrito por Archibald Hill propuesto en 1913 para la curva de saturación de la hemoglobina. Así, la ecuación de velocidad de la reacción catalizada incorpora el término “n”, denominado índice de Hill (que hace referencia al número de posibles sitios activos), siendo K , o también $S_{0,5}$, la concentración de sustrato para la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima.

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [S]^n}{K^n + [S]^n}$$

Cuando “n” es igual a 1, la ecuación se iguala a la de Michaelis-Menten; mientras que si “n” es mayor que 1, la cooperatividad es de tipo positiva; y si “n” es menor que 1, la cooperatividad es de tipo negativa. El valor de “n” puede determinarse

directamente a partir del valor de la pendiente que se obtiene de la representación lineal que resulta de modificar la ecuación de Hill de la siguiente forma:

$$\log \frac{U_0}{V_{\text{máx}} - U_0} = n \log [S] - n \log [S]_{0,5}$$

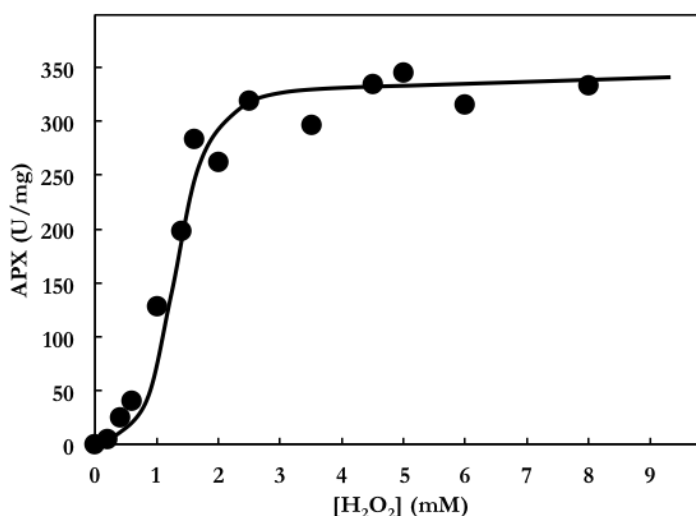


Figura 88. Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX de *C. onubensis* en función de la concentración de H₂O₂. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de H₂O₂ en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

El tipo de cooperatividad también se pone de manifiesto al realizar la representación de dobles inversos ya que, en sistemas alostéricos, se observa una desviación de la linealidad de la representación hacia arriba (cooperatividad positiva) o hacia abajo (cooperatividad negativa).

A partir de los datos de la Figura 88 se obtuvieron las graficas mostradas en la Figura 89. Por un lado, se realizó la representación de Lineweaver-Burk (Figura 89A), y por otro, la representación lineal de la ecuación de Hill (Figura 89B), obteniéndose un valor del índice de Hill “n” de 2,3 y un valor de S_{0,5} de 1,2 mM para H₂O₂. Además, los resultados indican una cooperatividad de tipo positiva respecto al peróxido de hidrógeno, ya que por un lado, el valor de “n” fue mayor que 1 y también la desviación observada en la linealidad de la representación de dobles inversos (Figura 89A, línea roja) quedó por encima. Este hecho parece indicar que la enzima debe poseer varios dominios de interacción con el H₂O₂, de tal forma que la unión de la primera molécula de H₂O₂ facilita la entrada de la siguiente, y así

sucesivamente, provocando un efecto positivo de cooperación en la actividad APX, acelerando la eliminación de H_2O_2 .

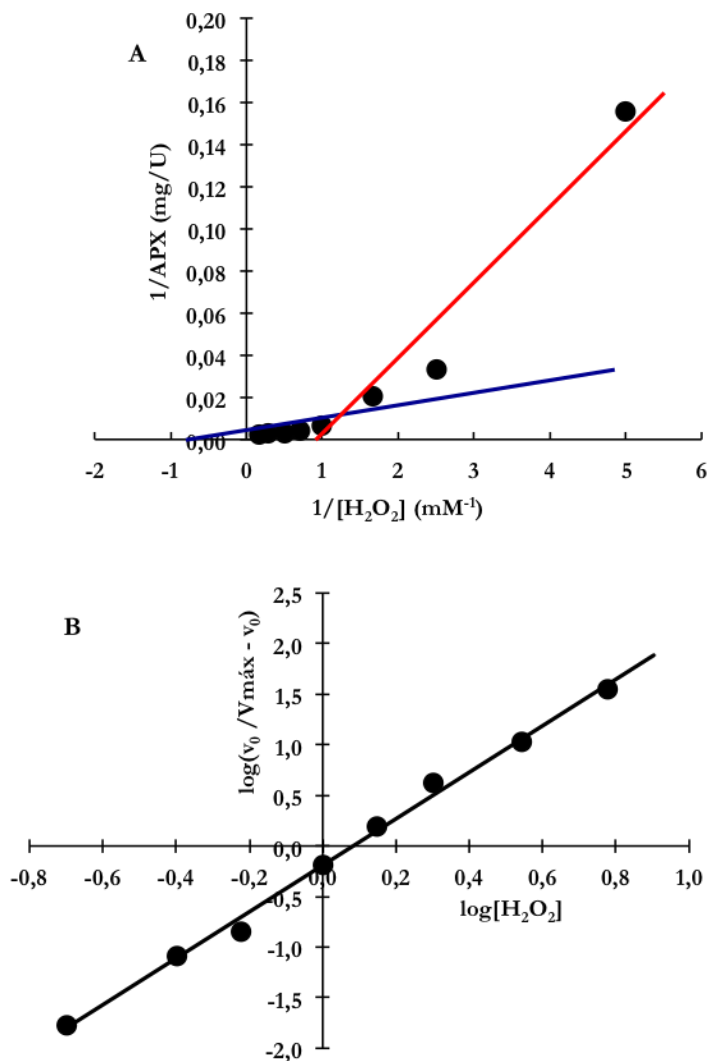


Figura 89. Representación de Lineweaver-Burk (A) y lineal de Hill (B) para la determinación del valor de $S_{0,5}$ y “n” para H_2O_2 de la actividad APX de *C. onubensis*. Los valores se obtuvieron a partir de los datos de la Figura 88.

Efecto del pH

El efecto del pH sobre la actividad APX, en el intervalo de 3 a 9, queda reflejado en la Figura 90. En ella se aprecia como la actividad se hace máxima en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7. Para valores de pH entre 6,5 y 8, la actividad se mantuvo superior al 70% respecto al valor máximo, para caer drásticamente a valores superiores e inferiores de este intervalo, así, por debajo de valores de pH de 5,5 y 9, la actividad disminuyó un 50%, obteniéndose los valores mínimos de actividad a valores de pH 3 y 4.

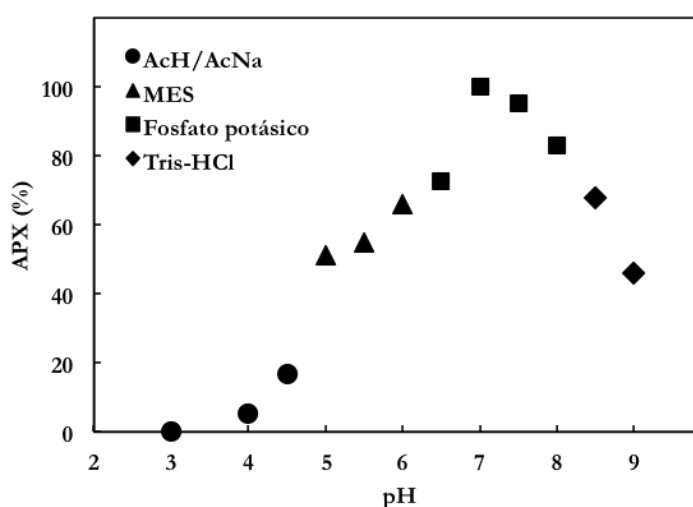


Figura 90. Determinación del pH óptimo de la actividad APX de *C. onubensis*.

Los tampones, utilizados a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción, fueron: AcH/AcNa, pH 3, 4 y 4,5; MES, pH 5, 5,5 y 6; fosfato potásico, pH 6,5, 7, 7,5 y 8; Tris-HCl, pH 8,5 y 9. El 100% corresponde a 601, 85 U·mg⁻¹ de actividad APX. Más detalles en Materiales y Métodos.

Efecto de la temperatura

La Figura 91 muestra la dependencia de la actividad APX con la temperatura en el intervalo comprendido entre 1,5 y 65 °C. El máximo valor de actividad se alcanzó a una temperatura de 50 °C, si bien, en el rango de temperatura entre 1,5 y 45 °C, la actividad se mantuvo en todo momento con un valor superior al 45%.

A partir de los valores de actividad obtenidos en la zona ascendente de la curva, se obtuvo la representación de Arrhenius mostrada en la Figura 92. Los valores comprendidos entre 23 y 50 °C se disponen linealmente distinguiéndose dos pendientes distintas, calculándose un valor de energía de activación de 6,6 kJ·mol⁻¹ entre 23 y 40 °C, y de 52,6 kJ·mol⁻¹ entre 40 y 50 °C, lo que indicaría que el proceso catalizado por la APX se llevaría a cabo en dos etapas, una de las cuales limitaría el

proceso notablemente, ya que requiere de un aporte de energía 8 veces superior al de la otra etapa.

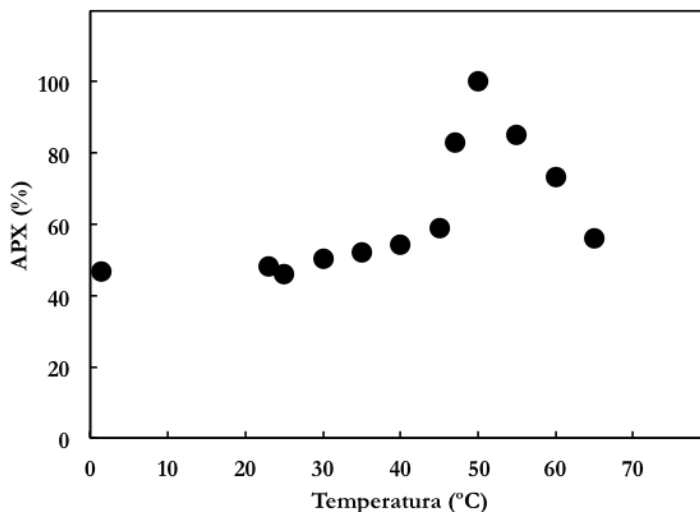


Figura 91. Determinación de la temperatura óptima de la actividad APX de *C. onubensis*. La actividad APX se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando la mezcla de reacción a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a $536,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad APX.

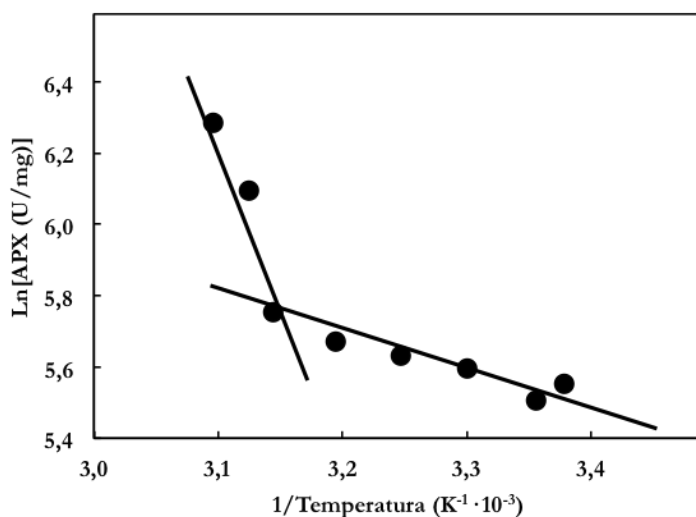


Figura 92. Determinación de la energía de activación de la actividad APX de *C. onubensis*. Representación de Arrhenius del logaritmo neperiano de la actividad APX frente a $1/\text{Temperatura}$, de los valores obtenidos en la Figura 91.

Estabilidad térmica

Para determinar cómo afecta la temperatura a la estabilidad de la actividad APX de *C. onubensis*, se procedió a incubar un extracto crudo de la microalga a distintos tiempos y temperaturas. La Figura 93 muestra como a las temperaturas de 40 y 60 °C, se produjo una caída drástica de la actividad APX en el intervalo de tiempo de 1 hora, perdiendo toda la actividad a tiempos mayores. A las temperaturas de 18 y 30 °C, se aprecia que la actividad permaneció constante en el intervalo de tiempo de 7 horas (420 minutos), perdiendo su actividad a tiempos mayores. Por último, a las temperaturas de -20, 0 y 4 °C, la actividad se mantuvo más o menos constante en todo el intervalo de tiempo que duró el ensayo.

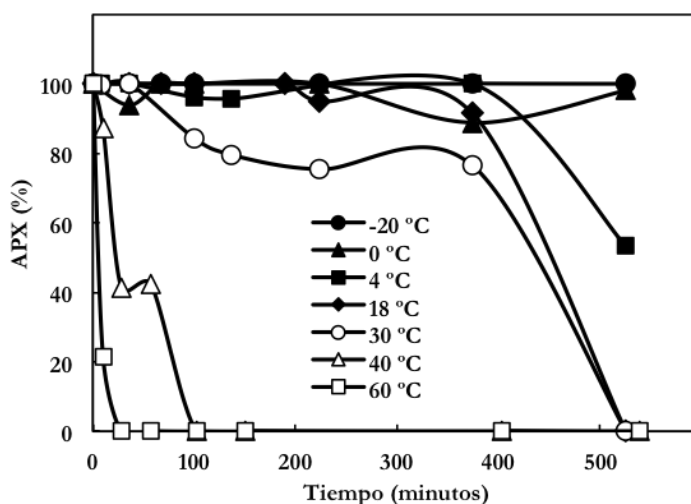


Figura 93. Estabilidad térmica de la actividad APX de *C. onubensis*. La actividad APX se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, aunque incubando los extractos crudos a las temperaturas indicadas. El 100% corresponde a 491,35 U·mg⁻¹ de actividad APX.

Como se indicó en el apartado 2.2.2 de la Introducción, uno de los aspectos más destacados de las APX es su baja estabilidad en ausencia de ascorbato en el tampón de extracción (Shigeoka et al., 1980a). Así, en plantas, donde se han identificado varias isoenzimas, los tiempos de inactivación rondan los 30 segundos para las isoformas cloroplástica y mitocondrial, y en torno a 1 hora para la citosólica y la membranal (Chen y Asada, 1989; De Leonardis et al., 2000). Por este motivo, todos los extractos realizados se hicieron con tampón de extracción conteniendo ascorbato a una concentración de 1 mM.

Según la caracterización físico-química realizada para la actividad APX de la microalga *C. onubensis*, se han obtenido valores de Km de 37,0 μM para ascorbato y de 1,2 mM para H₂O₂. Además, la APX presentó una cinética sigmoideal característica

de un comportamiento enzimático alostérico respecto al H_2O_2 . El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 7 en tampón fosfato potásico 50 mM, una temperatura óptima de 50 °C y dos energías de activación de 6,6 y 52,6 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente.

La Tabla 25 muestra una comparación de estos datos con los de otras APX de origen fotosintético. Para la microalga *C. onubensis* se obtuvo el valor más alto de pH óptimo (pH 7,0 en tampón fosfato), coincidente con la APX de patata y soja, siendo ligeramente más ácido el valor que muestran las APX de otras microalgas y plantas. La temperatura óptima obtenida (50 °C) para la enzima de *C. onubensis* fue también superior al resto de valores que muestran las APX de organismos fotosintéticos indicados, cuyo valor osciló entre 32 y 42 °C.

En cuanto a los valores de K_m para la actividad APX, en el caso del ascorbato, en *C. onubensis* se obtuvo el valor más bajo respecto a los mostrados en la tabla, situándose en torno a un orden de magnitud inferior al valor de K_m para ascorbato de la APX de *Chlamydomonas* o de soja. Por el contrario, en el caso del H_2O_2 , el valor de K_m más alto se obtuvo para la enzima de *C. onubensis*, aunque como se indicó en la Figura 88, este dato no se corresponde realmente con un valor de K_m , sino que hace referencia al de $S_{0,5}$, en base al comportamiento alostérico observado, que se sitúa incluso un orden de magnitud por encima del valor de la K_m de algodón y sobre 20 veces el valor del indicado para *Chlamydomonas* o *E. gracilis*. Hasta la fecha no existen datos previos que muestren este comportamiento alostérico de la actividad APX frente a H_2O_2 .

Tabla 25. Parámetros cinéticos de las APX de algunos organismos fotosintéticos.

Organismo	K_m		T^a °C	pH Óptimo
	ascorbato	H_2O_2		
	mM			
<i>Coccomyxa onubensis</i>	0,037	1,2*	50	7,0
<i>Chlamydomonas</i> sp. W80 Strain	0,342	0,052	42	6,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,111	0,020	36	6,1
<i>Euglena gracilis</i> z	0,410	0,056	32	6,2
<i>Brassica rapa</i>	0,402	0,024	38	6,5
Algodón	0,430	0,120	nd	6,5
Patata	0,076	0,083	nd	7,0
Soja	0,350	0,020	nd	5,9-7,0

Los datos corresponden a las siguientes referencias: *C. onubensis*, objeto estudio de la presente Tesis; *Chlamydomonas* sp. W80 Strain, Takeda et al. (2000); *C. vulgaris*, Takeda et al. (1998); *Euglena gracilis* z, Shigeoka et al. (1980b); *Brassica rapa*, Ishikawa et al. (1996); algodón, Li et al. (2007b); Patata, De Leonardis et al. (2000); Soja, Dalton et al. (1996). nd indica no determinado; * indica valor de $S_{0,5}$.

Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad APX

La Tabla 26 recoge un estudio del efecto que producen distintas especies químicas, tales como cationes monovalentes y divalentes, reactivos de grupos sulfhidrilos, o agentes quelantes de metales, a diferentes concentraciones, sobre la actividad APX en extractos crudos de *C. onubensis*. Como se puede apreciar, tanto la azida (NaN_3) como el cianuro (KCN), inhibidores de enzimas que poseen hierro-hemínico, inhibieron claramente la actividad, concretamente un 100% el cianuro y alrededor de un 70% la azida, ambos a una concentración de 1 mM en la mezcla de reacción, lo que pone de manifiesto el carácter hemínico de la enzima de *C. onubensis*, al igual que se ha descrito previamente para otras APX (De Leonardis et al., 2000; Takeda et al., 2000).

Los cationes monovalentes, tales como el Na^+ y K^+ 1 mM, apenas produjeron efecto alguno sobre los niveles de actividad APX. En cualquier caso, cabe destacar una ligera inhibición de la actividad, en ambos casos, a una concentración de 5 mM. Para el caso de los cationes divalentes, el Mn^{2+} provocó una inhibición del 81% a una concentración de 5 mM. La inhibición provocada por el Mn^{2+} sobre la actividad APX de *C. onubensis* ha sido también descrita para la enzima de *E. gracilis* z (Shigeoka et al., 1980b), aunque a una concentración menor (1 mM). Por su parte, el Mg^{2+} 1 mM produjo un aumento del 21% de la actividad APX, si bien la actividad disminuyó un 15%, respecto al control, a una concentración de 5 mM.

Por último, en el caso del DTT, reactivo de grupos sulfhidrilos, produjo una fuerte inhibición de la actividad (88%) a una concentración de 1 mM, inhibiéndose totalmente la actividad cuando se aumentó 5 veces su concentración. Esto concuerda con la relevancia de los grupos tiólicos de la enzima en la reacción catalizada, de hecho, se ha indicado la importancia de la Cys-32 en la enzima de guisante (Mandelman et al., 1998).

Tabla 26. Efecto de diferentes agentes sobre la actividad APX de *C. onubensis*.

Agente	APX (%)	
	1 mM	5 mM
Ninguno (control)	100	100
Na^+	91,6	84,7
K^+	80,2	80,2
Mg^{2+}	121,8	84,7
Mn^{2+}	101,0	19,8
DTT	11,9	0
KCN	0	0
NaN_3	31,7	13,9

Se determinó la actividad APX según se describe en Materiales y Métodos en presencia de los compuestos reseñados, a la concentración indicada. El 100% corresponde a $559,71 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de actividad APX.

A efecto de ver el tipo de inhibición de algunos de los inhibidores probados en el presente estudio, se procedió a realizar un estudio cinético más detallado utilizando concentraciones variables de ascorbato en ausencia y presencia de los inhibidores. Se seleccionó para este estudio el Mn^{2+} y DTI, mostrándose los resultados a continuación.

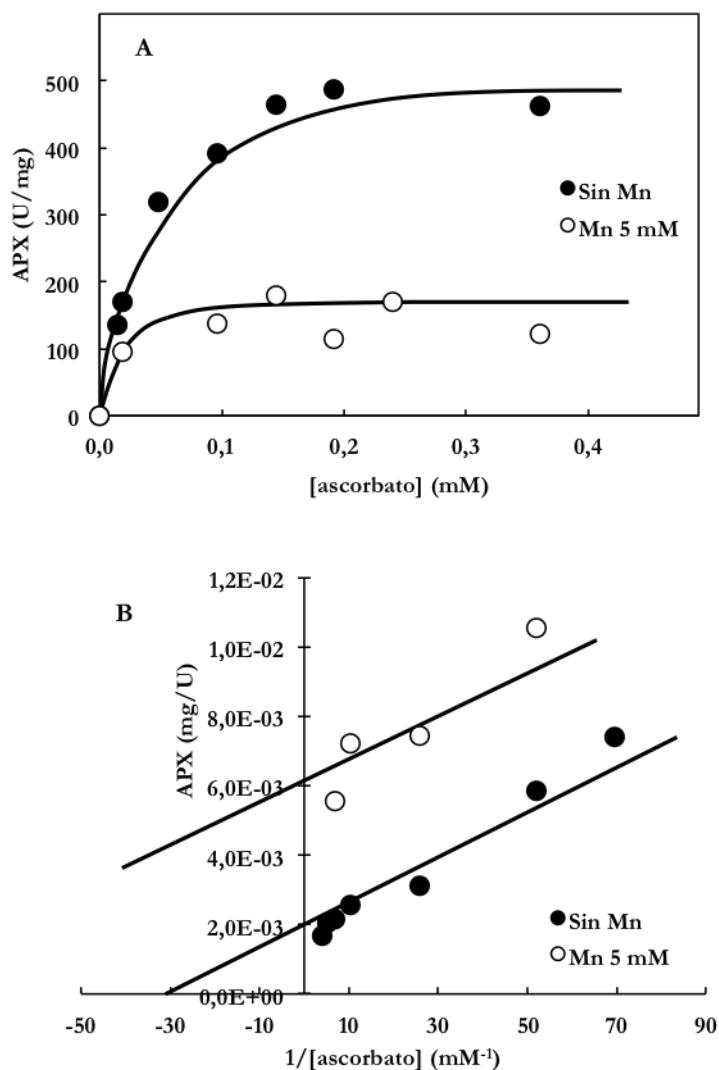


Figura 94. Representación de Michaelis-Menten (A) y de Lineweaver-Burk (B) para la determinación del tipo de inhibición del Mn^{2+} en función de la concentración de ascorbato para la actividad APX de *C. onubensis*. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de ascorbato en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura, y en la concentración fija del Mn^{2+} (5 mM).

La Figura 94 muestra el estudio realizado con Mn^{2+} (5 mM). Como puede observarse en la Figura 94A, se aprecia una disminución drástica del valor de la velocidad máxima de la actividad APX en presencia del catión, resultado que se confirma con la representación de dobles inversos (Figura 94B), donde, además, se puede comprobar cómo las dos rectas obtenidas, en ausencia y presencia del inhibidor, son paralelas. Este resultado es consecuente con una inhibición acompetitiva, en donde el inhibidor (Mn^{2+}) posiblemente bloquee la actividad APX una vez que la enzima haya formado el complejo con ascorbato.

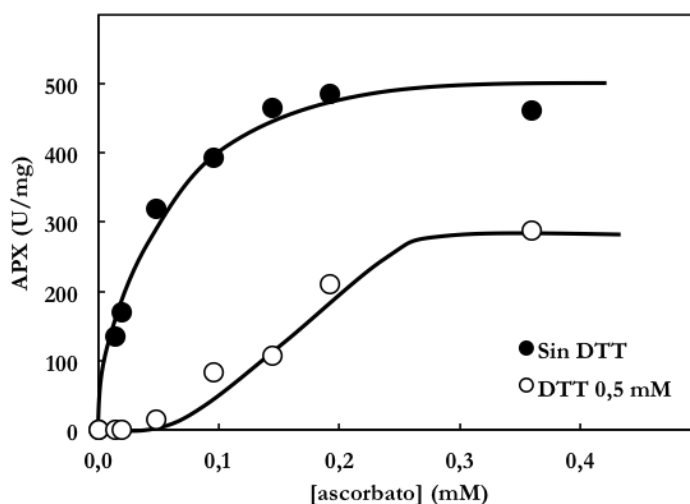


Figura 95. Efecto del DTT sobre la curva de Michaelis-Menten de la actividad APX de *C. onubensis* respecto a ascorbato. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de ascorbato en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura, y en la concentración fija del DTT (0,5 mM).

La Figura 95 muestra los resultados obtenidos cuando se utilizaron concentraciones variables de ascorbato, en ausencia y presencia del DTT (0,5 mM), en la mezcla de reacción. Puede observarse como, al adicionar DTT, la curva de Michaelis-Menten para ascorbato en ausencia del inhibidor se desplaza hacia un comportamiento de tipo sigmoideal. Así, la presencia de DTT disminuye la afinidad de la enzima por el ascorbato, a la vez que disminuye la velocidad máxima del proceso catalizado. No obstante, al poseer un comportamiento de tipo sigmoideal, no pudo realizarse el estudio de inhibición por dobles inversos derivado de la ecuación de Michaelis-Menten, concluyéndose que el DDT actúa como modulador negativo del proceso, indicando, además, la importancia de los grupos sulfhidrilos en el proceso catalizado.

Ensayo de actividad en gel

La Figura 96 muestra el resultado de un ensayo de actividad APX en extractos crudos de la microalga *C. onubensis* en gel de poliacrilamida, en condiciones nativas. Como puede apreciarse, la existencia de varias bandas de actividad es consecuente con el hecho de que en *C. onubensis* pudieran existir varias isoformas con actividad APX, tal y como ocurre en plantas como el té (Chen y Asada, 1989), la patata (De Leonadis et al., 2000) y *B. rapa* (Ishikawa et al., 1996). No obstante, en cianobacterias y algas eucarióticas se ha indicado la presencia de una sola isoforma de APX, tal y como ocurre en *E. gracilis* (Shigeoka et al., 1980b), *Chlamydomonas* (Takeda et al., 2000) y *C. vulgaris* (Takeda et al., 1998).

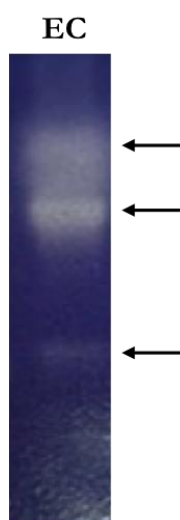


Figura 96. Ensayo de actividad APX en gel de poliacrilamida. Se realizó una electroforesis nativa de extractos crudos de *C. onubensis* (27,7 µg). La actividad APX se determinó según se describe en Materiales y Métodos.

3.3.2. Purificación parcial de la ascorbato peroxidasa

Tal y como se ha comentado previamente en el ensayo de actividad en gel de la APX, en *C. onubensis* parece ser que existen varias isoformas con actividad APX. Por ese motivo, en este apartado se muestra la purificación parcial de las posibles isoenzimas solubles de la APX de *C. onubensis* y, en su caso, una caracterización cinética parcial de las mismas.

Para realizar la purificación, se partió de un extracto crudo de 35 ml obtenido a partir de 11,3 g de peso húmedo de células de *C. onubensis*. El extracto se trató previamente con sulfato de estreptomycin para eliminar pigmentos y nucleicos y la preparación obtenida se aplicó a una columna de 15 ml de DEAE-Sefacel,

equilibrada con tampón de extracción (tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7; ascorbato 1 mM) a un flujo máximo de 15 ml·h⁻¹.

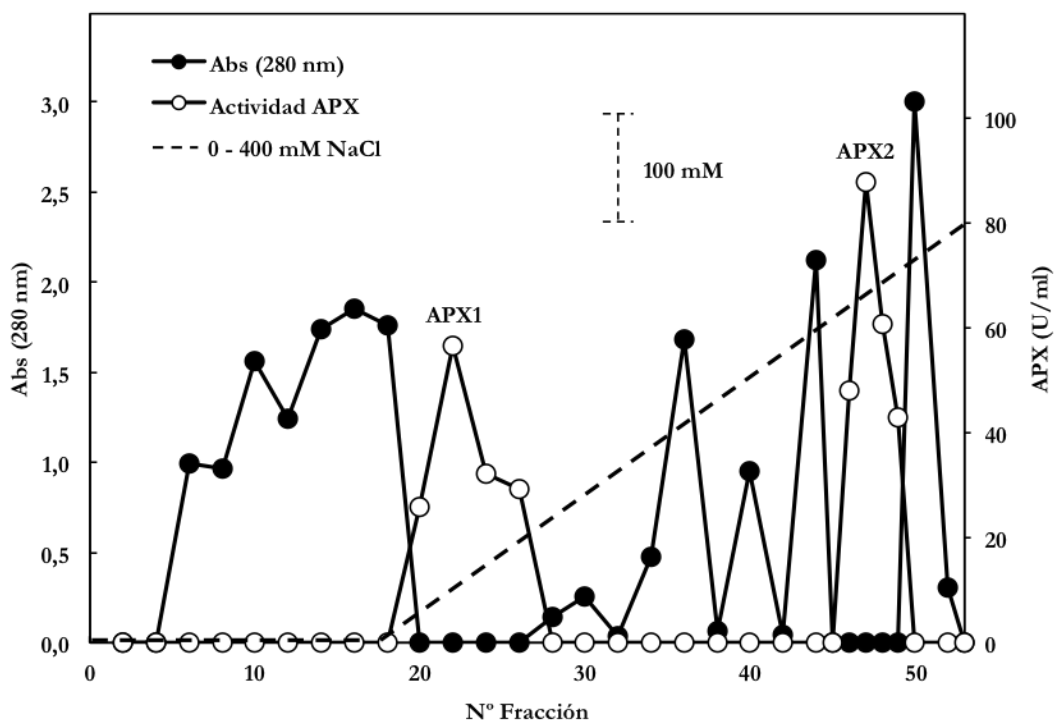


Figura 97. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sefacel de la actividad APX de *C. onubensis*. Las líneas discontinuas representan la concentración de NaCl a lo largo del perfil cromatográfico. El procedimiento se realizó según se describe en Materiales y Métodos.

Tras aplicar la preparación, la columna se lavó con tampón de extracción para, a continuación, aplicar un gradiente de sal de 0 a 400 mM de NaCl, preparado en tampón de extracción. El perfil de elución resultante de dicha cromatografía se muestra en la Figura 97, donde puede apreciarse cómo el aumento progresivo de la fuerza iónica de la sal durante la elución permitió obtener dos picos de actividad APX, uno de ellos tras el lavado con tampón de extracción al inicio del gradiente de NaCl (fracciones 19-27), y el otro al final del gradiente (fracciones 46-49). Según el orden de elución en la cromatografía, dichos picos de actividad se han denominado como APX1 y APX2.

La Tabla 27 muestra las distintas etapas de purificación realizadas tras las cuales se obtuvo una preparación, denominada APX1, con una actividad específica de 1504,4 U·mg⁻¹, una recuperación del 10,4% y un factor de purificación de 5,6 veces; y una segunda preparación (APX2), con una actividad específica de 3953,49 U·mg⁻¹,

una recuperación del 6,1% y un factor de purificación de 14,6 veces. Estos resultados son indicativos de que posiblemente *C. onubensis* posea, al menos, dos isoenzimas solubles con actividad APX.

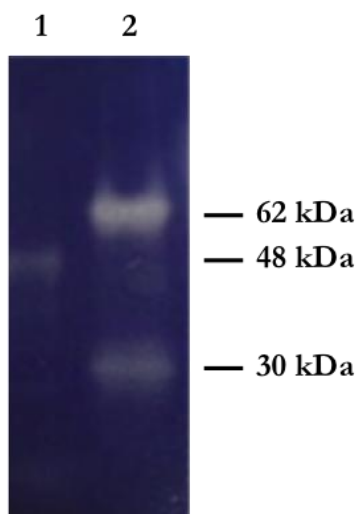
Tabla 27. Purificación parcial de la APX de *C. onubensis*.

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Act. (U)	Act. Esp. (U·mg ⁻¹)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	37,0	20,13	5430,8	269,83	100
Sbte. Estreptomicina	35,0	7,91	5834,8	737,67	100
DEAE-Sefacel	APX1	15,0	0,37	564,1	10,4
	APX2	6,5	0,084	331,5	6,1

La purificación se realizó a partir de 11,3 g de células (peso húmedo), como se describe en Materiales y Métodos.

Ensayo de actividad en gel de las preparaciones obtenidas

A efecto de comprobar las características moleculares de las posibles isoformas de APX1 y APX2 de *C. onubensis*, se procedió a realizar un ensayo de actividad en gel de poliacrilamida, y en condiciones nativas, de las preparaciones obtenidas.



En la Figura 98 se aprecian distintas bandas con actividad APX con distinta movilidad electroforética. En la calle 1 aparece una única banda de actividad APX correspondiente con la isoforma APX1, mientras que en la calle 2, correspondiente a la preparación APX2, aparecen dos bandas de actividad, una de menor peso molecular que la APX1 y otra de mayor intensidad, con un peso ligeramente mayor que la APX1. Por lo que, o bien existen dos isoformas en esa preparación, o bien una sola que pueda presentarse en varias formas de asociación. Se ha descrito en plantas que las isoenzimas cloroplásticas normalmente existen en forma monomérica, en cambio, las citosólicas pueden aparecer como dímeros (Mittler y Zilinskas, 1991; Miyake et al., 1993). También se ha indicado que las isoformas cloroplásticas poseen un mayor peso molecular debido a que poseen una extensión N-terminal de un péptido señal (tránsito) (Shigeoka et al., 1980a, b). En este sentido, aunque se requerirían más estudios al respecto, podría ocurrir que en la microalga *C. onubensis*, la APX1 se correspondiera con la isoforma cloroplástica con un peso molecular aparente de 48 kDa, y la isoforma APX2 con la citosólica, apareciendo en el gel como monómero de 30 kDa y dímero de 62 kDa, aproximadamente. En las microalgas *C. vulgaris* y *Chlamydomonas* sp. W80, se ha descrito la presencia de una única isoforma de la APX de 32 y 33 kDa, respectivamente (Takeda et al., 1998; 2000).

Propiedades cinéticas de las distintas isoformas de la APX

A efecto de encontrar posibles diferencias de carácter cinético entre las isoenzimas purificadas parcialmente de *C. onubensis*, se realizó un estudio de la APX1 y APX2 en relación con la afinidad catalítica hacia sus sustratos.

La Figura 99 muestra los resultados obtenidos cuando se utilizaron concentraciones variables de ascorbato, en la mezcla de reacción, para la actividad de las isoformas APX1 y APX2. En la figura puede observarse que, tanto la APX1 como la APX2, presentaron una cinética clásica de Michaelis-Menten respecto a ascorbato. A partir de la correspondiente representación de dobles inversos (Figura 100), se obtuvo un valor de Km de 73,2 μ M para la APX1 y de 34,9 μ M para la APX2.

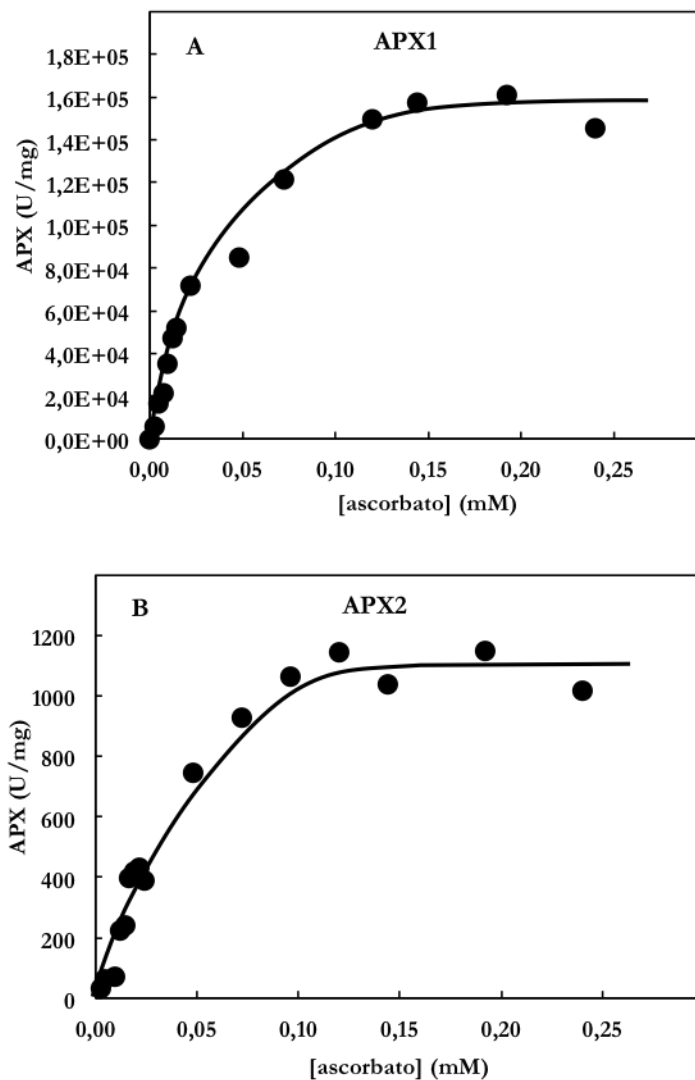


Figura 99. Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de *C. onubensis* en función de la concentración de ascorbato. La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de ascorbato en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

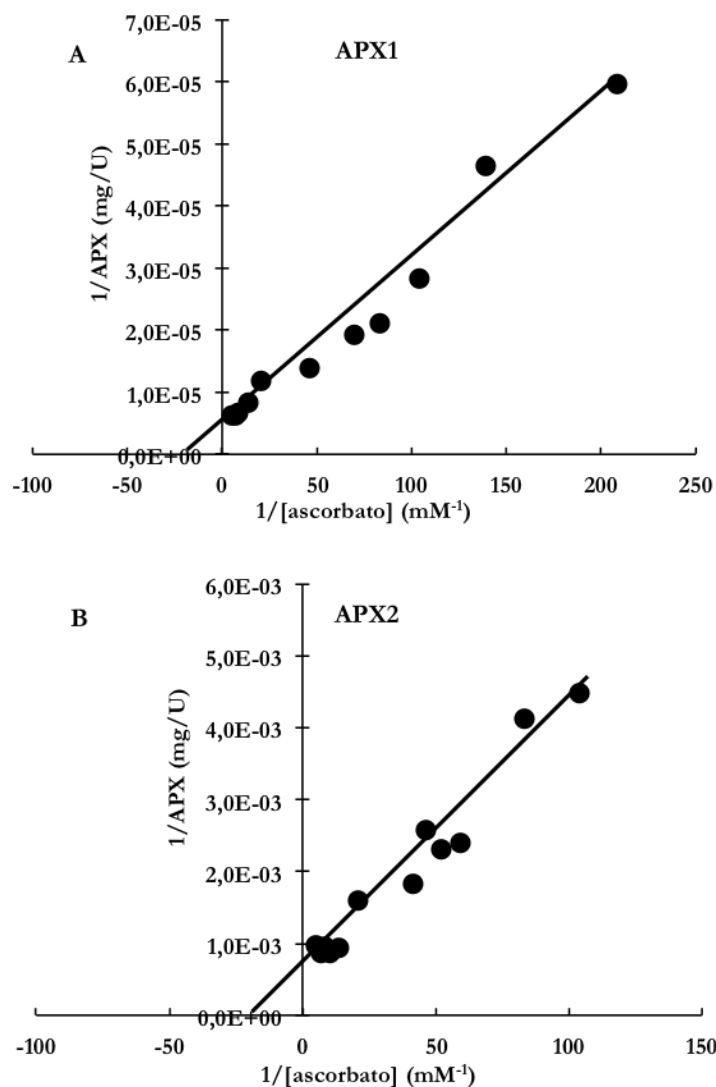


Figura 100. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de los valores de K_m para ascorbato de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de *C. onubensis*. Se representa la inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de la concentración de ascorbato, de los valores representados en la Figura 99.

El estudio realizado para H_2O_2 se muestra en la Figura 101 y Figura 102. Como se puede apreciar en las figuras, la actividad de la isoforma APX1 mostró un comportamiento alostérico, mientras que la isoforma APX2 presentó una cinética clásica de Michaelis-Menten, obteniéndose para esta isoforma (APX2) un valor de

Km aparente para el H_2O_2 de 8,2 mM mediante la representación de Lineweaver-Burk (Figura 102B).

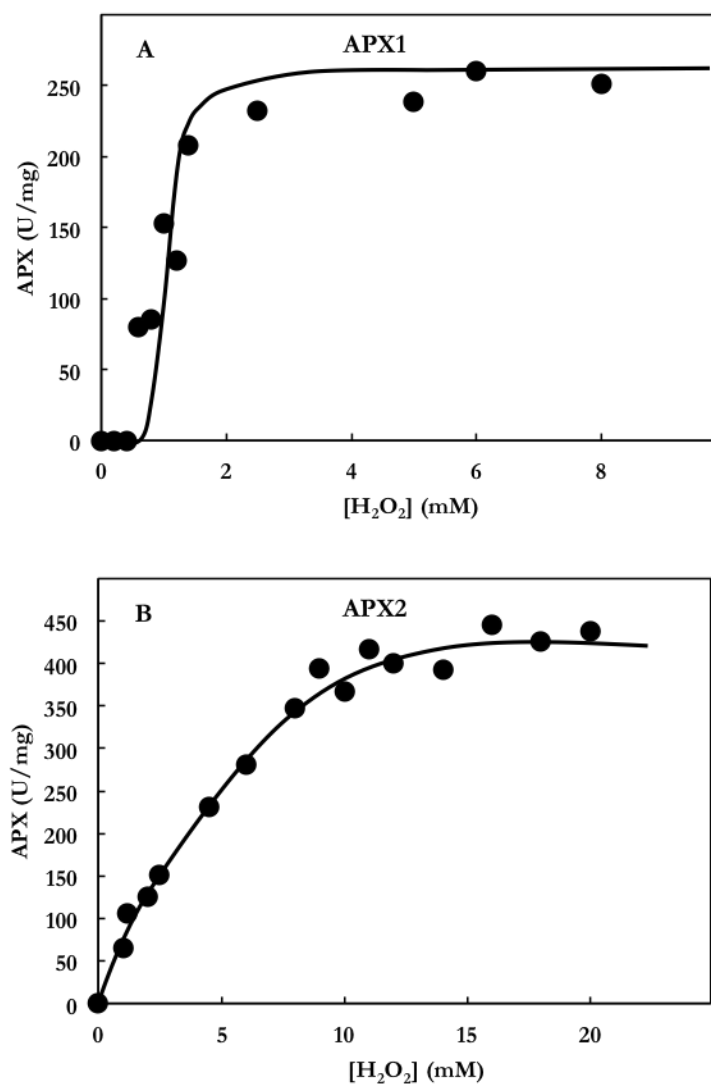


Figura 101. Representación de Michaelis-Menten de la actividad APX1 (A), o APX2 (B), de *C. onubensis* en función de la concentración de H_2O_2 . La actividad se midió tal y como se describe en Materiales y Métodos, excepto en lo referente a las concentraciones de H_2O_2 en la mezcla de reacción, que variaron según se muestra en la figura.

Para el caso de la APX1, a partir de la correspondiente representación lineal de Hill (Figura 102A), se obtuvo un valor de $S_{0,5}$ de 0,9 mM y un índice de Hill “n” de

2,0, indicando que el efecto de la cooperatividad positiva observado en el extracto crudo se debía mayoritariamente a la actividad de la isoenzima APX1 de *C. onubensis*, que actuaría a bajas concentraciones de H_2O_2 , mientras que la APX2 tendría menos afinidad por el H_2O_2 , presentando una cinética michaeliana y actuando a concentraciones más altas de H_2O_2 .

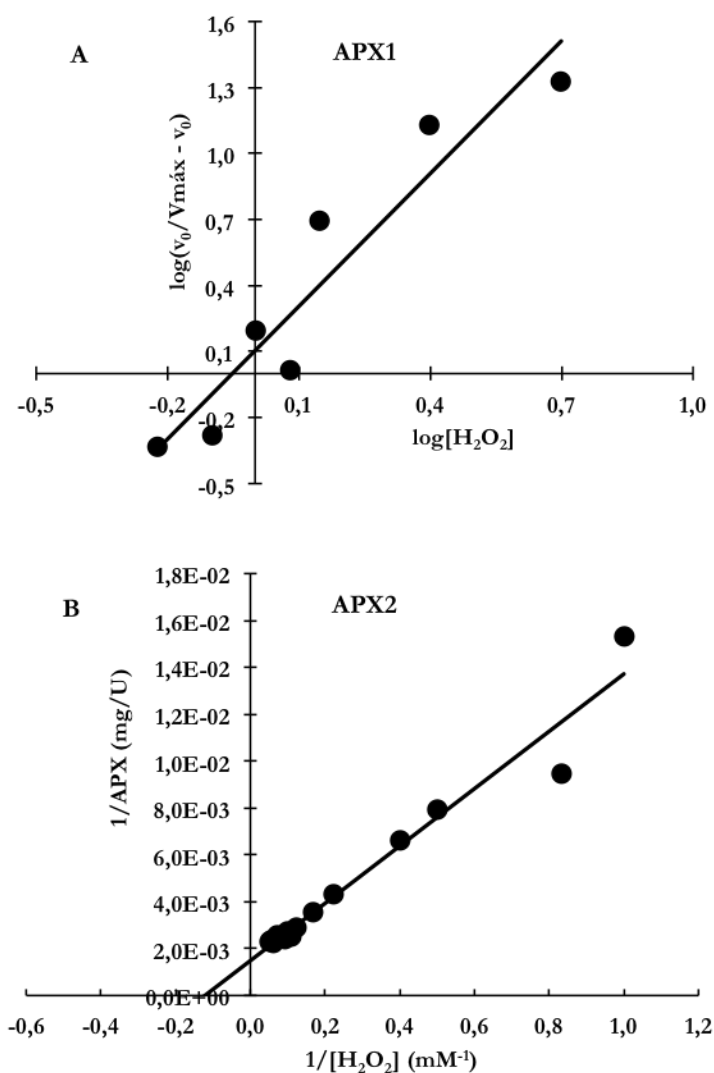


Figura 102. Representación lineal de Hill para APX1 (A) y de Lineweaver-Burk para APX2 (B) de *C. onubensis* en función de la concentración de H_2O_2 . Los valores se obtuvieron a partir de los datos de la Figura 101.

3.4. Efecto del estrés abiótico sobre los niveles de actividad CAT, GR y APX de *C. onubensis*

Tras la caracterización de los ensayos de actividad de la catalasa, la glutatión reductasa y la ascorbato peroxidasa de la microalga *C. onubensis*, a continuación se muestra un estudio sobre el efecto que provocó la exposición de la microalga a la presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) (arsenito) o As(V) (arseniato), sobre la actividad de las tres enzimas mencionadas. Las células se mantuvieron creciendo a pH ácido durante 8 días, en ausencia (control) o presencia del metal o metaloide. Transcurrido ese tiempo, se prepararon los extractos crudos correspondientes y se determinaron los niveles de actividad de las enzimas indicadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Estudios previos sugieren que el estrés oxidativo está implicado en la toxicidad por metales pesados y algunos metaloides, como el Cd^{2+} (Benavides et al., 2005), Cu^{2+} (Gao et al., 2008), Hg^{2+} (Shrivastava et al., 2015), As(III) y As(V) (Ahsan et al., 2008; Mallick et al., 2011), ya sea induciendo la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), o disminuyendo los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Benavides et al., 2005). Para hacer frente a los daños causados por las ROS, las células vegetales han desarrollado una serie de mecanismos de defensa formado por un sistema de dos componentes para regular el equilibrio de las ROS dentro de las células. El primer componente está constituido por sistemas enzimáticos antioxidantes, entre los que se destaca la acción de la CAT o el ciclo ascorbato-glutatión (en el que participan la GR y la APX), encargados de la degradación mayoritaria de H_2O_2 (Tausz et al., 2004; Gill y Tuteja, 2010). El segundo componente abarca un grupo de antioxidantes no enzimáticos que incluye el glutatión reducido (GSH) aportado por la GR, las fitoquelatinas secuestradoras de metales (que requieren GSH para su síntesis), o el ascorbato (donador electrónico de la APX), cuya acumulación, junto con la de otros metabolitos, se ha indicado durante la exposición a metales pesados (Khan et al., 2009; Song et al., 2010).

La Figura 103 muestra el estudio realizado sobre la actividad CAT de *C. onubensis*. Como se puede apreciar en la figura, a excepción del Hg^{2+} , en los demás casos estudiados, la actividad CAT aumentó significativamente a medida que se aumentó la concentración del metal o metaloide utilizado, para decaer a las concentraciones más altas. La especie que provocó un mayor efecto sobre la actividad CAT fue el Cu^{2+} , observándose un aumento del nivel de actividad de 4 veces, respecto al control, con Cu^{2+} 300 μM . Este comportamiento podría deberse al estrés oxidativo provocado por la presencia de Cu^{2+} , bioelemento esencial que participa como componente estructural y catalítico de proteínas y enzimas (Pilon et al., 2006), pero que, a altas concentraciones, provoca la producción de especies reactivas de oxígeno, entre ellas el H_2O_2 (Liu et al., 2004). Teniendo en cuenta que la CAT es una enzima clave en el proceso de detoxificación del H_2O_2 (Mittler, 2002), ante esta situación de estrés, la CAT de *C. onubensis* actuaría eliminando el exceso de H_2O_2 resultante de la exposición al metal.

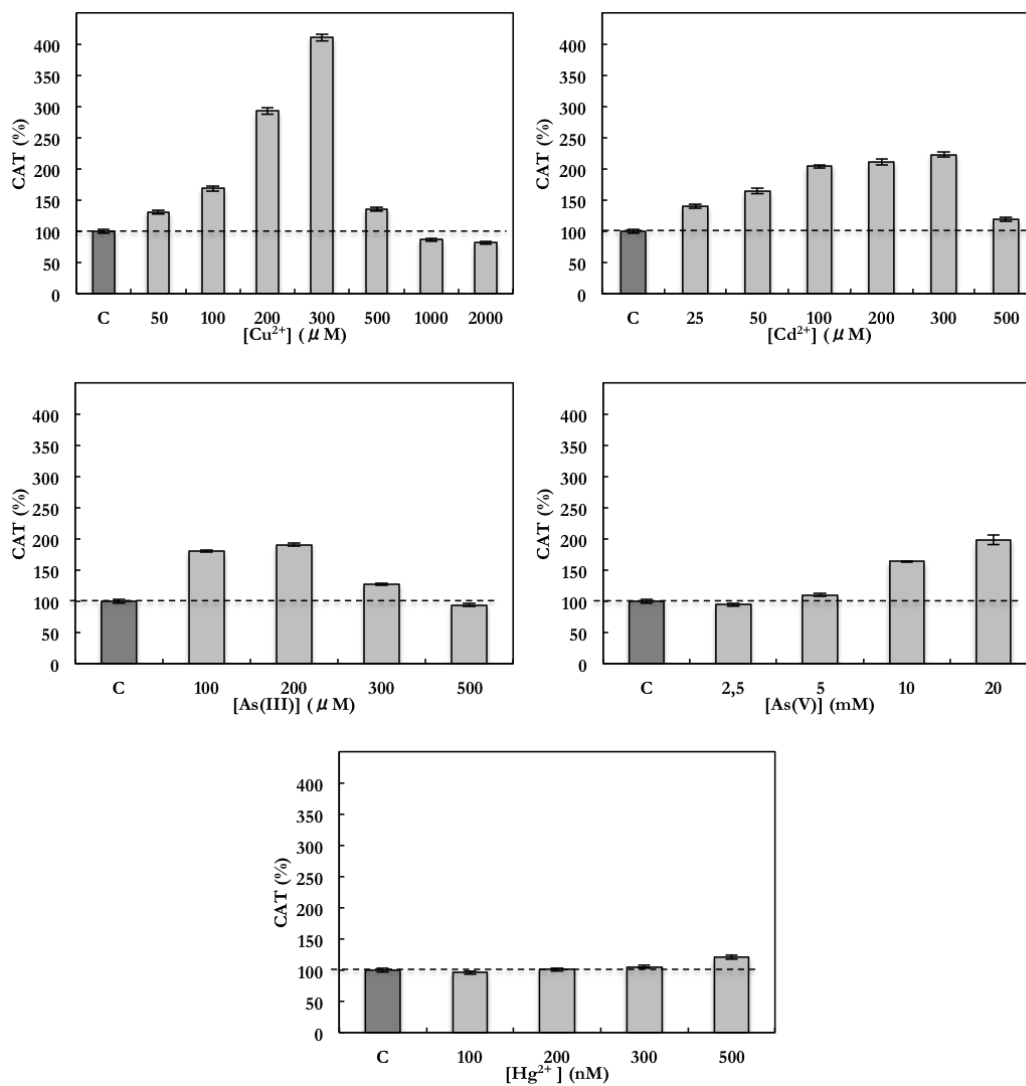


Figura 103. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad CAT en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO₃, en ausencia (control) o presencia de Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, As(III) o As(V), a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad CAT en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. 8416,49 ± 95,06 mU·mg⁻¹ corresponde al 100% de actividad CAT.

Estos resultados contrastan con estudios previos realizados en plantas (Mazhoudi et al., 1997; Jouili y El Ferjani, 2004), donde en algunos casos, la exposición a Cu^{2+} no afecta a la actividad CAT y, en otros, llega a inhibirla parcialmente. De manera similar, en células de *C. reinhardtii* expuestas a Cu^{2+} 300 μM , tampoco se ha observado efecto alguno sobre la actividad CAT (Domínguez, 2008). En cualquier caso, hay que tener en cuenta que *C. onubensis* es un organismo extremófilo adaptado a vivir en ambientes ácidos y con altas concentraciones de metales pesados, por lo que posiblemente posea una maquinaria antioxidante especialmente activa. De hecho, como muestra la Figura 103, el nivel de actividad CAT de la microalga también se incrementó 2,5 veces por exposición a Cd^{2+} 300 μM , y 2 veces en As(III) 200 μM y As(V), aunque en este caso a una concentración 100 veces superior.

El Cd^{2+} es un poderoso inhibidor enzimático (Das et al., 1997) y se ha demostrado que causa estrés oxidativo en las plantas (Benavides et al., 2005), tal y como ocurre en los nódulos de soja (Balestrasse et al., 2001), llegando a aumentar los niveles de actividad de enzimas antioxidantes, como es el caso de la CAT (Domínguez, 2008). Por su parte, el arsénico también induce la producción de ROS (Ahsan et al., 2008; Mallick et al., 2011) provocando el incremento de la actividad CAT (Mylona et al., 1998) junto con otras enzimas del sistema antioxidante, como es el caso de las implicadas en el sistema ascorbato-glutación, o activando la producción de glutatión, fitoquelatinas y antocianos (Finnegan y Chen, 2012). La exposición a Hg^{2+} fue el único caso que apenas provocó cambios en la actividad CAT de la microalga *C. onubensis*, observándose un aumento de un 20% a una concentración de 0,5 μM . La activación de la CAT por exposición a Hg^{2+} también ha sido indicada en hojas de tomate o en *Brassica juncea* (Srivastava et al., 2005; Shiyab et al., 2008), si bien en estos casos, las concentraciones de mercurio utilizadas fueron del orden de 40-75 μM .

Las Figuras 104 y 105 muestran, respectivamente, el efecto que la exposición a diferentes concentraciones de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) y As(V), en el medio de cultivo de *C. onubensis*, provocó sobre la actividad GR y APX.

La actividad GR (Figura 104) se vio más afectada por la exposición a Cu^{2+} , aunque en menor proporción que en el caso de la CAT, apreciándose un incremento de un 40% del nivel de actividad con Cu^{2+} 200 μM . El Cd^{2+} (100 μM) y el As(III) (200 μM) incrementaron la actividad un 20%. Por otro lado, y para esos tres metales, a partir de las concentraciones indicadas anteriormente, se observó una disminución del nivel de actividad GR de la microalga. No se observó efecto significativo por exposición a As(V) o Hg^{2+} , si bien en este último caso, y al igual que le ocurrió a la actividad CAT, se produjo una ligera inactivación de la GR para una concentración de 0,5 μM del metal.

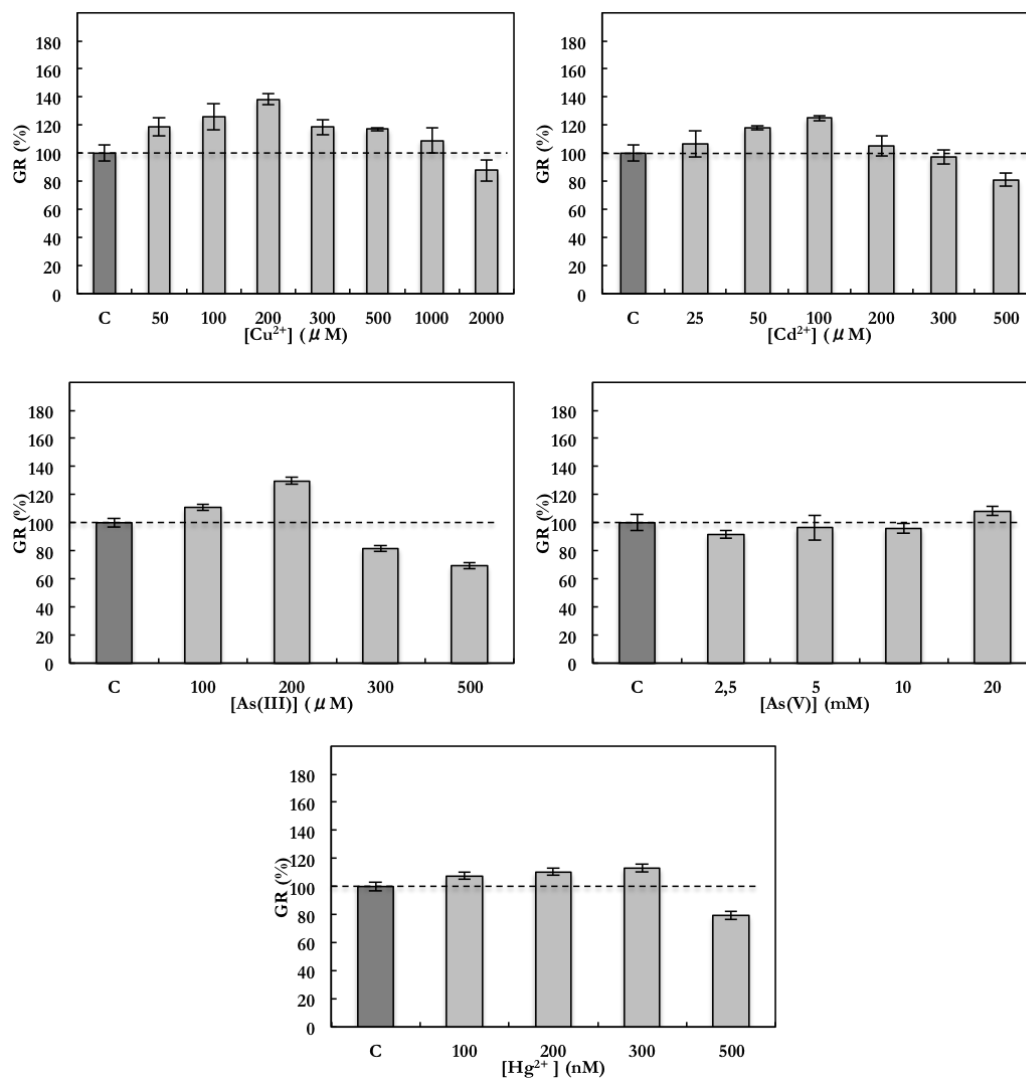


Figura 104. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad GR en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO₃, en ausencia (control) o presencia de Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, As(III) o As(V), a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad GR en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. 17,77 ± 2,04 U·mg⁻¹ corresponde al 100% de actividad GR.

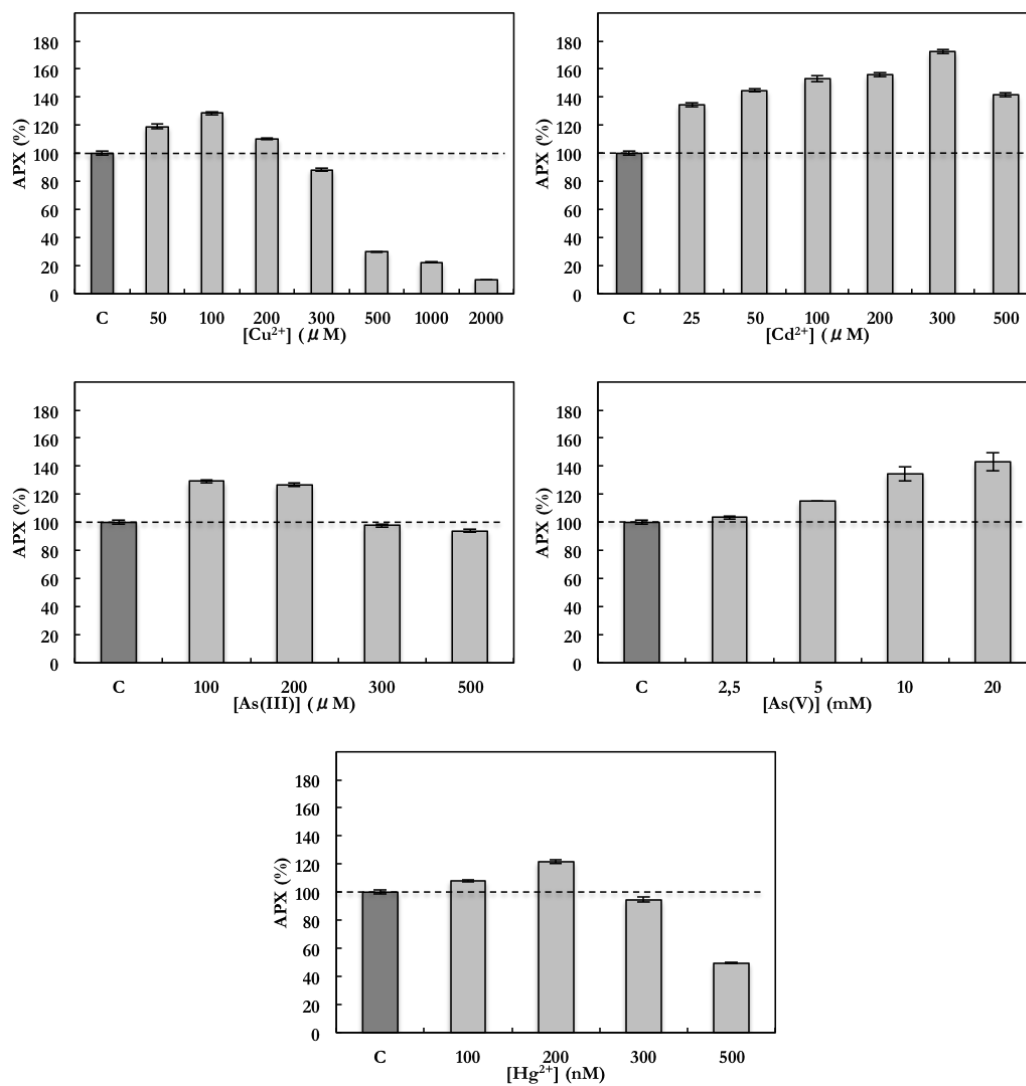


Figura 105. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre la actividad APX en el medio de cultivo de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO_3 , en ausencia (control) o presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As(III) o As(V) , a las concentraciones indicadas. Tras 8 días de crecimiento, se determinó la actividad APX en los correspondientes extractos crudos, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. $525,14 \pm 14,63 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ corresponde al 100% de actividad APX.

El incremento de nivel de actividad GR observado en la Figura 104, tras la exposición de *C. onubensis* a ciertos metales pesados y metaloides, es indicativo de las necesidades de GSH que se requieren bajo las condiciones de estrés metálico a las que se encuentra sometida la microalga, bien debido a la demanda del ciclo ascorbato-glutatión para la eliminación de H_2O_2 (Asada, 1997), o bien a la demanda requerida para la síntesis de fitoquelatinas, secuestradoras de metales pesados. La sobreexpresión por estrés metálico de las enzimas implicadas en la síntesis directa de glutatión (a partir de los aminoácidos que lo forman) y de fitoquelatinas, ha sido indicada previamente en *B. juncea* (Reisinger et al., 2008). De la misma manera, en numerosas plantas, la GR incrementa su nivel de actividad en presencia de Cd^{2+} , aunque el efecto varía dependiendo de la concentración del metal y del tiempo de exposición (Anjum et al., 2012; Gill et al., 2013), si bien en algunos casos, se ha indicado una ligera disminución de la actividad en presencia de Cd^{2+} , como en el caso de *Pisum sativum* (Dalurzo et al., 1997) o en la microalga eucariótica *C. reinhardtii* (Domínguez, 2008). En hojas de *Arabidopsis thaliana*, la actividad GR también se incrementa por exposición a Cu^{2+} 100 μM (Drazkiewicz et al., 2003), mientras que en plántulas de *Sesbania drummondii*, el Hg^{2+} incrementa la actividad GR a bajas concentraciones (0-40 μM), mientras que disminuye a partir de esa concentración.

En cuanto a la actividad APX de *C. onubensis*, como muestra la Figura 105, en comparación con la GR, destaca el incremento de actividad observado cuando las células se cultivaron en presencia de Cd^{2+} , llegando a ser del 70%, respecto al control, para una concentración de 300 μM del metal. A diferencia de lo ocurrido para la CAT y la GR, aunque a concentraciones bajas de Cu^{2+} se apreció un incremento de la actividad APX (máximo del 20%), a altas concentraciones se observó un fuerte descenso de la actividad, que llegó a ser del 70% para Cu^{2+} 500 μM , mostrándose más sensible que la CAT o la GR a la presencia de este metal, lo que parece indicar que en estos casos, la CAT estaría más implicada que la APX en la eliminación del H_2O_2 generado por altas concentraciones de Cu^{2+} en el medio de cultivo. El As(III) provocó un efecto sobre la APX similar al observado para la GR, con un incremento inicial de actividad, aunque no se apreció efecto inhibitorio a altas concentraciones, mientras que para As(V), la activación de la actividad APX observada fue más acusada.

El efecto observado sobre la actividad APX por exposición a Cd^{2+} es coincidente con los resultados obtenidos en *C. reinhardtii*, donde se observa una clara estimulación de la actividad APX a una concentración del metal de 300 μM (Domínguez, 2008). Por el contrario, el efecto observado en plantas es menos significativo, así, mientras que en guisantes no se aprecia efecto alguno, en café si se aprecia un incremento de la actividad APX, pero a bajas concentraciones de Cd^{2+} (Caverzan et al., 2012). Aunque el efecto provocado por Cu^{2+} sobre la actividad APX fue menor que en el caso del Cd^{2+} , la inducción de la actividad APX por Cu^{2+} también ha sido descrita en las microalgas *Dunaliella salina* y *Dunaliella tertiolecta* (Nikookar et al., 2005), y en plantas de café y *Festuca arundinacea* (Caverzan et al.,

2012), indicando también la contribución de este metal al incremento del estrés oxidativo generado en la microalga. La activación por arsénico de la APX también se ha descrito en la planta *F. arundinacea* (Lee et al., 2007), mientras que el Hg^{2+} , que no afectó de manera significativa a la actividad APX de *C. onubensis*, si se ha indicado la inducción de la enzima en plantas de arroz expuestas a Hg^{2+} (Chen et al., 2012).

III. Resultados y Discusión
**Capítulo 4: Estrés abiótico en el
crecimiento celular y capacidad
acumuladora de metales y metaloides en
*Coccomyxa onubensis***

4. Estrés abiótico en el crecimiento celular y capacidad acumuladora de metales y metaloides en *Coccomyxa onubensis*

En los capítulos anteriores se ha presentado el efecto que provocaban distintos metales y el arsénico sobre el consumo de nitrógeno en *C. onubensis* y sobre enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno y en el estrés oxidativo, desatando la capacidad de resistencia que posee la microalga. Otro aspecto destacado de los estudios realizados es que el grado de afectación de este tipo de estrés depende de la especie utilizada, de la concentración a la que se encuentre y del tiempo de exposición al mismo. A continuación, se presenta un estudio que muestra como estas condiciones de estrés afectan al crecimiento celular de *C. onubensis*. Previamente, y para tratar de correlacionar los resultados obtenidos, en la Tabla 28 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, recogiendo, de manera comparativa (a una concentración fija), el efecto provocado por el estrés al que se ha sometido la microalga.

Tabla 28. Tabla resumen del estrés abiótico sobre distintos aspectos de la microalga extremófila *C. onubensis*.

	Consumo		Enzimas Metabolismo Nitrógeno			Enzimas Antioxidantes		
	Nitrato	Amonio	NiR	GS	GDH	CAT	GR	APX
Cu²⁺	=	=	--	=	++	+++	++	--
Cd²⁺	=	-	--	-	++	++	+	++
As(III)	--	=	--	-	+	++	+	+
As(V)	=	=	-	=	=	++	=	+
Hg²⁺	--	-	-	-	++	=	+	+

Se muestran los resultados de los estudios realizados tomando como referencia una concentración de 200-300 μM de Cu^{2+} , Cd^{2+} y As(III) ; 20 mM de As(V) ; y 300 nM de Hg^{2+} , en el medio de cultivo de la microalga. Respecto al control, se indica: sin variación (=); incremento (+); descenso (-). La intensidad del efecto se muestra con una (leve), dos (notable), o tres (alta) repeticiones.

Además, y con vistas a comprobar su posible aplicación en procesos de fitorremediación, se mostrará un estudio de la capacidad acumuladora de metales de la microalga en función del factor de bioconcentración (BCF).

4.1. Efecto que produce diferentes metales y metaloides sobre el crecimiento de *C. onubensis*

La Figura 106 muestra el efecto que provocó la exposición a cobre, cadmio, mercurio o arsénico, sobre el crecimiento de *C. onubensis*, a pH ácido.

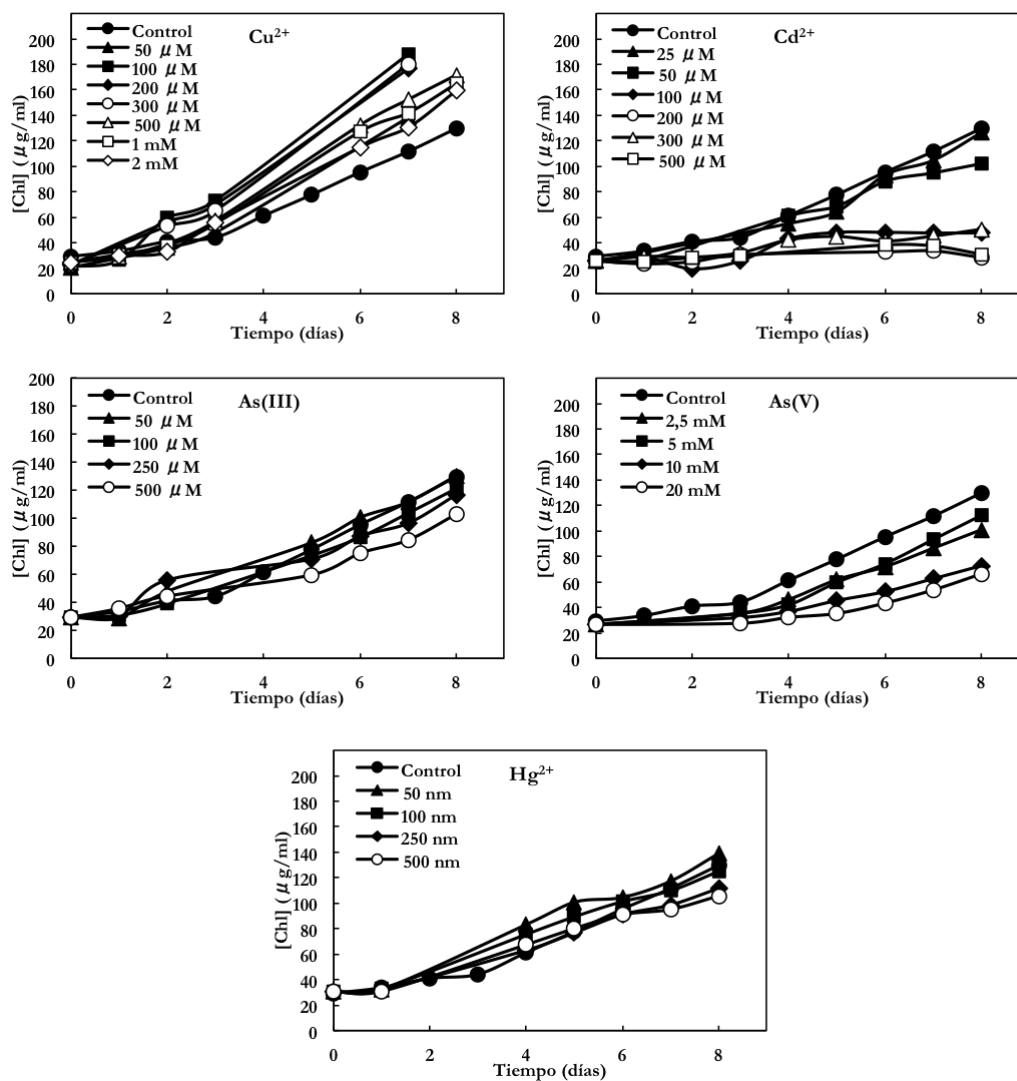


Figura 106. Efecto de la presencia de diferentes metales y metaloides sobre el crecimiento de *C. onubensis*. Las células se cultivaron en condiciones estándar con KNO₃, a pH ácido, en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, As(III) o As(V), añadidos a tiempo 0. Periódicamente, se determinó la concentración de clorofila según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

El cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento normal de la planta y el metabolismo, pero a concentraciones altas puede ser tóxico (Zhang et al., 2014). Esta toxicidad puede no verse reflejada en ciertos organismos, ya que han podido desarrollar tolerancia a dicho metal (Li et al., 2007a). Como muestra la Figura 106, la microalga *C. onubensis* se mostró resistente a la exposición a Cu^{2+} , ya que el crecimiento de la microalga, expuesta a las concentraciones indicadas del metal, no se vio afectado ni siquiera a altas concentraciones de Cu^{2+} (300 μM). Precisamente, esta concentración resultó ser muy tóxica para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Domínguez, 2008). Como refleja la Tabla 28, la exposición de *C. onubensis* a Cu^{2+} , aunque no bloqueó la asimilación de nitrato y de amonio, disminuyó parcialmente el nivel de actividad NiR, sin afectar significativamente a la GS; aumentó ligeramente la actividad GR; y considerablemente, las actividades GDH y CAT. De tal forma que, bajo estas condiciones de estrés, la GDH contribuiría a aportar el glutamato demandado, entre otros procesos, para la síntesis de glutatión y de las fitoquelatinas secuestradoras de metales, mientras que la CAT garantizaría la eliminación del H_2O_2 producido por estrés metálico, ya que el metal produjo una fuerte inactivación de la APX, contribuyendo de esta forma a que el crecimiento de la microalga (Figura 106) no se viera afectado. En cualquier caso, como se observa en la figura, la presencia de cobre en el medio de cultivo aumenta la velocidad de crecimiento de la microalga, por lo que se consideraría oportuno adicionar un exceso de cobre al medio de cultivo hasta una concentración máxima de 100 μM , ya que concentraciones superiores pueden afectar a procesos metabólicos, como se recoge en la Tabla 28.

En cuanto al Cd^{2+} , en la Figura 106 se puede apreciar que, mientras que a bajas concentraciones (25 y 50 μM) no se afectó la curva de crecimiento de la microalga, manteniendo un comportamiento similar al mostrado por el control, a concentraciones superiores del metal apareció una clara inhibición del crecimiento celular, mostrándose *C. onubensis* menos resistente a Cd^{2+} que a Cu^{2+} . La inhibición del crecimiento por cadmio también se ha indicado para la diatomea marina *Skeletonema costatum* (Nassiri et al., 1997) y la microalga *C. reinhardtii* (Mosulén et al., 2003; Domínguez, 2008). En plantas, una vez absorbido el Cd^{2+} , conduce a la inhibición del crecimiento e incluso lleva a provocar la muerte (Sanitá di Toppi y Gabbrielli, 1999; Hassan et al., 2005). Esta toxicidad se atribuye al deterioro de procesos fisiológicos como la reducción de los espacios intercelulares y el número de cloroplastos, así como el aumento del tamaño celular (Sandalio et al., 2001), la inhibición de la síntesis de clorofila y la fotosíntesis (Somashekaraiah et al., 1992; Pankovic et al., 2000), y los cambios del estado antioxidante (Stochs y Bagchi, 1995), poniendo de manifiesto la importancia de mantener un sistema antioxidante activo bajo estas condiciones de estrés. Aunque en *C. onubensis* (Tabla 28) el Cd^{2+} bloqueó parcialmente solo la asimilación de amonio, sí que afectó a la ruta asimilatoria de nitrógeno, disminuyendo los niveles de actividad de la NiR y la GS (especialmente la NiR), pudiendo afectar este hecho a la disminución del crecimiento de la microalga observado (Figura 106) a altas concentraciones del metal. No obstante, de nuevo, el

incremento de la actividad GDH garantizaría el aporte de glutamato, mientras que la CAT y la APX contribuirían a la eliminación del H_2O_2 producido por el estrés metálico.

Como se muestra en la Figura 106, el Hg^{2+} no presentó ningún efecto sobre el crecimiento celular de *C. onubensis* a ninguna de las concentraciones estudiadas. El Hg^{2+} es la forma más predominante y fácilmente absorbida por las plantas superiores y acuáticas (Yadav, 2010; Chen y Yang, 2012). Altos niveles de Hg^{2+} son muy tóxicos para las células vegetales, provocando inhibición del crecimiento (Patra y Sharma, 2000; Kumar et al., 2013) y bloqueando el transporte de iones esenciales (Azevedo y Rodriguez, 2012), lo que podría justificar la inhibición parcial del consumo de nitrógeno observada en *C. onubensis* (Tabla 28). Por otro lado, la sustitución del átomo central de clorofila, Mg^{2+} , por Hg^{2+} es un importante mecanismo de daño, ya que evita la recolección fotosintética de luz en las moléculas de clorofila, afectando de manera importante a la fotosíntesis (Küpper et al., 1996; Patra y Sharma, 2000). Al igual que ocurre con otros metales pesados, el Hg^{2+} es detoxificado en plantas por acción de las fitoquelatinas, así como de su precursor, el glutatión. En ambos casos, el Hg^{2+} puede formar enlaces a través de los grupos sulfhidrilos (Cobbett, 2000). Además, la exposición al metal provoca un aumento de la producción de ROS, afectando de esta forma al sistema antioxidante de la planta (Cargnelutti et al., 2006). Así, se ha observado en arroz, que el aumento de las ROS derivado de la exposición a Hg^{2+} está acompañado por un incremento de la actividad APX, especialmente en la raíz, mientras que se observa una disminución en los niveles de actividad CAT (Chen et al., 2012). Estos resultados son similares a los obtenidos en *C. onubensis*, así, a pesar de que el Hg^{2+} no afectó al crecimiento de la microalga (Figura 106), la exposición al metal (Tabla 28) provocó una activación de la GR y la APX, manteniendo, de esta forma, activo el sistema antioxidante, junto con la GDH, que como en los casos anteriores, participaría en la producción de glutamato demandado por la síntesis de glutatión y fitoquelatinas secuestradoras del metal.

En los estudios realizados con arsénico (Figura 106), la exposición a As(III) solo produjo un efecto significativo en el crecimiento de *C. onubensis* a la máxima concentración estudiada (500 μM). No obstante, el As(V) sí provocó una inhibición del crecimiento a medida que se fue aumentando la concentración del metaloide en el medio de cultivo, si bien hay que indicar que las concentraciones de As(V) estudiadas fueron muy superiores a las utilizadas con As(III). El arsénico es un metaloide tóxico que, en plantas, afecta al crecimiento de la raíz, al desarrollo de la propia planta, así como al rendimiento y producción de frutos (Garg y Singla, 2011). Su toxicidad depende tanto de la concentración, como de la formulación química a la que se encuentre el metaloide. Nuestros resultados, como se puede observar en la Figura 106 y la Tabla 28, ponen también de manifiesto este hecho diferenciador entre el arseniato y el arsenito. Como se ha indicado en capítulos anteriores, el As(V) es un análogo estructural del fosfato y utiliza los transportadores de fosfato para acceder tanto al interior celular como a los distintos orgánulos celulares, no obstante, este

hecho hace que el fosfato presente en el medio de cultivo compita con el As(V), dificultando su entrada y minimizando su toxicidad (Finnegan y Chen, 2012), lo que justificaría el hecho de que para los estudios realizados en *C. onubensis*, las concentraciones utilizadas para ver los efectos con As(V) sean muy superiores a las utilizadas con As(III). Además, ambas especies generan estrés oxidativo afectando a los sistemas antioxidantes, aumentando los niveles de glutatión reducido y fitoquelatinas, y activando las enzimas antioxidantes (Mallick et al., 2011), tal y como indican los resultados mostrados en la Tabla 28 para la microalga *C. onubensis*. También existen diferencias en cuanto a la forma de actuar de ambas especies, así, el As(V) se intercambia con el fosfato en algunos procesos metabólicos. Se ha descrito en plantas expuestas a arseniato la presencia de especies tales como glucosa-6-As(V) y el ADP-As(V), que afectaría a procesos claves e importantes en el metabolismo energético celular (Finnegan y Chen, 2012), por lo que el arseniato, a altas concentraciones, podría afectar al crecimiento celular, como muestra la Figura 106. Por su parte, el As(III) está más implicado en la interacción con grupos tiólicos de metabolitos y proteínas, por lo que puede producir inhibiciones enzimáticas, de tal manera que, por un lado, el organismo actuaría aumentando la síntesis de glutatión y fitoquelatinas para poder secuestrarlo y acumularlo en las vacuolas, y por otro, la activación del sistema antioxidante lucharía contra las ROS producidas por la exposición al metal (Song et al., 2010). Nuestros resultados son coincidentes con estos hechos, pues como muestra la Tabla 28, aunque la exposición de *C. onubensis* a As(III) disminuye el consumo de nitrógeno y los niveles de actividad NiR y GS, aumenta los de la GDH (productora de glutamato) y los de la CAT, GR y APX (activando el sistema antioxidante). Por otro lado, la inhibición del transporte de nitrógeno y la disminución de la actividad de la nitrato reductasa, NiR y GS, también se han indicado en plantas expuestas a arsénico (Ahsan et al., 2008; Norton et al., 2008; Chakrabarty et al., 2009).

4.2. Capacidad acumuladora de *C. onubensis* sobre diferentes metales y metaloide

La descarga de metales pesados en efluentes ha aumentado junto con la industrialización (Abdel-Raouf et al., 2012; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012), de ahí que sea esencial su eliminación, ya que son conocidos por su toxicidad (Srivastava y Majumder, 2008). En condiciones apropiadas, las microalgas poseen una capacidad depuradora conocida como fitorremediación (Rawat et al., 2011; Prajapati et al., 2013), definida como el uso de macroalgas y/o microalgas para la eliminación o biotransformación de contaminantes desde medios líquidos (aguas residuales) y gaseosos (Infante et al., 2012; Maity et al., 2014).

Con vista a su posible papel fitorremediador, se ha estudiado la capacidad bioacumuladora de *C. onubensis* cuando se expone a Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} o arsénico. Los resultados del estudio se presentan en la Tabla 29, donde se muestra la concentración

(en ppm en peso seco) del metal o metaloide en el interior celular de *C. onubensis*. Además, también se recoge la determinación del denominado factor de bioconcentración (BCF) (Soeprbowati y Hariyati, 2014), que permite comparar con otros organismos la capacidad acumuladora. Dicho factor se calculó según la ecuación:

$$\text{BCF} = \frac{C_{\text{organismo}}}{C_{\text{medio}}}$$

donde:

- $C_{\text{organismo}}$: concentración de metales pesados en el organismo.
- C_{medio} : concentración de metales pesados en el medio de cultivo.

Tabla 29. Acumulación de metales y metaloide en el interior celular de *C. onubensis*, y factor de bioconcentración (BCF).

Condiciones	Acumulación (ppm en peso seco)	BCF
Cultivo Control		
+ Cu ²⁺	< LD	-
+ Cd ²⁺	< LD	-
+ Zn ²⁺	21,4 ± 2,3	1,63
+ As(V)	< LD	-
Cultivo Cu²⁺	106,7 ± 5,4	8,39
Cultivo Cd²⁺	202,4 ± 6,1	9,00
Cultivo Zn²⁺	54,4 ± 5,4	4,15
Cultivo As(V)	1076,8 ± 19,5	1437,27
Cultivo Mezcla		
+ Cu ²⁺	109,9 ± 8,4	8,65
+ Cd ²⁺	186,2 ± 9,0	8,28
+ Zn ²⁺	62,2 ± 5,4	4,75

Los cultivos celulares de *C. onubensis* se mantuvieron en condiciones estándar de crecimiento, a pH ácido, en presencia de Cd²⁺, Cu²⁺ o/y Zn²⁺ (200 µM); o de As(V) 10 mM. Después de 15 días de crecimiento, las células se recogieron, se lavaron y se determinó la acumulación del metal o metaloide según se describe en Materiales y Métodos. < LD indica por debajo del límite de detección.

En la tabla se observa como para Cu²⁺ y Cd²⁺ el BCF obtenido fue muy similar entre ellos, siendo de 8,39 y 9,00, respectivamente. De entre todas las especies estudiadas, el Zn²⁺ es el que arrojó un menor valor del BCF, si bien habría que señalar que parte del Zn²⁺ acumulado procedía del propio medio de cultivo, como

muestra el dato control. *C. onubensis* mostró la mayor capacidad acumuladora por arseniato, obteniéndose un valor del BCF de 1437,27, destacando de esta forma la posible aplicación de la microalga en procesos de fitorremediación de arsénico. Además, cuando la microalga se expuso a la presencia conjunta de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} , la acumulación observada fue similar a la de los cultivos por separados, sin que se viese afectada la viabilidad celular.

En comparación con otras microalgas (Chmielewská y Medved, 2001; Ellison et al., 2014), *C. onubensis* muestra valores del BCF inferiores para Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , aunque esto no ocurre en el caso del arsénico ya que, a pesar de que se han obtenido valores altos del BCF para otras microalgas expuestas a arsénico (Ellison et al., 2014), el valor del BCF para el metaloide en *C. onubensis* fue muy superior. Las plantas suelen tener una capacidad acumuladora de metales algo menor que las microalgas y, aunque en algunos casos el BCF fue inferior al obtenido para *C. onubensis* (Nazir et al., 2011; Busuioc et al., 2012; Hamidiam et al., 2013; Manavi, 2013), en otros, como *Padina* sp. o *Laurencia papillosa* (Manavi, 2013), se obtuvo un valor del BCF respecto al Cd^{2+} 3 veces superior al mostrado por *C. onubensis*.

Un aspecto importante que influye en la toxicidad de los metales es el pH del medio en el que se encuentren las microalgas, así, se ha demostrado que *C. reinhardtii* presenta un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento por Cd^{2+} a pH básico que a pH ácido (Domínguez, 2008). Aparentemente, el pH afecta a la conformación de las proteínas de membrana pudiendo afectar a los transportadores, de forma que a medida que disminuye el pH del medio, también disminuye el flujo del metal al interior celular habiéndose indicado que los H^+ se comportan como un inhibidor no competitivo con respecto al metal divalente (François et al., 2007). En *C. reinhardtii* se ha indicado la presencia de un transportador para metales divalentes llamado DMT1. Se trata de una proteína de 513 aminoácidos con 11 dominios transmembranales que presenta una amplia especificidad para Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} , pero no transporta el Zn^{2+} (Rosakis y Köster, 2005). Al igual que el Cd^{2+} , la toxicidad por Cu^{2+} también disminuye a medida que lo hace el pH, como se ha indicado en *Chlorella* sp., donde los efectos provocados por el metal disminuyen junto con el pH en un intervalo entre 8 y 5,5 (Wilde et al., 2006). Este efecto provocado por el pH del medio podría justificar los menores valores del BCF para Cu^{2+} y Cd^{2+} obtenidos en *C. onubensis* en relación a otras microalgas. En cualquier caso, la peculiaridad de *C. onubensis* radica en que se trata de un organismo extremófilo cuyo potencial en fitorremediación estaría indicado en efluentes con altos contenidos de metales, y especialmente de arsénico, que además tengan un pH muy ácido, ambiente en el que otros organismos no podrían vivir.

Por otro lado, teniendo en cuenta que en plantas expuestas a arsénico se han localizado distintos estados de oxidación y formas del metaloide, entre ellas arseniato y arsenito libre, o formas metiladas como monometil-As o dimetil-As (III y V) (Finnegan y Chen, 2012), se realizó un estudio de especiación de arsénico en células de *C. onubensis* expuestas a As(V). Así, tras mantener las microalgas en presencia del

metaloide durante 15 días de crecimiento (a pH 2,5), las células se recogieron y lavaron con medio de cultivo sin arsénico, y se procedió al estudio de especiación, tal y como se describe en el apartado 8.4 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la mayoría del arsénico medido en la microalga (86%) se encontró en forma de As(V), y solo un 14% apareció como As(III), sin que se detectaran rastros de las formas metiladas del metaloide. Estos resultados contrastan con los obtenidos en plantas, donde, tras la exposición a As(V), el arsénico se acumula mayoritariamente (en un 90%) en forma de As(III) (Pickering et al., 2000; Dhankher et al., 2002; Xu et al., 2007). La reducción de As(V) a As(III) puede realizarse químicamente por interacción con glutatión reducido (Delnomdedieu et al., 1994), o de una forma más rápida, enzimáticamente vía arseniato reductasa, actividad identificada en plantas hipertolerantes de As(V) (Bleeker et al., 2006), *Arabidopsis* y arroz (Ellis et al., 2006; Duan et al., 2007), lo que justificaría la reducción parcial de As(V) a As(III) observada en *C. onubensis*, aunque este proceso reductivo en la microalga se muestra mucho menos activo que en plantas.

IV. Conclusiones

Conclusiones

Consumo de nitrógeno

1. La microalga acidófila *C. onubensis* muestra una mayor afinidad por amonio que por nitrato. El pH del medio no afecta a la velocidad de consumo de ambas fuentes nitrogenadas. El consumo de nitrato provoca una alcalinización del medio de cultivo en células de *C. onubensis* inoculadas a pH 2,5, mientras que el consumo de amonio acidifica el medio de cultivo cuando *C. onubensis* se inocula a pH 7. Cuando ambas fuentes están combinadas, como nitrato amónico, a pH 2,5 la microalga comienza a consumir NO_3^- una vez desaparecido el NH_4^+ del medio de cultivo; mientras que a pH 7, la microalga consume ambas fuentes simultáneamente.
2. El consumo de nitrato, por *C. onubensis*, se muestra más sensible que el de amonio a la presencia de cobre, mercurio, arsenito o arseniato, en el medio de cultivo; mientras que el cadmio afecta más al consumo de NH_4^+ . No obstante, el consumo de nitrógeno, por parte de la microalga, se muestra tolerante a este tipo de estrés, ya que, para observar efectos significativos sobre el consumo, es necesario superar concentraciones de 500 μM para cobre y cadmio, de 500 nM para mercurio, de 300 μM para arsenito, y de 20 mM para arseniato.

Caracterizaciones enzimáticas

3. La microalga *C. onubensis* muestra actividad nitrato reductasa con especificidad por ferredoxina o metil viológeno, con valores de K_m de 7,2 μM y 16,9 mM, respectivamente. La K_m para nitrato es de 1,9 mM. El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 7,5, una temperatura óptima de 45 °C. Tanto el cianuro como el cadmio se muestran como potentes inhibidores de la actividad NiR. En base al ensayo de actividad en geles nativos de poliacrilamida, se ha detectado una única banda con actividad NiR con un peso molecular aparente de 75 kDa.
4. La actividad transferasa de la glutamina sintetasa, medida en extractos crudos de *C. onubensis*, posee valores de K_m de 19,3 mM para glutamina, de 2,0 mM para hidroxilamina, de 0,6 μM para ADP y de 59,7 μM para manganeso. El ensayo requiere un pH óptimo de 6, una temperatura óptima de 40. La actividad GS se activa en presencia de DTT y el MSO la inhibe. Los cationes divalentes Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe Hg y Zn muestran un efecto inhibitor sobre la actividad GS. El Mg^{2+} , a pesar de que no inhibe la actividad, no es capaz de sustituir al Mn^{2+} en el ensayo de actividad. Se ha detectado una única banda de actividad GS en gel, con un peso molecular aparente de 440 kDa.

IV. Conclusiones

5. La actividad glutamato deshidrogenasa de *C. onubensis*, medida en extractos crudos, posee valores de K_m para 2-oxoglutarato, amonio y NADH de 1,1 mM, 29,0 mM y 54,2 μ M, respectivamente (actividad aminante); y de 1,1 mM para glutamato y 0,8 mM para NAD^+ (actividad desaminante). Ambos procesos poseen un rango óptimo de pH entre 9 y 11,5. La actividad aminante posee una temperatura óptima de 60 °C y la desaminante de 50 °C, presentando ambos procesos dos valores de energías de activación. La enzima muestra una gran estabilidad térmica hasta 40 °C. Se ha detectado la presencia de una única banda de actividad GDH en geles nativos con un peso molecular aparente de 285 kDa.
6. La actividad catalasa de *C. onubensis*, medida en extractos crudos, posee un pH óptimo de 12,5, una temperatura óptima de 60 °C, determinándose dos valores de energías de activación. La K_m para H_2O_2 es 17,1 mM. La actividad es estable entre -20 y 40 °C. El Mn^{2+} se muestra como inhibidor no competitivo de la enzima, y la actividad es muy sensible a la presencia de cianuro y azida. Se ha detectado en geles nativos, dos bandas con actividad CAT, una de ellas mayoritaria de 122 kDa, y la otra minoritaria de 94 kDa.
7. La actividad glutatión reductasa, medida en extractos crudos de *C. onubensis*, posee valores de K_m para glutatión oxidado y NADPH de 59,7 y 22,2 μ M, respectivamente. El proceso catalítico requiere un pH óptimo de 7,5, una temperatura óptima de 60 °C, y se han determinado dos energías de activación. La GR presenta inhibición de tipo competitiva por Mn^{2+} . Por primera vez se ha descrito la utilización de metil viológeno como donador electrónico de la enzima mediante un ensayo de actividad en un gel nativo de poli(acrilamida), donde se ha detectado la presencia de una única banda con actividad GR de 65 kDa.
8. La actividad ascorbato peroxidasa en extractos crudos de *C. onubensis* posee un valor de K_m para ascorbato de 37,0 μ M. La actividad presenta una cinética sigmoidal respecto al H_2O_2 , con un valor de $S_{0,5}$ de 1,2 mM y un índice de Hill de 2,3. El proceso requiere un pH óptimo de 7, una temperatura óptima de 50 °C, determinándose dos valores de energías de activación. La actividad presenta una fuerte inactivación por cianuro y azida. El Mn^{2+} se muestra como un potente inhibidor acompetitivo de la APX y el DTT modula negativamente la actividad. El ensayo de actividad en gel muestra la presencia de varias bandas con actividad APX, consecuente con la posible existencia de varias isoenzimas.
9. La purificación parcial de la ascorbato peroxidasa de *C. onubensis* ha permitido identificar dos posibles isoenzimas. La APX1 posee menos afinidad por ascorbato que la APX2, mostrando un valor de K_m de 73,2 μ M y 34,9 μ M, respectivamente. Respecto al H_2O_2 , la APX1 muestra un comportamiento alostérico con un valor de $S_{0,5}$ de 0,9 mM (y un índice de Hill de 2,0), y la APX2 sigue una cinética de Michaelis-Menten con un valor de K_m de 8,2 mM. El

ensayo de actividad en gel muestra, para la isoforma APX1, una única banda de actividad de 48 kDa; mientras que para la APX2 aparecen dos bandas con actividad, una más intensa de 62 kDa (posible dímero) y otra menos intensa de 30 kDa (posible monómero).

Estrés abiótico

10. A pesar de que *C. onubensis* se muestra muy tolerante al cobre, siendo importante su aporte durante el crecimiento celular, la exposición de la microalga a altas concentraciones del metal, o de Cd, Hg o As, afecta al metabolismo del nitrógeno. Así, disminuye los niveles de actividad de la NiR y la GS, e incrementa la actividad GDH. De esta forma la GDH garantiza el aporte de glutamato requerido, entre otros procesos, para la síntesis de glutatión y fitoquelatinas, ambos necesarios para minimizar este tipo de estrés.
11. La exposición de *C. onubensis* a la presencia de Cu, Cd, Hg o As, provoca también estrés oxidativo, incrementando, en general, los niveles de actividad de la GR, de la APX, y especialmente de la CAT. Por lo que la microalga presenta un sistema antioxidante activo, capaz de eliminar el H₂O₂ generado en estas condiciones de estrés, que, en general, le permite resistir las condiciones ambientales en las que vive.
12. La microalga *C. onubensis* muestra una alta capacidad acumuladora por arseniato, presentado un BCF de 1437,27, frente a un valor de 8,39 para Cu²⁺, de 9,00 para Cd²⁺ y de 3,12 para Zn²⁺, poniendo de manifiesto su importante papel en procesos de fitorremediación de arsénico. Además, la mayoría del arsénico acumulado en la microalga (el 86%) se encuentra en forma de As(V), y solo un 14% aparece como As(III), sin que se detecten formas metiladas del metaloide.

V. Bibliografía

A

- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM** (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**: 257-275.
- Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA** (2002). Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant physiology*, **128**: 1120-1128.
- Aguilera A, Souza-Egipsy V, Gómez F, Amils R** (2007). Development and structure of eukaryotic in an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology*, **53**: 294-305.
- Ahmad I, Hellebust J** (1986). Pathways of ammonium assimilation in the soil alga *Stichococcus bacillaris* Naeg. *New Phytologist*, **103**: 57-68.
- Ahmad I, Larher F, Mann AF, McNally SF, Stewart GR** (1982). Nitrogen metabolism of halophytes. 4. Characteristics of glutamine synthetase from *Triglochin maritima* L. *The New Phytologist*, **91**: 585-595.
- Ahsan N, Lee DG, Alam I, Kim PJ, Lee JJ, Ahn YO, Kwak SS, Lee IJ, Bahk JD, Kang KY, Renaut J, Komatsu S, Lee BH** (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561-3576.
- Al-Attar AF, Martin MH, Nickless G** (1988). Uptake and toxicity of cadmium, mercury and thallium. *Chemosphere*, **17**: 1219-1225.
- Amako K, Chen GX, Asada K** (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, **35**: 497-504.
- Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Theroux SM, Palacios C, Aguilera A, Amils R** (2011). Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *The ISME Journal*, **5**: 42-50.
- Amils R, González-Toril E, Fernández-Remolar D, Gómez F, Aguilera A, Rodríguez N, Malki M, García-Moyano A, Fairen AG, de la Fuente V, Sanz JL** (2007). Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Río Tinto case. *Planetary and Space Science*, **55**: 370-381.
- Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M, Prasad MNV** (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids – A review. *Environmental and Experimental Botany*, **75**: 307-324.
- Arias DG, Márquez VE, Beccaria AJ, Guerrero SA, Iglesias AA** (2010). Purification and characterization of a glutathione reductase from *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, **161**: 91-101.

V. Bibliografia

- Arizmendi JM, Serra JL** (1990). Purification and some properties of the nitrite reductase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1040**: 237-244.
- Arora A, Sairam RK, Srisvastava GC** (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**: 1227-1238.
- Asada K** (1984). Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology*, **105**: 422-429.
- Asada K** (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, 715-735. doi: 10.1101/087969502.34.715.
- Astolfi S, Zuchi S, Passera C** (2004). Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, **161**: 795-802.
- Azevedo R, Rodriguez E** (2012). Phytotoxicity of mercury in plants: a review. *Journal of Botany*, 6 pages. doi: 10.1155/2012/848614.

B

- Bakar LA, Amin NM, Zakeri HA** (2015). Impact of mercury (II) nitrate on physiological and biochemical characteristics of selected marine algae of different classes. *Procedia Environmental Sciences*, **30**: 222-227.
- Baker AC, Dopson M** (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Microbiology*, **15**: 165-171.
- Baker AJM** (1978). Ecophysiological aspects of zinc tolerance in *Silene maritima* with. *New Phytologist*, **80**: 635-642.
- Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML** (2006). Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant and Soil*, **284**: 187-194.
- Balestrasse KB, Gardey L, Gallego SM, Tomaro ML** (2001). Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Functional Plant Biology*, **28**: 497-504.
- Beardall J, Entwisle L** (1984). Internal pH of the obligate acidophile *Cyanidium caldarium* Geitler (Rhodophyta?). *Phycologia*, **23**: 397-399.
- Beauford W, Barber J, Barringer AR** (1977). Uptake and distribution of mercury within higher plants. *Physiologia Plantarum*, **39**: 261-265.

- Beaumont F, Jouve HM, Gagnon J, Gaillard J, Pelmont J** (1990). Purification and properties of a catalase from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Science*, **72**: 19-26.
- Becker K, Gui M, Schirmer RH** (1995). Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *European Journal of Biochemistry*, **234**: 472-478.
- Ben-Amotz A, Gressel M, Avron M** (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* prevents recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology*, **23**: 176-181.
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML** (2005). Cadmium toxicity in plants. *Toxic Metals in Plants*, **17**: 21-34.
- Berlett BS, Stadtman ER** (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**: 20313-20316.
- Betti M** (2005). Enzimología de formas silvestres y mutantes de glutamina sintetasa eucariotas sobreexpresadas en *Escherichia coli*. 211 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Bielawski W, Joy KW** (1986). Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of pea. *Phytochemistry*, **25**: 2261-2265.
- Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Blik M, Souer E, Schat H** (2006). Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelation accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal*, **45**: 917-929.
- Bleeker PM, Schat H, Vooijs R, Verkleij JAC, Ernst WHO** (2003). Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*. *New Phytologist*, **157**: 33-38.
- Bohne F, Linden H** (2002). Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, **1579**: 26-34.
- Borowitzka MA** (1988). Vitamins and fine chemicals. En: Borowitzka MA y Borowitzka LJ (eds). *Micro-algal Biotechnology*. pp 153-196. Cambridge University Press. Cambridge.
- Boussama N, Ouariti O, Suzuki A, Ghorbal H** (1999). Cd-stress on nitrogen assimilation. *Journal of Plant Physiology*, **155**: 310-317.
- Bradford MM** (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Briviba K, Klotz LO, Sies H** (1997). Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological Chemistry*, **378**: 1259-1265.

V. Bibliografia

- Brookes A, Collins JC, Thurman DA** (1981). The mechanism of zinc tolerance in grasses. *Journal of Plant Nutrition*, **3**: 695-705.
- Brown CM** (1980). Ammonia assimilation and utilization in bacteria and fungi. En: Payne JW (ed). *Microorganisms and nitrogen sources*. pp 511-535. New York.
- Brown MR, Jeffrey SW, Wolkman JK, Dunstan GA** (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151**: 315-331.
- Brown MR, Mular M, Miller I, Farmer C, Trenerry C** (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, **11**: 247-255.
- Brun A, Chalot M, Botton B, Martin F** (1992). Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology*, **99**: 938-944.
- Bulen WA** (1956). The isolation and characterization of glutamic dehydrogenase from corn leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **62**: 173-183.
- Busuioc G, David I, Mihaela S, Iliescu N** (2012). Evaluation of capacity for bioaccumulation of some heavy metals in three aquatic plants species. En: Gâtescu P, Lewis Jr. W y Bretcan P (eds.). pp 220-223. *Water Resources and Wetlands*. Conference Proceedings. Tulcea, Romania.

C

- Cakmak T, Angun P, Demiray YE, Ozkan AD, Elibol Z, Tekinay T** (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**: 1947-1957.
- Cao W, Tibbitts TW** (1994). Responses of potatoes to solution pH levels with different forms of nitrogen. *Journal of Plant Nutrition*, **17**: 109-126.
- Cargnelutti D, Tabaldi LA, Spanevello RM, Jucoski GO, Battisti V, Redin M, Linares CEB, Dressler VL, Flores EMM, Nicoloso FT, Morsch VM, Schetinger MRC** (2006). Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, **65**: 999-1006.
- Casano LM, Gómez LD, Lascano HR, González CA, Trippi VS** (1997). Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, **38**: 433-440.
- Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro MM** (2012). Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, **35**: 1011-1019.

- Cawse PA** (1967). The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, **92**: 311-315.
- Chaffei C, Pageau K, Suzuki A, Gouia H, Ghorbel MH, Masclaux-Daubresse C** (2004). Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and Cell Physiology*, **45**: 1681-1693.
- Chakrabarty D, Trivedi PK, Misra P, Tiwari M, Shri M, Shukla D, Kumar S, Rai A, Pandey A, Nigam D, Tripathi RD, Tuli R** (2009). Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, **74**: 688-702.
- Chen GX, Asada K** (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology*, **30**: 987-998.
- Chen J, Kennedy IR** (1985). Purification and properties of lupin nodule glutamine synthetase. *Phytochemistry*, **24**: 2167-2172.
- Chen J, Yang ZM** (2012). Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *BioMetals*, **25**: 847-857.
- Chen YA, Chi WC, Huang TL, Lin CY, Nguyeh TTQ, Hsiung YC, Chia LC, Huang HJ** (2012). Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **55**: 23-32.
- Chien HF, Lin CC, Wang JW, Chen CT, Kao CH** (2002). Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. *Plant Growth Regulation*, **36**: 41-47.
- Chmielewská E, Medved J** (2001). Bioaccumulation of heavy metals by green algae *Cladophora glomerata* in a refinery sewage lagoon. *Croatica Chemica Acta*, **74**: 135-145.
- Cho UH, Park JO** (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, **156**: 1-9.
- Christenson ES** (1983). Effect of copper on cell division, nitrogen metabolism, morphology, and sexual reproduction in the life cycle of *Closterium moniliferum* (chlorophyceae). 150 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Portland State.
- Chugh LK, Gupta VK, Sawhney SK** (1992). Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry*, **31**: 395-400.
- Chunilall V, Kindness A, Jonnalagadda B** (2004). Heavy metal uptake by spinach leaves grown on contaminated soils with lead, mercury, cadmium, and nickel. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, **39**: 473-481.

V. Bibliografía

- Clarkson DT, Hanson JB** (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **31**: 239-298.
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**: 159-182.
- Cobbett CS** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, **123**: 825-832.
- Couto N, Wood J, Barber J** (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 48 pages. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
- Coutteau P** (1996). Micro-algae. En: Lavens P y Sorgeloos P (eds). *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. pp 7-48. University of Ghent. Ghent, Belgium.
- Czapski G** (1984). Reaction of ^-OH . *Methods in Enzymology*, **105**: 209-215.

D

- Dalton DA, Del Castillo LD, Kahn ML, Joyner SL, Chatfield JM** (1996). Heterologous expression and characterization of soybean cytosolic ascorbate peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **328**: 1-8.
- Dalurzo HC, Sandalio LM, Gómez M, Del Río LA** (1997). Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton*, **37**: 59-64.
- Das P, Samantaray S, Rout GR** (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, **98**: 29-36.
- De Leonardis S, Dipierro N, Dipierro S** (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**: 773-779.
- De Roeck-Holtzhauer T, Quere I, Calire C** (1991). Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. *Journal of Applied Phycology*, **3**: 259-264.
- Delnomdedieu M, Basti MM, Otvos JD, Thomas DJ** (1994). Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chemico-Biological Interactions*, **90**: 139-155.
- Devriese M, Tsakaloudi V, Garbayo I, León R, Vílchez C, Vígara J** (2001). Effect of heavy metal on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 443-448.

- Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA, Meaguer RB** (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology*, **20**: 1140-1145.
- Díaz-Vivancos P, De Simone A, Kiddle G, Foyer CH** (2015). Glutathione-linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **89**: 1154-1164.
- Dietz KJ, Baier M, Krämer U** (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. En: Prasad MNV y Hagemeyer J (eds). *Heavy Metal Stress in Plant: from Molecules to Ecosystems*. pp 73-97. Berlín.
- Dinçer A, Aydemir T** (2001). Purification and characterization of catalase from chard (*Beta vulgaris* var. *cicla*). *Journal of Enzyme Inhibition*, **16**: 165-175.
- Ding Y, Miao JL, Wang QF, Zheng Z, Li GY, Jian JC, Wu ZH** (2007). Purification and characterization of a psychrophilic glutathione reductase from Antarctic ice microalgae *Chlamydomonas* sp. Strain ICE-L. *Polar Biology*, **31**: 23-30.
- Dixon M, Webb EC** (1958). *Enzymes*. En: Longmans, Green y Co. (eds). London and Academic Press, New, York.
- Domínguez MJ** (2008). Estrés abiótico en *Chlamydomonas reinhardtii*: toxicidad y mecanismos de defensa. 137 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.
- Domínguez MJ, Gutiérrez F, León R, Vilchez C, Vega JM, Vígara J** (2003). Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 828-832.
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z** (2003). Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, **164**: 195-202.
- Du X, Zhu YG, Liu WJ, Zhao XS** (2005). Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake. *Environmental and Experimental Botany*, **54**: 1-7.
- Duan GL, Zhou Y, Tong YP, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Zhu YG** (2007). A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytologist*, **174**: 311-321.
- Dudler N, Miller DJ** (1988). Characterization of two glutamate dehydrogenases from the symbiotic microalga *Symbiodinium microadriaticum* isolated from the coral *Acropora formosa*. *Marine Biology*, **97**: 427-430.
- Duncanson E, Gilkes AF, Kirk DW, Sherman A, Wray JL** (1993). *nir-1*, a conditional-lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. *Molecular and General Genetics*, **236**: 275-282.

E

Ebbs S, Lau I, Ahner B, Kochian L (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta*, **214**: 635-640.

Edreva A (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **106**: 119-133.

Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GMU, Rotstein SH (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**: 122-145.

El Alaoui S, Diez J, Toribio F, Gómez-Baena G, Dufresne A, García-Fernández JM (2003). Glutamine synthetase from the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* spp.: characterization, phylogeny and response to nutrient limitation. *Environmental Microbiology*, **5**: 412-423.

Elbaz A, Wei YY, Meng Q, Zheng Q, Yang ZM (2010). Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology*, **19**: 1285-1293.

Elliot WH (1955). Glutamine synthesis: Glutamic Acid + ATP + Ammonia → Glutamine + ADP + Phosphate. *Methods in Enzymology*, **2**: 337-342.

Ellis DR, Gumaelius L, Indriolo E, Pickering IJ, Banks JA, Salt DE (2006). A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiology*, **141**: 1544-1554.

Ellison MB, Nys R, Paul NA, Roberts DA (2014). Growth and metal bioconcentration by conspecific freshwater macroalgae cultured in industrial waste water. *PeerJ*, 1-17. doi: 10.7717/peerj.401.

Elstner EF, Wagner GA, Schutz W (1988). Activated oxygen in Green plants in relation to stress situations. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, **7**: 159-187.

Engel N, Schmidt M, Lütz C, Feierabend J (2006). Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 593-607.

Esteban E, Carpena RO, Meharg AA (2003). High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist*, **158**: 165-173.

F

- Fábregas J, Herrero C** (1990). Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *Journal of Industrial Microbiology*, **5**: 259-263.
- Fábregas J, Herrero C, Cabezas B, Abalde J** (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* kyllin (butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, **49**: 231-244.
- Fábregas J, Morales E, Arán J, Otero A** (1998). Germinated *Solanum tuberosum*: an agricultural product for marine microalgae culture. *Bioresource Technology*, **66**: 19-24.
- Falk J, Munné-Bosch S** (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 1549-1566.
- Feierabend J** (2005). Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. En: Smirnoff N (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. pp 101-140. University of Exeter. UK.
- Fernandes JC, Henriques FS** (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, **57**: 246-273.
- Fernández E, Galván A** (2008). Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. *Eukaryotic Cell*, **7**: 555-559.
- Fernández E, Galván A, Quesada A** (1998). Nitrogen assimilation and its regulation. En: Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M y Merchant (eds). *The Molecular Biology of Chloroplast and Mitochondria in Chlamydomonas*. pp 637-659. Netherlands.
- Fernández-Remolar D, Gómez-Elvira J, Gómez F, Sebastián E, Martín J, Manfredi JA, Torres J, González Kesler C, Amils R** (2004). The Tinto River, an extreme acidic environment under control of iron, as an analog of the *Terra Meridiani* hematite site of Mars. *Planetary and Space Science*, **52**: 239-248.
- Finnegan PM, Chen W** (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, **3**: 1-18 (Artículo 182).
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH** (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 22369-22376.
- Florencio FJ, Vega JM** (1982). Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*, **21**: 1195-1200.
- Florencio FJ, Vega JM** (1983). Regulation of the synthesis of the NAD(P)H-nitrate reductase complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **111**: 223-232.

V. Bibliografía

- Fontaine JX, Tercé-Laforgue T, Bouton S, Pageau K, Lea PJ, Dubois F, Hirel B** (2013). Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior*, **8**: e23329.
- Forde BG, Cullimore JV** (1989). The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, **6**: 247-296.
- Forján E, Vilchez C, Vega JM** (2014). Microalgas extremófilas. En: CEPESA y Autores (eds). *Biotecnología de Microalgas*. pp 223-227. Huelva, España.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunnert KJ** (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, **92**: 696-717.
- Foyer CH, Noctor G** (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, **17**: 1866-1875.
- François L, Fortin C, Campbell PGC** (2007). pH modulates transport rates of manganese and cadmium in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* through non-competitive interactions: implications for an algal BLM. *Aquatic Toxicology*, **84**: 123-132.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Plant Biology*, **9**: 436-442.

G

- Gadapati WR, Macfie SM** (2006). Phytochelatins are only partially correlated with Cd-stress in two species of *Brassica*. *Plant Science*, **170**: 471-480.
- Gao S, Yan R, Cao M, Yang W, Wang S, Chen F** (2008). Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant Soil and Environment*, **54**: 117-122.
- Garbayo I, León R, Vígara J, Vilchez C** (2002). Inhibition of nitrate consumption by nitrite in entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Bioresource Technology*, **81**: 207-215.
- García EM, Reyes RE** (2001). Synthesis pattern of an Hg-binding protein in *Acetabularia calyculus* during short-term exposure to mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**: 357-364.
- García I, Dorronsoro C** (2005). Contaminación por metales pesados. En: Tecnología de Suelos. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola. <http://edafologia.urg.es>.

- García-Fernández JM, López-Ruiz A, Alhama J, Roldán JM, Dapena JD** (1995). Effect of glutamine on glutamine-synthetase regulation in the green alga *Monoraphidium braunii*. *Planta*, **195**: 434-439.
- García-Fernández JM, López-Ruiz A, Humanes L, Dapena JD** (1997). Purification and characterization of glutamine synthetase from the green alga *Monoraphidium braunii*. *Plant Science*, **123**: 77-84.
- Gardner PR, Fridovich I** (1991). Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 1478-1483.
- Garg N, Singla P** (2011). Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistry Letters*, **9**: 303-321.
- Gaur JP, Rai LC** (2001). Heavy metal tolerance in algae. Algal adaptation to environmental stresses. En: Rai LC y Gaur JP (eds). *Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. pp 363-388. Berlín, Heidelberg, New York.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N** (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, **70**: 204-212.
- Gill SS, Tuteja N** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909-930.
- González-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, Amils R** (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *American Society for Microbiology*, **69**: 4853-4865.
- Gouia H, Ghorbal MH, Meyer C** (2000). Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**: 629-638.
- Greenbaum P, Prodouz KN, Garrett RH** (1978). Preparation and some properties of homogeneous *Neurospora crassa* assimilatory NADPH-nitrite reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **526**: 52-64.
- Gresser MJ** (1981). ASD-Arsenate. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**: 5981-5983.
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH** (1985). Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, **230**: 674-676.
- Gross W** (2000). Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia*, **433**: 31-37.
- Grossman A** (2000). Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist*, **151**: 201-224.
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX** (2011). Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, **27**: 597-613.

V. Bibliografía

Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, **32**: 169-204.

Gupta DK, Huang HG, Yang XE, Razafindrabe BHN, Inouhe M (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. *Journal of Hazardous Materials*, **177**: 437-444.

H

Hageman RH (1992). Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. En: Dinauer RC, Ernst S y Buxton DR (eds.). *Nitrogen in Crop Production*. pp 67-85. Madison, Wisconsin, USA.

Hallberg KB, Johnson DB (2001). Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Advances in Applied Microbiology*, **49**: 37-84.

Halliwell B (1987). Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44**: 327-340.

Halliwell B (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, **31**: 261-272.

Halliwell B (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141**: 312-322.

Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33**: 601-617.

Hamidian AH, Zareh M, Poorbagher H, Vaziri L, Ashrafi S (2013). Heavy metal bioaccumulation in sediment, common reed, algae, and blood worm from the Shoor river, Iran. *Toxicology and Industrial Health*, **32**: 1-12.

Harder W, Dijkhuizen L (1983). Physiological responses to nutrient limitation. *Annual Review of Microbiology*, **37**: 1-23.

Hariyadi P, Parkin KL (1993). Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. *Cahypso*) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **141**: 733-738.

Hassan MJ, Wang F, Ali S, Zhang G (2005). Toxic effect of cadmium on rice as affected by nitrogen fertilizer form. *Plant and Soil*, **277**: 359-365.

Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*, **23**: 853-862.

Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Río LA (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science*, **105**: 151-167.

- Hernández LE, Gárate A, Carpena-Ruiz R** (1997). Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant and Soil*, **189**: 97-106.
- Hernández-Pérez A, Labbé JI** (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Biología Marina y Oceanografía*, **49**: 157-173.
- Hirasawa M, Tripathy JN, Sommer F, Somasundaram R, Chung JS, Nestander M, Kruthiventi M, Zabet-Moghaddam M, Johnson MK, Merchant SS, Allen JP, Knaff DB** (2010). Enzymatic properties of the ferredoxin-dependent nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for hydroxylamine as a late intermediate in ammonia production. *Photosynthesis Research*, **103**: 67-77.
- Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K** (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**: 593-599.
- Hirel B, McNally SF, Gadal P, Sumar N, Stewart GR** (1984). Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. A comparative immunological study. *European Journal of Biochemistry*, **138**: 63-66.
- Ho CH, Ikawa T, Nisizawa K** (1976). Purification and properties of a nitrite reductase from *Porphyra yezoensis* Ueda. *Plant and Cell Physiology*, **17**: 417-430.
- Hochman A, Nissany A, Azimur M** (1988). Nitrate reduction and assimilation by moderately halophilic, halotolerant bacterium Ba₁. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **965**: 82-89.
- Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK** (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, 11 pages. doi: 10.1155/2010/391632.
- Howe G, Merchant S** (1992). Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **98**: 127-136.
- Howitt SM, Udvardi MK** (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**: 152-170.
- Hsu YT, Kuo MC, Kao CH** (2006). Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant and Soil*, **287**: 267-277.
- Hu Q** (2004). Environmental effects on cell composition. En: Richmond A (ed). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. pp 83-94. UK.
- Hu S, Lau KWK, Wu M** (2001). Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, **161**: 987-996.
- Hudson RC, Daniel RM** (1993). L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **106**: 767-792.

V. Bibliografía

Hung SH, Yu CW, Lin CH (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **46**: 1-10.

I

Ida S, Mikami B (1986). Spinach ferredoxin-nitrite reductase: a purification procedure and characterization of chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, **871**: 167-176.

Ida S, Morita Y (1971). Studies on respiratory enzymes in rice kernel. Part VII. Purification of an acidic flavoprotein, glutathione reductase, from rice embryos. *Agricultural and Biological Chemistry*, **35**: 1542-1549.

Ide T, Tamura G (1987). Isolation and partial characterization of homogeneous nitrite reductase from a red alga, *Porphyra yezoensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**: 3391-3393.

Imlay JA (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, **77**: 755-776.

Infante C, Angulo E, Zárata A, Florez JZ, Barrios F, Zapata C (2012). Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, **3**: 159-164.

Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S (1996). Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Science*, **120**: 11-18.

Itagaki T, Dry IB, Wiskich JT (1988). Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria. *Phytochemistry*, **27**: 3373-3378.

J

Jackson RH, Cornish-Bowden A, Cole JA (1981). Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochemical Journal*, **193**: 861-867.

Jha AB, Dubey RS (2004). Arsenic exposure alters activity behaviour of key nitrogen assimilatory enzymes in growing rice plants. *Plant Growth Regulation*, **43**: 259-268.

- Jiang F, Mannervik B** (1999). Optimized heterologous expression of glutathione reductase from cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 and characterization of the recombinant protein. *Protein Expression and Purification*, **15**: 92-98.
- Johnson DB** (2010). The biogeochemistry of biomining. En: Barton L, Mandl M y Loy A (eds). *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. pp 401-426. Dordrecht, Germany.
- Johnson DB, Hallberg KB** (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, **154**: 466-473.
- Joshi R, Pareek A, Singla-Pareek SL** (2015). Plant metallothioneins: classification, distribution, function, and regulation. En: Ahmad P (ed.). *Plant Metal Interaction. Emerging Remediation Techniques*. pp 239-262. Department of Botany. SP College. Srinagar, India.
- Jouili H, El Ferjani E** (2004). Effect of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, **26**: 29-35.

K

- Kandukuri SS, Noor A, Ranjini SS, Vijayalakshmi MA** (2012). Purification and characterization of catalase from sprouted black gram (*Vigna mungo*) seeds. *Journal of Chromatography B*, **889-890**: 50-54.
- Kaplan D, Heimer YM, Abeliovich A, Goldsbrough PB** (1995). Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Science*, **109**: 129-137.
- Kaplan D, Richmond AE, Dubinsky Z, Aaronson S** (1986). Algal nutrition. En: Richmond A (ed). *Handbook for Microalgal Mass Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. pp 147-199. CRC Press, Boca Raton.
- Kashyap AK, Gupta SL** (1982). Effect of lethal copper concentrations on nitrate uptake, reduction and nitrite release in *Anacystis nidulans*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **107**: 289-294.
- Kato J, Yamahara T, Tanaka K, Takio S, Satoh T** (1997). Characterization of catalase from Green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology*, **151**: 262-268.
- Khan I, Ahmad A, Iqbal M** (2009). Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 626-634.

V. Bibliografía

Kleinhofs A, Warner RL (1990). Advances in nitrate assimilation. En: Mifflin BJ y Lea PD (eds). *The Biochemistry of Plants*. pp 89-120. Academic Press. San Diego, EEUU.

Kneer R, Zenk MH (1992). Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, **31**: 2663-2667.

Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, Kaise T, Usuda H, Tsuzuki M (2003). Insertional mutagenesis in a homologue of a Pi transporter gene confers arsenate resistance on *Chlamydomonas*. *Plant and Cell Physiology*, **44**: 597-606.

Kobayashi I, Fujiwara S, Shimogawara K, Sakuma C, Shida Y, Kaise T, Usuda H, Tsuzuki M (2005). High intracellular phosphorus contents exhibit a correlation with arsenate resistance in *Chlamydomonas* mutants. *Plant and Cell Physiology*, **46**: 489-496.

Kommareddy A, Anderson G (2003). Study of light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR). The Society for Engineering in Agricultural, Food and Biological Systems. Paper Number: 034057. An ASAE Meeting Presentation. Las Vegas, Nevada, USA.

Krapp A (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, **25**: 115-122.

Kristjánsson JK, Hreggvidsson GO (1995). Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**: 17-25.

Kuk YI, Shin JS, Burgos NR, Hwang TE, Han O, Cho BH, Jung S, Guh JO (2003). Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science Society of America*, **43**: 2109-2117.

Kumar B, Smita K, Flores LC (2013). Plant mediated detoxification of mercury and lead. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-8. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.08.010.

Kumar RG, Dubey RS (1999). Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. *Journal of Plant Physiology*, **155**: 118-121.

Küpper H, Küpper F, Spiller M (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, **47**: 259-266.

L

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM** (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 569-593.
- Lamotte F, Vianey-Liaud N, Duviau MP, Kobrehel K** (2000). Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 4978-4983.
- Lawlor DW** (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 773-787.
- Le Faucheur S, Behra R, Sigg L** (2005). Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**: 1731-1737.
- Le Quéré C, Raupach MR, Canadell JG, Marland G, Bopp L, Ciais P, Conway TJ, Doney SC, Feely RA, Foster P, Friedlingstein P, Gurney K, Houghton RA, House JI, Huntingford C, Levy PE, Lomas MR, Majkut J, Metz N, Ometto JP, Peters GP, Prentice IC, Randerson JT, Running SW, Sarmiento JL, Schuster U, Sitch S, Takahashi T, Viovy N, van der Werf GR, Woodward FI** (2009). Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geoscience*, **2**: 831-836.
- Lea PJ, Mifflin BJ** (2003). Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 555-564.
- Lee SH, Ahsan N, Lee KW, Kim DH, Lee DG, Kwak SS, Kwon SY, Kim TH, Lee BH** (2007). Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1626-1638.
- Leistel JM, Marcoux E, Thiéblemont D, Quesada C, Sánchez A, Almodóvar GR, Pascual E, Sáez R** (1998). The volcanic-hosted massive sulphide deposits of the Iberian Pyrite Belt. *Mineralium Deposita*, **33**: 2-30.
- Li HB, Qin YM, Pang Y, Song WQ, Mei WQ, Zhu YX** (2007b). A cotton ascorbate peroxidase is involved in hydrogen peroxide homeostasis during fibre cell development. *New Phytologist*, **175**: 462-471.
- Li M, Xiong Z, Dai L, Huang Y** (2007a). Effects of copper on nitrogen assimilation in copper-tolerant and non-tolerant populations of *Elsoltzia haichowensis* S. *Water Air Soil Pollut*, **184**: 323-333.
- Liaw SH, Eisenberg D** (1994). Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry*, **33**: 675-681.

V. Bibliografía

- Liu J, Xiong Z, Li T, Huang H** (2004). Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. *Environmental and Experimental Botany*, **52**: 43-51.
- López-Archilla AI** (2005). Riotinto: un universo de mundos microbianos. *Ecosistemas*, **14**: 52-65.
- López-Archilla AI, Marín I, Amils R** (1993). Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Río Tinto, Spain. *Geomicrobiology Journal*, **11**: 223-233.
- Losada M, Guerrero MG** (1979). The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. En: Barber J (ed.). *Topics in Photosynthesis, Volume 3*. pp 365-408. Amsterdam, Holanda.
- Loulakakis CA, Roubelakis-Angelakis KA** (1990). Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: purification and characterization of the major leaf isoenzyme. *Journal of Experimental Botany*, **41**: 1223-1230.

M

- Madamanchi NR, Anderson JV, Alscher RG, Cramer CL, Andhess JL** (1992). Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone-fumigated pea leaves. *Plant Physiology*, **100**: 138-145.
- Maity JP, Bundschuh J, Chen CY, Bhattacharya P** (2014). Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: present and future perspectives – A mini review. *Energy*, **78**: 104-113.
- Malanga G, Calmanovici G, Puntarulo S** (1997). Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, **101**: 455-462.
- Maldonado JM** (1993). Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: Azcon J y Talon M (eds.). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. pp 287-303. Madrid, España.
- Mallick N** (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, **15**: 377-390.
- Mallick N, Mohn FH** (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, **157**: 183-193.

- Mallick N, Rai LC** (1999). Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to copper. *Journal of Plant Physiology*, **155**: 146-149.
- Mallick S, Sinam G, Sinha S** (2011). Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of *Zea mays* L.: differential detoxification mechanism and effect on nutrients status. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**: 1316-1324.
- Manavi PN** (2013). Heavy metals in water, sediment and macrobenthos in the intertidal zone of hormozgan province, Iran. *Marine Science*, **3**: 39-47.
- Mandelman D, Schwarz FP, Li H, Poulos TL** (1998). The role of quaternary interactions on the stability and activity of ascorbate peroxidase. *Protein Science*, **7**: 2089-2098.
- Mano J** (2002). Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: Inzé D, Van Montagu M (eds). *Oxidative Stress in Plants. Induction Mechanisms Ofoxidative Stress*. pp 217-246. London, UK.
- Mao QQ, Guan MY, Lu KX, Du ST, Fan SK, Ye YQ, Lin XY, Jin CW** (2014). Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **166**: 934-944.
- Marker AFH** (1972). The use of acetone and metanol in the estimation of chlorophyll in presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, **2**: 361-385.
- Márquez AJ, Cánovas FM** (2004). Absorción y asimilación de amonio. En: Monza J y Márquez A (eds). *El Metabolismo del Nitrógeno en las Plantas*. pp 65-93. Córdoba, España.
- Márquez AJ, Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Romero JM, Arcondéguy T, Betti M, García-Calderón M, Estivill G, Pal'ove-Balang P** (2004). Nitrogen assimilation in roots of the model legume *Lotus japonicus*. *Biología*, **13**: 69-76.
- Marschener H** (1995). Functions of mineral nutrients: macronutrients. En: Marschener H (ed.). *Mineral Nutrition of Higher Plants, Part I: Nutritional Physiology*. pp 229-312. Academic Press. London.
- Martínez L** (2008). Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. 213 pp. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Martínez-Espinosa RM, Esclapez J, Bautista V, Bonete MJ** (2006). An octameric prokaryotic glutamine synthetase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *FEMS Microbiology Letters*, **264**: 110-116.
- Martins D, English AN** (2014). Catalase activity stimulated by H₂O₂ in rich culture médium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology*, **2**: 308-313.

V. Bibliografía

- Mataix-Verdú J, Rodríguez J, Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M, López M** (2001). Aceite de oliva y estado oxidativo celular. En: Mataix-Verdú J (ed). *Aceite de Oliva Virgen: Nuestro Patrimonio Alimentario*. pp 37-78. Universidad de Granada.
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E** (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*, **127**: 129-137.
- McNally S, Hirel B, Gadal P, Fred-Mann A, Stewart GR** (1983). Glutamine synthetase of higher plants. *Plant Physiology*, **72**: 22-25.
- Medyantseva EP, Vertlib MG, Budnikov GK** (1998). Metal ions as enzyme effectors. *Russian Chemical Reviews*, **67**: 225-232.
- Meharg AA, Macnair MR** (1992). Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany*, **43**: 519-524.
- Méndez JM, Vega JM** (1981). Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Physiologia Plantarum*, **52**: 7-14.
- Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R** (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Englena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1706**: 88-97.
- Mendoza-Cózatl DG, Rodríguez-Zavala JS, Rodríguez-Enríquez S, Mendoza-Hernandez G, Briones-Gallardo R, Moreno-Sánchez R** (2006). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Englena gracilis*. *The FEBS Journal*, **273**: 5703-5713.
- Meredith MJ, Gronostajski RM, Schmidt RR** (1978). Physical and kinetic properties of the nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase purified from *Chlorella sorokiniana*. *Plant Physiology*, **61**: 967-974.
- Mérida A, Leurentop L, Candau P, Florencio FJ** (1990). Purification and properties of glutamine synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. Strain PCC 7601. *Journal of Bacteriology*, **172**: 4732-4735.
- Messerli MA, Amaral-Zettler LA, Zettler E, Jung SK, Smith PJS, Sogin ML** (2005). Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *The Journal of Experimental Biology*, **208**: 2569-2579.
- Meucci V, Laschi S, Minunni M, Pretti C, Intorre L, Soldani G, Mascini M** (2009). An optimized digestion method coupled to electrochemical sensor for the determination of Cd, Cu, Pb and Hg in fish by square wave anodic stripping voltammetry. *Talanta*, **77**: 1143-1148.
- Milledge JJ** (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **10**: 31-41.

- Mishra S, Shrivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV** (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 25-37.
- Mittler R** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, **7**: 405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Plant Science*, **9**: 490-498.
- Mittler R, Zilinskas BA** (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology*, **97**: 962-968.
- Mittler R, Zilinskas BA** (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, **212**: 540-546.
- Miyake C, Cao WH, Asada K** (1993). Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **34**: 881-889.
- Mobin M** (2013). Effects of cadmium-induced oxidative stress on growth and nitrogen assimilation in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Journal of Agricultural Sciences*, **58**: 31-39.
- Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H, Mench M** (1996). Copper toxicity maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant and Soil*, **182**: 287-300.
- Mohammad M** (2013). Effects of cadmium-induced oxidative stress on growth and nitrogen assimilation in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Journal of Agricultural Sciences*, **58**: 31-39.
- Molina-Grima E, Fernández-Sevilla JM, Sánchez-Pérez JA, García-Camacho F** (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, **45**: 59-69.
- Monza J, Márquez AJ** (2004). El metabolismo del nitrógeno en las plantas. En: Cuesta-López AE (ed). *Colección Agricultura y Ganadería Almuzara*. Córdoba, España.
- Moore SA, Moennich DMC, Gresser MJ** (1983). Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**: 6266-6271.
- Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Trejo P** (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, **194**: 346-352.

V. Bibliografía

- Morelli E, Scarano G** (2001). Synthesis and stability of phytochelatins induced by cadmium and lead in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environmental Research*, **52**: 383-395.
- Moroney JV, Somanchi A** (1999). How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiology*, **119**: 9-16.
- Morozkina EV, Slutszkaya ES, Fedorova TV, Tugay TL, Golubeva LI, Koroleva OV** (2010). Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46**: 1-14.
- Mosulén S, Domínguez MJ, Vigara J, Vílchez C, Guiraum A, Vega JM** (2003). Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular Engineering*, **20**: 199-203.
- Moyano E, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J** (1992). Purification and properties of three NAD(P)⁺ isozymes of L-glutamate dehydrogenase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1119**: 63-68.
- Moyano E, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J** (1995). Involvement of NAD(P)⁺-glutamate dehydrogenase isoenzymes in carbon and nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*, **94**: 553-559.
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**: 31-57.
- Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG** (1998). Modulation of antioxidant responses by arsenic in maize. *Free Radical Biology and Medicine*, **25**: 576-585.

N

- Nagel K, Adelmeier U, Voigt J** (1996). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology*, **149**: 86-90.
- Nassiri Y, Mansot JL, Wéry J, Ginsburger-Vogel T, Amiard JC** (1997). Ultrastructural and electron energy loss spectroscopy studies of sequestration mechanisms of Cd and Cu in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **33**: 147-155.
- Nazir A, Malik RN, Ajaib M, Khan N, Siddiqui MF** (2011). Hyperaccumulators of heavy metals of industrial areas of Islamabad and Rawalpindi. *Pakistan Journal of Botany*, **43**: 1925-1933.
- Niazi A, Momeni-Isfahani T, Ahmari Z** (2009). Spectrophotometric determination of mercury in water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-114. *Journal of Hazardous Materials*, **165**: 1200-1203.

- Niemietz CM, Tyerman SD** (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Letters*, **465**: 110-114.
- Nikookar K, Moradshahi A, Hosseini L** (2005). Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomolecular Engineering*, **22**: 141-146.
- Nishikawa K, Onodera A, Tominaga N** (2006). Phytochelatins do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere*, **63**: 1553-1559.
- Nordstrom DK** (2011). Mine waters: acidic to circumneutral. *Elements*, **7**: 393-398.
- Nordstrom DK, Alpers CN** (1999). Geochemistry of acid mine waters. En: Plumlee GS y Logsdon MJ (eds.). *The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits*. pp 133-160. Rev. Econ. Geol. V6A, Soc. Econ. Geol. Inc., Littleton, CO.
- Norton GJ, Lou-Hing DE, Meharg AA, Price AH** (2008). Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 2267-2276.

O

- Oaks A** (1994). Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Canadian Journal of Botany*, **72**: 739-750.
- O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R** (1996). Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*, **198**: 371-377.
- Olías M, Nieto JM, Miguel A, Ruiz C** (2010). La contaminación minera de los ríos Tinto y Odiel. Informe de marzo de 2010. Junta de Andalucía. Universidad de Huelva.
- Olmo-Mira MF, Cabello P, Pino C, Martínez-Luque M, Richardson DJ, Castillo F, Roldán MD, Moreno-Vivián C** (2006). Expression and characterization of the assimilatory NADH-nitrite reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Archives of Microbiology*, **186**: 339-344.
- Opdenakker K, Remans T, Keunen E, Vangronsveld J, Cuypers A** (2012). Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany*, **83**: 53-61.

P

- Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hodges M** (2008). Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochemical Journal*, **410**: 621-629.
- Pankovic D, Plesnicar M, Arsenijevic-Maksimovic I, Petrovic N, Sakac Z, Kastori R** (2000). Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Annals of Botany*, **86**: 841-847.
- Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN** (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, **102**: 35-42.
- Patel TS, Patel HJ, Patel JG, Sinha A, Sen DJ** (2016). Prosthetic groups as non polypeptide biocatalyst essential for biochemical chemistry. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, **3**: 385-391.
- Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A** (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **52**: 199-223.
- Patra M, Sharma A** (2000). Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review*, **66**: 379-422.
- Pawlik-Skowronska B** (2001). Phytochelatin production in freshwater algae *Stigeoclonium* in response to heavy metals contained in mining water; effects of some environmental factors. *Aquatic Toxicology*, **52**: 241-249.
- Peeters KMW, Vanlaere AJ** (1992). Ammonium and amino acids metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum*, **84**: 243-249.
- Perales-Vela HV, Peña-Castro JM, Cañizares-Villanueva RO** (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, **64**: 1-10.
- Perl-Treves R, Perl A** (2002). Oxidative stress: an introduction. En: Inzé D y Van Montagu M (eds). *Oxidative Stress in Plants*. pp 1-32. London, UK.
- Peterson HG, Healey FP, Wagemann R** (1984). Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**: 974-979.
- Pickering IJ, Gumaelius L, Harris HH, Prince RC, Hirsch G, Banks JA, Salt DE, George GN** (2006). Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environmental Science and Technology*, **40**: 5010-5014.

Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiology*, **122**: 1171-1177.

Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006). Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 256-263.

Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Zambrzycka E, Godlewska-Zylkiewicz B (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, **52**: 52-65.

Prajapati SK, Kaushik P, Malik A, Vijay VK (2013). Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, **31**: 1408-1425.

Q

Quaghebeur M, Rengel Z (2003). The distribution of arsenate and arsenite in shoots and roots of *Holcus lanatus* is influenced by arsenic tolerance and arsenate and phosphate supply. *Plant Physiology*, **132**: 1600-1609.

Quintana M, Curutchet G, Donati E (2001). Factors affecting the chromium (VI) reduction by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Engineering Journal*, **9**: 11-15.

R

Raab A, Williams PN, Meharg A, Feldmann J (2007). Uptake and translocation of inorganic and methylated arsenic species by plants. *Environmental Chemistry*, **4**: 197-203.

Rachim MA, Nicholas DJD (1985). Glutamine synthetase and glutamate synthase from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytochemistry*, **24**: 2541-2548.

Rachlin JW, Grosso A (1991). The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **20**: 505-508.

Rao S, Subramanyam C, Venkateswerlu G (1984). Nitrogen metabolism in the blue mycelia of *Neurospora crassa* isolated from copper toxic cultures. *Current Microbiology*, **10**: 79-84.

Rausser WE (1995). Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiology*, **109**: 1141-1149.

V. Bibliografía

- Rausser WE, Curvetto NR** (1980). Metallothionein occurs in roots of *Agrostis* tolerant to excess copper. *Nature*, **287**: 563-564.
- Raven JA, Geider RJ** (1988). Temperature and algal growth. *New Phytologist*, **110**: 441-461.
- Raven PH** (1992). Nutrición de las plantas y suelo. En: Raven PH, Evert RF y Eichhom SE (eds.). *Biología de las Plantas*. pp 517-540. University of Wisconsin. Madison.
- Rawat I, Kumar RR, Bux MF** (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, **88**: 3411-3424.
- Reddy GN, Prasad MNV** (1990). Heavy metal-binding proteins/peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Environmental and Experimental Botany*, **30**: 251-264.
- Reese RN, Wagner GJ** (1987). Properties of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cadmium-binding peptide(s). *Biochemical Journal*, **241**: 641-647.
- Reisinger S, Schiavon M, Terry N, Pilon-Smits EAH** (2008). Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). Expressing bacterial γ -glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. *International Journal of Phytoremediation*, **10**: 1-15.
- Rendón JL, Calcagno M, Mendoza-Hernández G, Ondarza RN** (1986). Purification, properties, and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **248**: 215-223.
- Richardson DJ** (2001). Introduction: nitrate reduction and the nitrogen cycle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 163-164.
- Richardson DJ, Watmough NJ** (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Chemical Biology*, **3**: 207-219.
- Rideal EK, Roberts R** (1951). The photochemistry of native proteins. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **205**: 391-408.
- Ritchie AIM** (1994). Rates of mechanisms that govern pollutant generation from pyritic wastes. En: Alpers CN y Blowes DW (eds.). *Environmental Geochemistry of Sulfide Oxidation*. pp 108-122. American Chemical Society, Washington DC (Symposium Series 550).
- Rivas J, Guerrero MG, Paneque A, Losada M** (1973). Characterization of the nitrate-reducing system of the yeast *Torulopsis nitratophila*. *Plant Science Letters*, **1**: 105-113.

- Robinson SA, Stewart GR, Phillips R** (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiology*, **98**: 1190-1195.
- Romero LC, Galván F, Vega JM** (1987). Purification and properties of the siroheme-containing ferredoxin-nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **914**: 55-63.
- Rosakis A, Köster W** (2005). Divalent metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is mediated by a protein similar to prokaryotic Nramp homologues. *BioMetals*, **18**: 107-120.
- Rosen BP** (2002). Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **133**: 689-693.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL** (2001). Life in extreme environments. *Nature*, **409**: 1092-1101.
- Ruiz JL, Ferrer J, Camacho M, Bonete MJ** (1998). NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8: purification and enzymatic properties. *FEMS Microbiology Letters*, **159**: 15-20.
- Ruiz-Domínguez** (2013). Evaluación del enriquecimiento en lípidos de valor energético en microalgas. 252 pp. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.

S

- Salt DE, Rauser WE** (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*, **107**: 1293-1301.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, Del Río LA** (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 2115-2126.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R** (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**: 105-130.
- Satyanarayana KG, Mariano AB, Vargas JVC** (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*, **35**: 291-311.
- Sawada E, Satoh T, Kitamura H** (1978). Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium. *Plant and Cell Physiology*, **19**: 1339-1351.

V. Bibliografia

- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM** (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 2381-2392.
- Sengupta S, Shaila MS, Rao GR** (1996). Purification and characterization of assimilatory nitrite reductase from *Candida utilis*. *Biochemical Journal*, **317**: 147-155.
- Serrano A, Llobell A** (1993). Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, **190**: 199-205.
- Serrano A, Rivas J, Losada M** (1984). Purification and properties of glutathione reductase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 7119. *Journal of Bacteriology*, **158**: 317-324.
- Shahid M, Pourrut B, Dumat C, Nadeem M, Aslam M, Pineli E** (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. En: Whitacre DM (ed). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Volume 232*. pp 1-44. Switzerland.
- Shao N, Beck CF, Lemaire SD, Krieger-Liszkay AK** (2008). Photosynthetic electron flow affects H₂O₂ signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, **228**: 1055-1066.
- Shapiro BM, Stadtman ER** (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology*, **17**: 910-922.
- Shatilov VR, Kretovich WL** (1977). Glutamate dehydrogenases from *Chlorella*: forms, regulation and properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **15**: 201-212.
- Sheguineau C, Laschi-Loquerie A, Moal J, Samain JF** (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. *Aquaculture International*, **4**: 315-324.
- Sheptovitsky YG, Brudvig GW** (1996). Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry*, **35**: 16255-16263.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1305-1319.
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S** (1980a). Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochemical Journal*, **186**: 377-380.
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S** (1980b). Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* z. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **201**: 121-127.

- Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S** (1987). Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Englena gracilis* z. *Biochemical Journal*, **242**: 511-515.
- Shiyab S, Chen J, Han FX, Monts DL, Matta FB, Gu M, Su Y, Masad MA** (2008). Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Environmental Toxicology*, **24**: 462-471.
- Shrivastava S, Shrivastava A, Sharma J** (2015). Detoxification mechanisms of mercury toxicity in plants: a review. *Recent Advances in Biology and Medicine*, **1**: 60-68.
- Shuler M, Kargi F** (2002). Bioprocess engineering: basic concepts. En: Shuler M y Kargi F (eds). Upper Saddle River, USA.
- Siedleska A** (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **64**: 265-272.
- Sies H** (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemi*, **25**: 1058-1071.
- Sies H** (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, **69**: 965-968.
- Sies H** (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **299**: 183-191.
- Silverman MP, Lundgren DG** (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, **77**: 642-647.
- Singh BK, Sharma SR, Singh B** (2010). Antioxidant enzymes in cabbage: variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*, **124**: 9-13.
- Slater TF** (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*, **222**: 1-15.
- Smith EL, Austen BM, Blumenthal KM, Nyc JF** (1975). Glutamate dehydrogenase. En: Boyer PD (ed). *The enzymes*. pp 293-367. Academic Press. New York.
- Snell FD, Snell CT** (1949). Colorimetric method of analysis. pp 804. Van Nostrand. New York.
- Soeprbowati TR, Hariyati R** (2014). Phycoremediation of Pb, Cd, Cu, and Cr by *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*, **1**: 37-40.
- Solorzano L** (1969). Determination of ammonia in natural water by phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, **14**: 799-801.

V. Bibliografia

- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK** (1992). Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum*, **85**: 85-89.
- Song WY, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, Schroeder JI, Lee Y, Martinoia E** (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters. *PNAS*, **107**: 21187-21192.
- Spalding MH** (2009). CO₂-concentrating mechanism and carbon assimilation. En: Stern D y Harris E (eds). *The Chlamydomonas Sourcebook, Volume 2: Organellar and Metabolic Processes*. pp 257-301. Elsevier Publishers. Amsterdam.
- Srivastava KN, Majumder CB** (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, **151**: 1-8.
- Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S** (2005). Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1335-1342.
- Stadtman ER, Levine RL** (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*, **25**: 207-218.
- Stewart GR, Mann AF, Fentem PA** (1980). Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. En: Mifflin BJ (ed). *The Biochemistry of Plants*. pp 271-327. Academic Press. New York.
- Stohs SJ, Bagchi D** (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**: 321-336.
- Stokes PM** (1979). Copper accumulations in freshwater biota. En: Nriagu JO (ed.). *Copper in the Environment, Part I: Ecological Cycling*. pp 357-381. New York.
- Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Marcotrigiano GO** (2002). Total and methylmercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **44**: 1354-1358.
- Sueoka N, Chiang KS, Kates JR** (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *Journal of Molecular Biology*, **25**: 47-66.
- Sumar N, Casselton PJ, McNally SF, Stewart GR** (1984). Occurrence of isoenzymes of glutamine synthetase in the alga *Chlorella kessleri*. *Plant Physiology*, **74**: 204-207.

T

- Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S, Hirayama O, Mitsunaga T** (1993). Purification and characterization of glutathione reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of General Microbiology*, **139**: 2233-2238.
- Takeda T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S** (1998). Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. *Biochimie*, **80**: 295-301.
- Takeda T, Yoshimura K, Yoshii M, Kanahoshi H, Miyasaka H, Shigeoka S** (2000). Molecular characterization and physiological role of ascorbate peroxidase from halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80 Strain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **376**: 82-90.
- Tausz M, Sircelj H, Grill D** (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1955-1962.
- Tayefi-Nasrabadi H** (2008). Some biochemical properties of catalase from kohlrabi (*Brassica oleracea gongylodes*). *Journal of Biological Sciences*, **8**: 649-653.
- Terlizzi DE, Karlander EP** (1980). Growth of a coccoid nanoplankter (Eustigmatophyceae) from the Chesapeake Bay as influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. *Journal of Phycology*, **16**: 364-368.
- Tischner R** (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*, **23**: 1005-1024.
- Torrentera L, Tacon AGJ** (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura: una diagnosis. Documento preparado para el proyecto GCP/RLA/075/ITA. Apoyo a las actividades regionales de acuicultura para América latina y el Caribe.
- Tu S, Ma LQ** (2003). Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions. *Environmental and Experimental Botany*, **50**: 243-251.
- Turano FJ, Dashner R, Upadhyaya A, Caldwell CR** (1996). Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. *Plant Physiology*, **112**: 1357-1364.
- Turner RG** (1970). The subcellular distribution of zinc and copper within the roots of metal-tolerant clones of *Agrostis tenuis* Sibth. *New Phytologist*, **69**: 725-731.
- Tuzen M, Soylak M** (2005). Mercury contamination in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **74**: 968-972.

U

Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ (1989). Evaluation of arsenate- and vanadate- associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 119-128.

Urbietta MS, Vicente M, Yagnentkovsky N, Willis-Poratti GM, Viera MR, Donati ER (2011). Bioprecipitación de metales pesados. En: Aroca G y Cantero D (eds). *Bioprocesos: Tecnologías Limpias para la Protección y Sustentabilidad del Medio Ambiente*. Valparaíso, Chile. (En prensa, ISBN: 978-956-17-0462-6).

V

Vega JM, Cárdenas J, Losada M (1980). Ferredoxin-nitrite reductase. *Methods in Enzymology*, **69**: 255-270.

Vega JM, Garbayo I, Domínguez MJ, Vígara J (2006). Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. Induction of oxidative stress. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**: 163-167.

Vega JM, Guerrero MG, Leadbetter E, Losada M (1973). Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-nitrite reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Biochemical Journal*, **133**: 701-708.

Vega JM, Kamin H (1977). Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **252**: 896-909.

Vega JM, Menacho A, León J (1991). Nitrate assimilation by microalgae. *Photochemistry and Photobiology*, **2**: 69-111.

Viera M, Donati E (2004). Microbial processes for metal recovery from waste products. *Current Topics in Biotechnology*, **1**: 117-127.

Vígara J, García-Sánchez MI, Garbayo I, Vilchez C, Vega JM (2002). Purification and characterization of ferredoxin-nitrite reductase from the eukaryotic microalga *Monoraphidium braunii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 401-405.

Vivares D, Arnoux P, Pignol D (2005). A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 18848-18853.

Von-Arb C (1990). Sulphur metabolism. C. Sulphite reductase. En: Lea PJ (ed). *Methods in Plant Biochemistry. Volume 3, Enzymes of Primary Metabolism*. pp 345-348. Academic Press. London.

Vuleta A, Jovanovic SM, Darka-Seslija D, Tucic B (2010). Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila* L. *Journal of Plant Ecology*, **3**: 59-69.

W

Wagner GJ (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, **51**: 173-212.

Wainwright SJ, Woolhouse HW (1975). Physiological mechanisms of heavy metal tolerance in plants. En: Chadwick MJ y Goodman GT (eds.). *The Ecology of Resource Degradation and Renewal*. pp 231-259. Oxford.

Wang J, Zhao FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*, **130**: 1552-1561.

Wang L, Zhou Q, Ding L, Sun Y (2008). Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*, **154**: 818-825.

Watanabe M, Hoshino T, Kikuchi A, Watanabe Y (1999). Purification and characterization of two glutamate dehydrogenase isoenzymes from *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **37**: 731-739.

Weber A, Flugge UI (2002). Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 865-874.

Weber MB, Schat H, Ten Bookum-Van der Maarel WM (1991). The effect of copper toxicity on the contents of nitrogen compounds in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Plant and Soil*, **133**: 101-109.

Wilde KL, Stauber JL, Markich SJ, Franklin NM, Brown PL (2006). The effect of pH in the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **51**: 174-185.

Wingsle C (1989). Purification and characterization of glutathione reductase from Scots pine needles. *Physiologia Plantarum*, **76**: 24-30.

Winter HC, Powell GK, Dekker EE (1982). Glutamine synthetase of peanuts. Properties of two chromatographically distinct forms and their activity toward 4-methyleneglutamic acid. *Plant Physiology*, **69**: 41-47.

Wirth E, Lutzko E (1978). Partial purification and properties of spinach leaf glutathione reductase. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **89**: 69-75.

V. Bibliografia

Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, **44**: 301-305.

Wray JL, Fido RJ (1990). Nitrate reductase and nitrite reductase. En: Lea PJ (ed). *Methods in Plant Biochemistry. Volume 3, Enzymes of Primary Metabolism*. pp 241-256. Academic Press. London.

Wu Z, Ren H, McGrath SP, Wu P, Zhao F-J (2011). Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiology*, **157**: 498-508.

X

Xu XY, McGrath SP, Zhao FJ (2007). Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots. *New Phytologist*, **176**: 590-599.

Y

Yabuki Y, Mori E, Tamura G (1985). Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**: 3061-3062.

Yadav SK (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, **76**: 167-179.

Yamashita MM, Almasy R, Janson C, Causcio D, Eisenberg D (1989). Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 17681-17690.

Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H (1984). Characteristic glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiology*, **76**: 1009-1013.

Ying K, Gilmour DJ, Zimmerman WB (2014). Effects of CO₂ and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Microbial and Biochemical Technology*, **6**: 167-173.

Young AJ (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **83**: 702-708.

Yuan HF, Wang CM, Kung HW (2001). Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* RF-1. *Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei*, **42**: 23-33.

Z

Zhang L, He X, Chen M, An R, An X, Li J (2014). Responses of nitrogen metabolism to copper stress in *Luffa cylindrica* roots. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **14**: 616-624.

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, **181**: 777-794.

Zhao FJ, Stroud JL, Khan MA, McGrath SP (2012). Arsenic translocation in rice investigated using radioactive ⁷³As tracer. *Plant and Soil*, **350**: 413-420.

Zumft WG (1972). Ferredoxin-nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, **276**: 363-375.

Curriculum vitae

FORMACIÓN ACADÉMICA

- **Licenciado en Química:** (2005-2010) Universidad de Huelva
- **Máster oficial en “Ciencia y Tecnología Química”:** (2010-2011) Universidad de Huelva. Trabajo Fin de Máster bajo el título de “Caracterización cinética y molecular de la actividad ascorbato peroxidasa de la microalga *Coccomyxa acidophila*”.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. AISLAMIENTO DE UNA NUEVA ESTIRPE DE *Picochlorum* DE LAS MARISMAS DE HUELVA Y CARACTERIZACIÓN DE SU POTENCIAL

M. de la Vega, E. Díaz, M. Vila, A. Azogil, J.A. Gómez, **C. Romero**, J. Vigarra, R. León

VI Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Póster. Cartaya, Huelva, España (2012)

2. ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA DE *Coccomyxa acidophila*

Montes Paola, **Romero M^a Carmen**, de la Vega Marta, Vega José M^a, Vigarra Javier

XI Reunión del Metabolismo del Nitrógeno. Comunicación oral. Cáceres, España (2012)

3. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA DE *Coccomyxa acidophila*

Romero M^a Carmen, Rengel Rocío, Díaz Encarnación, Vega José M^a, Vigarra Javier

XI Reunión del Metabolismo del Nitrógeno. Póster. Cáceres, España (2012)

4. CHARACTERIZATION OF ASCORBATE PEROXIDASE ACTIVITY FROM THE EUKARYOTIC MICROALGA *Coccomyxa acidophila*

M^a Carmen Romero Cruz, Rocío Rengel, José M^a Vega Piqueres, Javier Vigarra Fernández

22nd IUBMB and 37th FEBBS Congress. Póster. Sevilla, España (2012)

5. INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA DE *Aspergillus oryzae* EN MEMBRANAS DE QUITOSANO

Romero Cruz MC, Urrutia P, Ruíz-Philippi G, Vílchez C, Vigarra J, Wilson-Soto L

XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Póster. Granada, España (2014)

6. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE LA MICROALGA ACIDÓFILA *Coccomyxa onubensis*

Rocío Rengel Domínguez, **M^a Carmen Romero Cruz**, José M^a Vega Piqueres, Javier Vigara Fernández

XIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Póster. Villanueva de la Serena, Badajoz, España (2016)

7. CONSUMO DE NITRÓGENO EN LA MICROALGA ACIDÓFILA *Coccomyxa onubensis*

M^a Carmen Romero Cruz, Laura Macías Suárez, Javier Vigara Fernández, José M^a Vega Piqueres

XIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Póster. Villanueva de la Serena, Badajoz, España (2016)

8. EFECTO DE ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE LA MICROALGA ACIDÓFILA *Coccomyxa onubensis*

M^a Carmen Romero Cruz, Rocío Rengel Domínguez, José M^a Vega Piqueres, Javier Vigara Fernández

XIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Póster. Villanueva de la Serena, Badajoz, España (2016)

9. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCESO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE MICROALGAS CLOROFITAS A -80 °C

A. León-Vaz, **MC. Romero**, J. Vigara, R. León

VIII Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Póster. Cartaya, Huelva, España (2016)

ESTANCIAS EN CENTROS EXTRANJEROS

- Realización de una estancia de 6 meses (1 diciembre 2013 – 1 junio 2014) en la Universidad Católica de Valparaíso (Chile) en calidad de becaria Marie Curie, dentro del proyecto Europeo IRSES ALGAENET (PIRSES-GA-2011-295165). Durante la estancia, se realizaron tareas relacionadas con la inmovilización de enzimas mediante interacción covalente en geles de quitosano.