

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen
Volume 44

Número
Number 3-4

Julio-Diciembre
July-December 2002

Artículo:

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

Derechos reservados, Copyright © 2002

:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



www.Medigraphic.com

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

Juan Carlos González-Hernández,* Antonio Peña*

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

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

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HALOFILIA

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

REPUESTA GENERAL AL ESTRÉS

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

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

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

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

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

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

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

VÍA DE LAS MAP CINASAS

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

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

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

REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE LA VÍA HOG

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

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

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

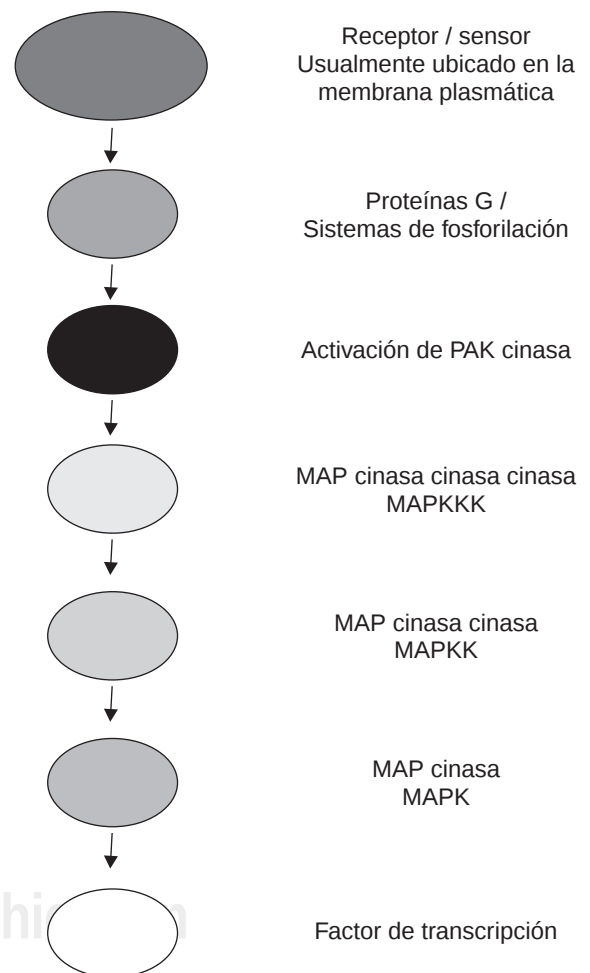


Figura 1. Nomenclatura de proteínas en la vía de MAP cinasas. Las flechas solamente indican el sentido de la vía; los complejos de las proteínas específicas son comunes y requeridos para la transmisión de señales.

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

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

BACTERIAS HALÓFILAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEVADURAS XELOTOLERANTES

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

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

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

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

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

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

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

ALGAS HALÓFILAS

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

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

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

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

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

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

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

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

PLANTAS

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

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

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

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

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

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

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

SOLUTOS COMPATIBLES EN LAS CÉLULAS ANIMALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ASPECTOS ENERGÉTICOS DE LOS ORGANISMOS HALÓFILOS

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

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

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

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

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

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

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

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

SOLUTOS COMPATIBLES

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

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

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

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

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

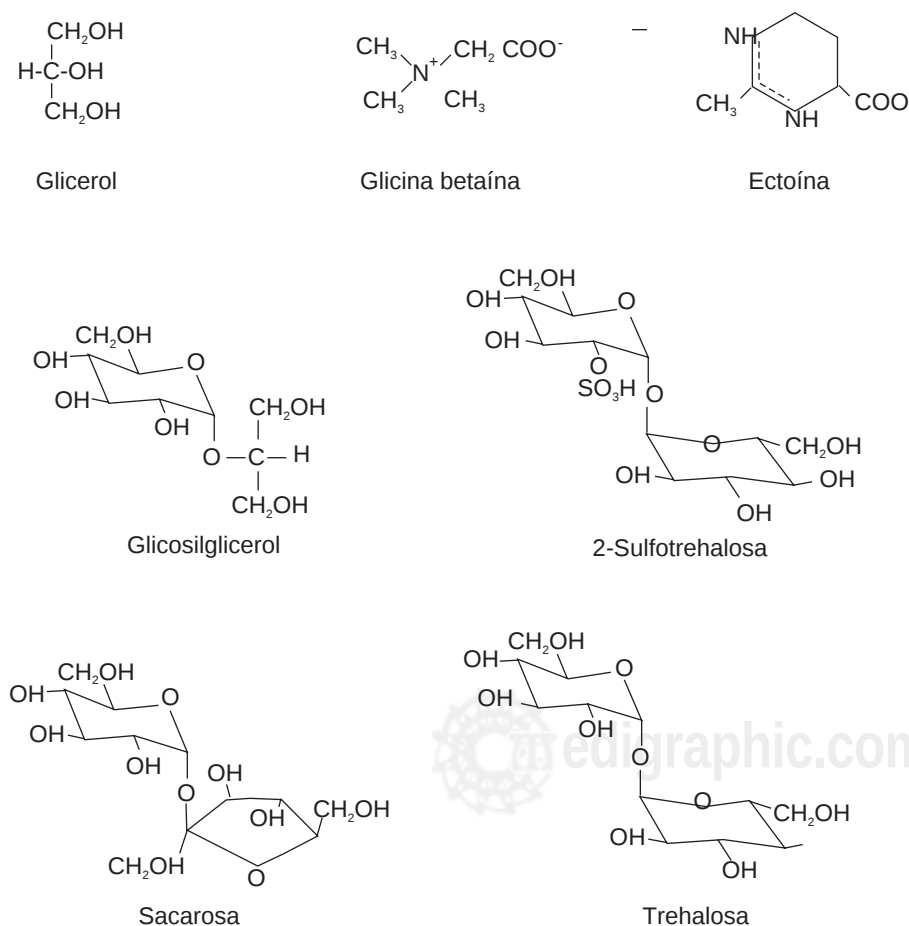


Figura 2. Solutos compatibles orgánicos encontrados en microorganismos halófilos y halotolerantes.

bas enzimas, la levadura posee dos isoformas expresadas diferencialmente GPD1 y GPD2^{7,10,20} y GPP1 (RHR2) y GPP2 (HOR2).^{71,118,130} *S. cerevisiae* también posee genes que codifican para las enzimas glicerol deshidrogenasa (GCV1 Y YPR1), así como la dihidroxiacetona cinasa (DAK1 y DAK2), que constituyen la vía de la degradación del glicerol. En la vía para la producción del glicerol vía Gpdp y Gpp, el NADH se convierte en NAD, mientras que para la utilización del glicerol, éste se convierte en dihidroxiacetona fosfato vía Gcy1p y Dak1p, y en el proceso, reduce al NADP a NADPH. Así, un ciclo de la dihidroxiacetona fosfato puede esencialmente funcionar como una transhidrogenasa para la interconversión de NADH a NADPH.^{20,119} *S. cerevisiae* no tiene transhidrogenasas para interconvertir el NADH en NADPH¹¹⁶, y por esta razón este ciclo puede tener varios sitios de control. Existen dos glicerol-3-fosfato deshidrogenasas, una dependiente de NAD (Gpd1p y Gpd2p) y una dependiente de FAD (Gut2p), que participa en el transporte de electrones del NADH hacia el FADH y se encuentra dentro de la cadena respiratoria mitocondrial.

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

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

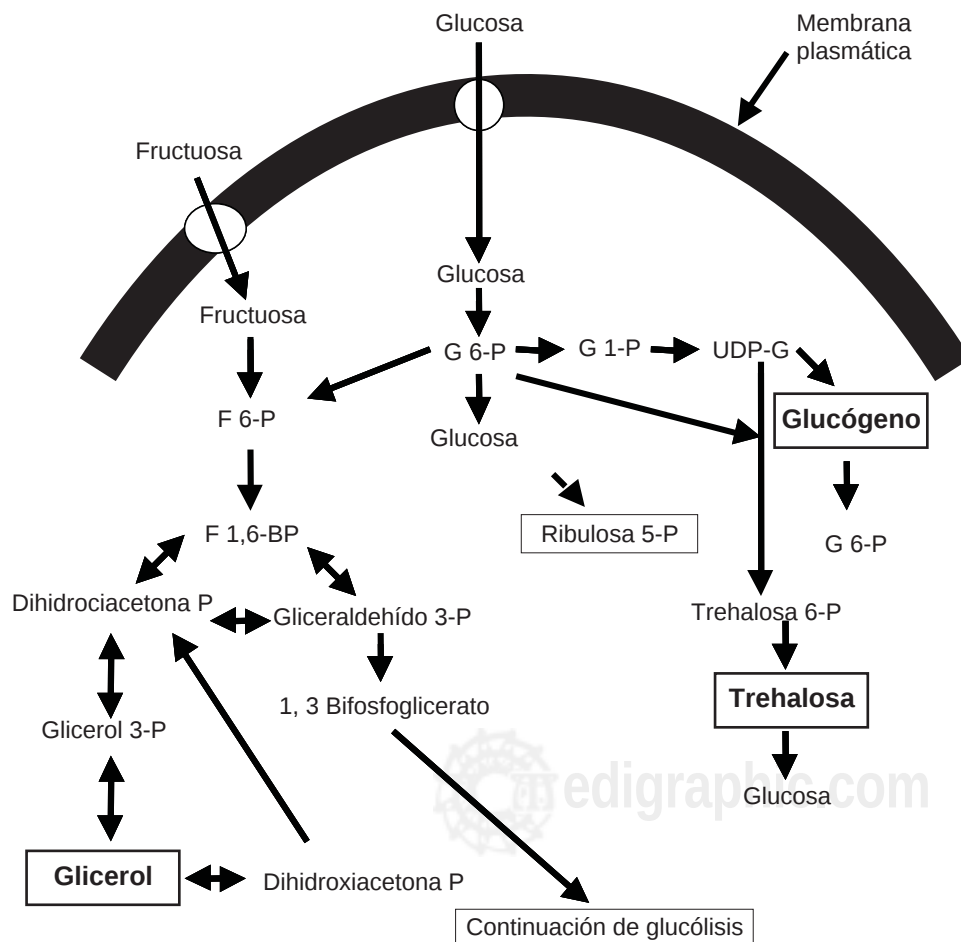


Figura 3. Vías metabólicas para la producción de glicerol, trehalosa y glucógeno en la levadura.

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

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

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

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

MECANISMOS PROPUESTOS DEL EFECTO DE LOS SOLUTOS COMPATIBLES

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

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

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

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

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

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

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

DEBARYOMYCES HANSENI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BIOTECNOLOGÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

REFERENCIAS

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

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

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

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

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

Correspondence to:

J.C. González-Hernández

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