

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL

Bases de la respuesta a estrés salino en la
levadura *Debaryomyces hansenii*

Basis of salt stress response in the yeast
Debaryomyces hansenii

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Francisco S. Ruiz Pérez

Directores

Dr. José Ramos Ruiz

Departamento Química agrícola, Edafología y Microbiología

Programa de doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Córdoba, 11 de octubre de 2023

TITULO: *Bases de la respuesta a estrés salino en la levadura Debaryomyces hansenii*

AUTOR: *Francisco Solano Ruiz Pérez*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

Este documento se presentará junto con el depósito de la tesis en <https://moodle.uco.es/ctp3/>



DOCTORANDA/O

Francisco Solano Ruiz Pérez

TÍTULO DE LA TESIS:

Bases de la respuesta a estrés salino en la levadura *Debaryomyces hansenii*

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)

Este trabajo de Tesis Doctoral reúne todas las características para ser considerado como tal. Se ha desarrollado una hipótesis de trabajo y se han propuesto unos objetivos que se han ido cumpliendo a lo largo de este tiempo. El trabajo es original y parte de los resultados obtenidos se han presentado en diversos congresos nacionales e internacionales (Microbiología de los alimentos, Jaen; Acción COST, Praga; Smyte meetin, Blankenberge) . Además se ha publicado un trabajo científico en la revista *Yeast* en el que el autor de la Tesis figura como primer firmante (Ruiz-Pérez et al, 2023)

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 11 de octubre de 2023

Las/los directoras/es

Fdo.:Dr. José Ramos Ruiz

Agradecimientos

Lo primero de todo, agradecer a mi Tutor el Dr. José Ramos por darme la oportunidad de realizar la tesis en su grupo, al cual yo considero mi familia de laboratorio, a pesar de ser el TFG que no saludaba nunca y al que no le salían las PCRs. A lo largo de estos años he aprendido mucho con él y para mí siempre será un referente y el que siempre confió en mi para realizar este proyecto y el que me dio mi primera oportunidad en el mundo laboral.

Agradecer también a Carmina, sé que te debo unos cuantos jamones, y de los buenos, gracias por las numerosas veces que me has ayudado y el compromiso que siempre has mostrado a lo largo de estos años.

A las técnicas de laboratorio Tere y Esther a las que yo siempre me refiero a ellas como mis “madres de laboratorio”, por el pedazo de trabajo que han hecho para que no me haya faltado de nada en el desarrollo de tesis y el cariño y la atención que siempre me han dado en mis momentos más difíciles y los buenos ratos que hemos pasado juntos. También a la técnica Mari Carmen Fernández con la que también he pasado buenos ratos charlando y también me ha prestado una gran ayuda.

Al Dr. Francisco Javier Ruiz Castilla, al cual yo considero mi hermano de laboratorio, y el que, aunque siempre piensa en los mismo, tú ya sabes Francis... me faltan palabras para darte gracias por todo, por las risas extrayendo ARN, por guiarme en el super divertido proceso (nótese ironía) de la tesis doctoral y por esas charlas *random* en el despacho. Así como, su ayuda en mi artículo. Se que te debo un super bocata de la cafetería no te preocupes. También dedicarle unas palabras a Helena y desearle suerte a lo largo de su tesis.

A Eli mi *drama queen* favorita, gracias por todo el apoyo que me has dado mientras organizaba el laboratorio, espero que tengas mucha suerte en la vida. También agradecer a Apa por eso ratos conociendo a Bianca en Sierra Nevada y las risas que siempre he compartido con él.

A Jorge y a Jesús, gracias por todos esos desayunos en lo que da igual lo mal que estaba siempre acaba riendo, aunque no nos hemos visto todos los días, los momentos en lo

que hemos estado juntos han sido inolvidables. También agradecer a Carlos Lucena y María José por ayudarme y prestarme el instrumental necesario para las RT-PCR.

Agradecer al Profesor José Luis Martínez de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) y su equipo por la ayuda prestada para la medición de metabolitos de interés, así como, a Carlos Leal por su colaboración para la publicación del artículo.

A Fran, Pilar, Celia y Rafa por ser unos excelentes compañeros de carrera y más aún amigos, aunque cada uno esté en un lugar diferente del mundo y con su tema, nadie nos puede quitar el tiempo que hemos compartido y compartiremos, espero, en un futuro. No me olvido de Marta a la cual le deseo que sea muy feliz con Rafa y Valquiria.

Dedicar unas palabras a los TFGs que he ido supervisando a lo largo de estos años, aunque la mayoría de vosotros me habéis llevado al límite más de una vez, decid que sois personas maravillosas y que, aunque siempre me toque ser el “malo” de la película siempre habéis superado mis expectativas y que, si vosotros habéis aprendido de mí, yo he aprendido más de vosotros.

A mi consejo de sabios, Nuria, Antonio y Manjón por ser los mejores amigos que se puede tener, aunque no quede mucho con vosotros siempre os tengo presente y habéis estado ahí cuando uno necesitaba salir de la rutina o cuando estaba en horas bajas. Ahora que ya he terminado podríamos planear uno de esos viajes que nunca llegamos hacer y hacerlo realidad.

A Laura, a mi compañera de vida, tanto de alegrías como de penas, gracias por todo el apoyo y la paciencia que has tenido estos años, hoy todos esos momentos de flaqueza en los que siempre te decía “no puedo más” y tus respuestas de “poco a poco” se convierte en esta tesis. Gracias de verdad, por evitar que mi viaje se convierta en destino y que ojalá siempre podamos compartir las penas para hacerlas menos penas y disfrutar las alegrías juntos.

Agradecer a mi familia, a la cual va dedicada esta tesis, y que a pesar de no entender lo que hacía en el laboratorio siempre me preguntaba y mostraba interés, por la paciencia y sacrificio que ha hecho a lo largo de los años para que yo me pudiese formar y tener un buen futuro, por todo ello me faltan muchísimas palabras para mostrar lo agradecido

que estoy por los buenos que habéis sido para mí y aunque hoy echemos en falta a las abuelas y a Goofy siempre nos acompañaran estemos donde estemos.

Por último, esta tesis se ha financiado gracias al Plan Propio de la Universidad de Córdoba, así como, a Fondos FEDEX.

Índice general

RESUMEN.....	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Estrés salino	11
2. La levadura <i>Debaryomyces hansenii</i>	13
2.1 <i>Debaryomyces hansenii</i> : Generalidades y aplicaciones biotecnológicas.....	14
2.2 Adaptaciones al estrés salino	16
2.2.1 Información general	16
2.2.2 Estrés oxidativo en relación con el estrés salino	19
2.2.3 <i>Debaryomyces hansenii</i> y las técnicas “-ómicas”	21
2.3 Metabolismo	23
2.3.1 El ciclo del ácido glioxílico	25
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
1. Material biológico.....	35
2. Medio de cultivos	35
3. Tampones	36
4. Análisis del efecto del catión litio sobre el crecimiento y viabilidad de <i>Debaryomyces hansenii</i>	37
4.1 Análisis del crecimiento en medio sólido. Test de goteo.....	37
4.2 Análisis del crecimiento en medio líquido. Curvas de crecimiento	38
4.3 Ensayo de toxicidad. Viabilidad.....	39
5. Métodos bioquímicos	39

5.1 Análisis del contenido intracelular y del flujo de cationes	39
5.1.1 Contenido intracelular de potasio, sodio y litio	39
5.1.2 Flujo del catión Litio	40
5.2 Determinación de niveles de fosfatos.....	41
5.3 Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41
5.4 Ensayo de actividades enzimáticas	42
5.4.1 Preparación de extractos celulares.....	42
5.4.2 Análisis de actividades enzimáticas	43
5.5 Determinación de concentración de metabolitos	44
6. Estudio y análisis a nivel de transcripción	45
6.1 Obtención de células.....	45
6.2 Extracción de ADN.....	45
6.3 Extracción de ARN	46
6.4 Tratamiento con ADNasa	46
6.5 Cuantificación del ARN aislado.....	47
6.6 Retrotranscripción a ADNc.....	47
6.7 Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR.....	48
7. Análisis estadísticos y bioinformática	49
RESULTADOS.....	51
1. Análisis del efecto de las sales sobre el crecimiento y viabilidad.....	53
1.1 Efecto de las diferentes concentraciones de sal	54
1.2 Influencia del potasio y el sodio sobre el efecto del litio.....	56
1.3 Efecto del pH sobre la tolerancia a sodio y litio	58
1.4 Viabilidad celular	62

2. Homeostasis iónica. Contenido y flujo de cationes	64
2.1 Análisis del contenido intracelular de potasio, sodio y litio	64
2.2 Contenido y flujo de litio en presencia de potasio y sodio	65
3. Niveles de fosfato y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).	68
3.1 Determinación de los niveles de fosfato en presencia de sodio y litio.....	68
3.2 Cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en estrés salino	70
4. Ensayos metabólicos.....	73
4.1 Consumo de glucosa. Producción de glicerol y etanol.....	73
4.2 Actividades enzimáticas. Hexoquinasa y Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	75
4.3 Ensayos relativos al ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato	80
4.3.1 Determinación de metabolitos de interés	80
4.3.2 Actividad de la Isocitrato deshidrogenasa, Isocitrato liasa y Malato sintasa	81
4.3.2 Análisis de los niveles de transcripción.....	87
DISCUSIÓN	93
1. <i>Debaryomyces hansenii</i> y halotolerancia	95
2. Estrés salino y metabolismo	100
CONCLUSIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXOS.....	128

Índice de figuras

Figura 1. <i>D. hansenii</i> . Fotografía al microscopio	13
Figura 2. Lugares donde en los que es posible aislar a <i>D.hansenii</i>	14
Figura 3. Relaciones filogenéticas de <i>D. hansenii</i>	15
Figura 4. Modelo propuesto de los múltiples transportadores presentes en <i>D. hansenii</i>	17
Figura 5. Esquema general del Ciclo del ácido glioxílico	25
Figura 6 Análisis del crecimiento en medio sólido mediante test de goteo.	54
Figura 7. Análisis del crecimiento celular en medio líquido mediante curvas de crecimiento.....	55
Figura 8. Análisis del efecto del potasio y sodio sobre la tolerancia a litio.....	57
Figura 9. Efecto del potasio y sodio sobre la toxicidad del litio en medio líquido.....	58
Figura 10 Efecto del pH en condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a sodio y litio en medio sólido	59
Figura 11. Influencia del potasio sobre la tolerancia a litio y sodio en diferentes pH... .	60
Figura 12. Efecto del pH en condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a sodio y litio en medio líquido.	61
Figura 13. Efecto del sodio y litio sobre la viabilidad celular de <i>D. hansenii</i>	63
Figura 14. Flujo del catión litio hacia el interior celular	66
Figura 15. Niveles de fosfato en células de <i>D. hansenii</i> crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl	69

Figura 16. Cuantificación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en células crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl	71
Figura 17. Concentración de glicerol medido en sobrenadante libre de células que crecieron en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl	74
Figura 18. Actividad enzimática de la hexoquinasa (HK).....	76
Figura 19. Actividad enzimática de la gliceraldehido-3-deshidrogenasa (G3PDH)	77
Figura 20. Actividad enzimática de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH)	82
Figura 21. Actividad enzimática de la Isocitrato liasa (ICL)	83
Figura 22. Actividad enzimática de la Malato sintasa (MS).....	84
Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de los genes IDH1 (DEHA2C10758g) (A) e IDH2 (DEHA2G05786g) (B).....	87
Figura 24. Cambios en los niveles de expresión del gen ICL (DEHA2D12936g)	88
Figura 25. Cambios en los niveles de expresión del gen MS (DEHA2E13530g)	89
Figura 26. Esquema global del efecto del NaCl y del LiCl sobre el ciclo del ácido glioxílico y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos	104

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de las principales adaptaciones de <i>D. hansenii</i> al estrés salino	18
Tabla 2. Tampones y soluciones utilizados en los diferentes experimentos	36
Tabla 3. Cebadores utilizados	48
Tabla 4. Contenido intracelular de Potasio, Sodio y Litio en células de <i>D. hansenii</i> crecidas en YNB suplementado con diferentes concentraciones de KCl, NaCl y LiCl.	64
Tabla 5. Contenido intracelular de Litio en células crecidas en YNBc suplementado con 0,25 M LiCl en ausencia o presencia de 0,5 M de KCl o NaCl.....	66
Tabla 6. Resumen de la Actividad enzimática correspondiente a la Hexoquinasa (HK) y a la Gliceraldehido-3-deshidrogenasa (G3PDH) medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.	79
Tabla 7. Concentración de diferentes metabolitos relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico y del ácido glioxílico medidos en extractos de células crecidas en YNBc suplementado con NaCl o LiCl.	81
Tabla 8. Resumen de la actividad enzimática correspondiente a la Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Isocitrato liasa (ICL) y a la Malato sintasa (MS) medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.....	86
Tabla 9. Resumen de los cambios en la expresión correspondiente a los genes IDH1, IDH2, ICL y MS medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl	91

Lista de abreviaturas

1,3 BPG: 1,3-bifosfoglicerato

A_{450nm}: Absorbancia a 450 nm

A_{523nm}: Absorbancia a 532 nm

A_{600nm}: Absorbancia a 600 nm

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADN_c: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Seroalbúmina bovina

CT: Ciclo Umbral

DEPC: Dietil pirocarbonato

Dh: *Debaryomyces hansenii*

DTNB: ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

G3PDH: Glicealdehido-3-fosfato Deshidrogenasa

G6PDH: Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa

GAP: Glicerealdehido-3-fosfato

HK: Hexoquinasa

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

ICL: Isocitrato liasa

MOPS: ácido 3-[N-morpholino] propanosulfónico

MS: Malato sintasa

PAP: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato

P_i: fosfato inorgánico

PMA: Ácido fosfomolibdico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: PCR a tiempo real

Tampón TAE (Tris, Acetato, EDTA)

Tampón TE (Tris-EDTA)

TBAR: Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

TEA: Trietanolamina

TMP: 1,1,3,3-Tetrametoxipropano

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

YNBc: Yeast Nitrogen Base completo

YNB-F: Yeast Nitrogen Base-Formidium

YPD: Yeast Peptone Dextrose

Resumen

RESUMEN

Debaryomyces hansenii es una levadura osmo-, xero- y generalmente considerada halotolerante que, gracias a las múltiples adaptaciones que posee puede hacer frente a altas concentraciones de sal en el medio. Esta levadura ha sido utilizada como modelo en estudios de estrés salino centrados en los cationes potasio y sodio, por lo que, otros cationes alcalinos como el litio se encuentran poco estudiados. El efecto de la sal sobre el metabolismo de esta levadura se encuentra escasamente descrito y no ha sido posible obtener conclusiones claras sobre este tema debido a las numerosas contradicciones entre los diferentes autores, impidiendo así, obtener información sobre aspectos básicos del metabolismo como, por ejemplo, la capacidad fermentativa. En la presente tesis se han estudiado diferentes aspectos fisiológicos y metabólicos de *D. hansenii* en respuesta al estrés salino.

En primer lugar, hemos determinado el efecto de diferentes cationes alcalinos sobre la fisiología de *D. hansenii*. Nuestros resultados muestran que una concentración media-alta (0,5 M) de sodio o potasio favorece el crecimiento, sin embargo, concentraciones más altas de ambos cationes tienen efectos negativos sobre la levadura. Por otra parte, el litio es un elemento tóxico, sin embargo, esta toxicidad se ve mitigada en presencia de sodio o potasio, al menos en parte, debido a la inhibición del flujo del litio hacia el interior celular. Adicionalmente, se ha estudiado el efecto de los diferentes cationes sobre la homeostasis iónica y se ha podido comprobar que el litio se acumula en menor medida que el potasio o el sodio, indicando así, que este catión presenta una alta toxicidad incluso en pequeñas cantidades. Para finalizar esta primera parte, se han calculado los niveles de metabolitos como, por ejemplo, los fosfatos o las Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Los análisis realizados muestran que una concentración media-alta de sodio (0,5 M) provoca un aumento de los niveles tanto de fosfatos como de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), por el contrario, el litio causa una disminución de la concentración de ambos metabolitos independientemente de la cantidad de litio utilizada

Posteriormente, se ha querido obtener información sobre aspectos básicos del metabolismo de *D. hansenii* como, por ejemplo, la capacidad fermentativa. Los

resultados muestran que la cepa CBS767 de *D. hansenii* carece de una capacidad fermentativa mínima ya que no produce etanol ni en condiciones de salinidad inducida por sodio o litio ni en ausencia de sales en el medio.

Por último, se ha determinado el efecto del sodio y el litio sobre diferentes rutas metabólicas. En esta parte de la tesis se han realizado aproximaciones a distintos niveles desde uno más centrado en los metabolitos hasta un nivel más transcripcional. Nuestros resultados muestran que el sodio inhibe algunas enzimas relacionadas con las primeras etapas de la glucólisis, mientras que, una concentración baja de litio estimula dichas enzimas. Los diferentes análisis realizados con relación al ciclo del ácido glioxílico muestran que el sodio estimula dicha ruta metabólica. Esta estimulación se puede observar en todos los niveles estudiados, observándose, un incremento en los niveles de metabolitos relacionados con dicho ciclo metabólico, como son el glioxilato o el malato, así como en la actividad de enzimas relacionadas, como son la isocitrato liasa y la malato sintasa. Adicionalmente, los niveles de transcripción de los genes que codifican dichas enzimas aumentan en presencia de sodio. Por el contrario, el litio inhibe esta ruta metabólica, a favor del ciclo de Krebs. Esta inhibición se ve reflejada en una disminución tanto a nivel de metabolitos como a nivel enzimático-transcripcional. Por otra parte, la estimulación del ciclo de Krebs se puede observar mediante el aumento en la concentración de metabolitos relacionados con dicha ruta metabólica como el oxoglurato y en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa.

Summary

Debaryomyces hansenii is an osmo-, xero- and generally considered halotolerant yeast which, thanks to its adaptations, can cope with high salts concentrations in the medium. This yeast has been used as a model in salt stress studies focused on potassium and sodium cation, so that, other alkali cations, such as lithium, are poorly studied. The effect of salt on the metabolism of this yeast is sparsely described and it hasn't been possible to obtain clear conclusions about this topic due to the numerous contradictions between the different authors, preventing from obtaining information about basic aspects of the metabolism, for example, the fermentative capacity. In this thesis, different physiologic and metabolic aspects of *D. hansenii* in response to salt stress have been studied.

Firstly, we have determined the effect of different alkali cations on the physiology of *D. hansenii*. Our results show that a medium-high concentration (0.5 M) of sodium or potassium promotes yeast growth, but higher concentrations of both cations have negative effect on the yeast. On the other hand, lithium is a toxic element, however, this toxicity is partially mitigated by the presence of sodium or potassium in the medium, partly, due to the inhibition of the flow into the cellular interior. Additionally, the effect of the different cations on ionic homeostasis has been studied, and it has been possible to check that lithium accumulates to a less extent than sodium or potassium, indicating that, this cation has a high toxicity even in small quantities. To conclude this first part, the levels of some metabolites, such as, phosphates or Thiobarbituric Reactives Substances (TBARs) have been measured. Analysis carried out show that a medium-high concentration (0.5 M) of sodium increases the levels of phosphates and TBARs, by contrast, lithium causes a decrease in the concentration of both metabolites, independently of the concentration used.

Subsequently, the aim has been to obtain information about basic aspects of the metabolism, such as, the fermentative capacity. Results show that the CBS767 strain of *Debaryomyces hansenii* lacks a fermentative capacity since it doesn't produce ethanol neither in salt conditions nor in absence of salt.

Last, we have determined the effect of sodium and lithium on different metabolic pathways. In this part of the thesis, we have done approaches at different levels, from one more focused on metabolites to another more transcriptionally focused. Our results show that sodium inhibits some enzymes related to the first stages of the glycolysis, while a low concentration of lithium (0.1 M) stimulates those enzymes. The analysis related to Glyoxylic Acid Cycle show that sodium stimulates this metabolic pathway. This stimulation can be seen at all studied levels, observing, an increase in the level of metabolites related to this metabolic cycle, such as, Glyoxylate or Malate, so that in enzymes related like Isocitrate lyase or Malate synthase. Additionally, the transcription levels of genes which code for these enzymes are increased by the presence of sodium. By contrast, lithium inhibits this metabolic pathway, in favour to Krebs Cycle. This inhibition can be seen in a decrease not only at the metabolites level but also at enzymatic-transcriptional level. On the other hand, the stimulation of the Krebs Cycle can be seen by the increase of the concentration of metabolites related, such as, oxoglutarate and in the activity of Isocitrate dehydrogenase.

Introducción

1. Estrés salino

La sal, químicamente hablando es un compuesto formado por dos iones (un catión y un anión) enlazados mediante enlace iónico. La sal se forma como consecuencia de una reacción entre un ácido y una base, donde la base proporciona el catión y el ácido proporciona el anión. El estrés salino se define como el conjunto de alteraciones moleculares y fisiológicas de un ser vivo en respuesta a altas concentraciones de sal en el medio. El sodio, es el elemento más abundante en los ecosistemas por lo que sus sales, sobre todo el cloruro de sodio (la sal común), son las más abundantes (Munns R., 2002), sin embargo, podemos encontrar otras sales como puede ser el sulfato de magnesio o cloruro potásico.

La mayoría de los seres vivos son sensibles a altas concentraciones de sal, este hecho supone un problema cada vez más grave en diferentes ámbitos como, por ejemplo, en la agricultura debido al aumento de los suelos agrícolas afectados por la salinidad (Isayenkov S.V., 2012) como consecuencia de la realización de malas prácticas en las superficies cultivables como puede ser, la mala irrigación o por otras causas como, por ejemplo, el cada vez más evidente cambio climático (van Zelm E. et al., 2020). Los efectos del estrés salino en plantas son muy diversos, algunos de ellos son, la inhibición del crecimiento (en la mayoría de las plantas) o la citotoxicidad en los tejidos vegetales debido a la acumulación de cationes, en especial Na^+ y Cl^- (Kohler J. et al., 2009), que provoca la mala distribución de los nutrientes y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior celular. Estos efectos son los responsables de la disminución de la productividad en las cosechas (Tester & Denverpot, 2003; Isayenkov S.V., 2012). El estrés salino no solo tiene impacto en las plantas o en la economía sino también en la salud humana, ya que la sal es considerada un factor de estrés, que contribuye a procesos celulares como el envejecimiento, proceso implicado en enfermedades como el cáncer o en otros procesos inmunológicos (Cross C.E. et al., 1987).

El estrés salino no solo afecta a los denominados seres superiores como plantas o animales. Como se ha dicho anteriormente, casi todos los seres vivos son sensibles a este fenómeno, incluyendo a los microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras. Sin embargo, la propiedad de resistir e incluso proliferar en ambientes con baja actividad hídrica como consecuencia de una alta salinidad en el medio se encuentra

más ampliamente distribuida en los diferentes microorganismos, arqueas (Oren A., 1999), bacterias (Ventosa A. et al., 1998), hongos y levaduras (Gunde-Cimerman N. et al., 2009), pudiéndose encontrar más frecuentemente especies halotolerantes y halófilas en estos grupos de seres. En varios procesos biotecnológicos, los microorganismos se pueden ver afectados por múltiples tipos de estrés promovidos por un amplio número de agentes que no pueden ser totalmente controlados durante estos procesos, entre ellos podemos encontrar el estrés desencadenado por la alta osmolaridad, que afecta al rendimiento de las cepas industriales. Con el paso de los años, la necesidad y el interés en la investigación de los efectos del estrés salino y los mecanismos de respuesta a este fenómeno en los diferentes organismos se han incrementado. Los objetivos de estas investigaciones se han centrado principalmente en la identificación de elementos moleculares relacionados con este fenómeno y en la obtención, mediante la utilización de ingeniería genética, de cepas de microorganismos o plantas con una mejor resistencia a la sal, que ofrezcan un mejor rendimiento que las cepas industriales convencionales (Wani S.H. et al, 2020; Thorwall S. et al., 2020; Fan T. et al., 2021). Las levaduras han sido utilizadas como organismos modelos en estas investigaciones (Locascio A. et al., 2019) cuyos resultados han servido para identificar los diferentes factores implicados en la respuesta frente al estrés salino en otros microorganismos, plantas u otros eucariotas superiores.

Aún, no se conocen por completo todos los mecanismos relacionados con la respuesta a este tipo de estrés, sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas de edición génica como CRISPR/cas9, en combinación de otras técnicas como la mutagénesis dirigida y la utilización de nuevos organismos modelos más complejos, como puede ser la levadura *Debaryomyces hansenii* suponen un gran avance para la comprensión de la respuesta frente al estrés salino.

Introducción

2. La levadura *Debaryomyces hansenii*

A lo largo de los años, uno de los organismos más utilizado como modelo en células eucariotas ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura, no solo ha sido utilizada para la producción de alimentos como el pan y vino, sino que también se ha utilizado como modelo de estudios básicos y aplicados, como es el caso de la investigación de enfermedades humanas (Nielsen J., 2019), de la respuesta al estrés salino (Locascio A. et al., 2019) o de la respuesta a agentes contaminantes del ecosistema (Braconi D. et al., 2016). Sin embargo, hoy en día se está optando cada vez de forma más frecuente por las levaduras denominadas no convencionales como organismos modelos, debido, por una parte, a las características específicas de estas levaduras y, por otra, al desarrollo de herramientas moleculares que han propiciado el aprovechamiento del potencial biotecnológico de las levaduras pertenecientes a este grupo (Rebello S. et al., 2018; Patra P. et al., 2021). Entre las levaduras no convencionales podemos destacar a *Debaryomyces hansenii* (Figura 1), que a largo de los años se ha convertido en la levadura modelo en las investigaciones sobre el estrés salino y la halotolerancia en eucariotas (Norkrans B., 1968; Adler L. et al., 1985; Prista C. et al., 2016).

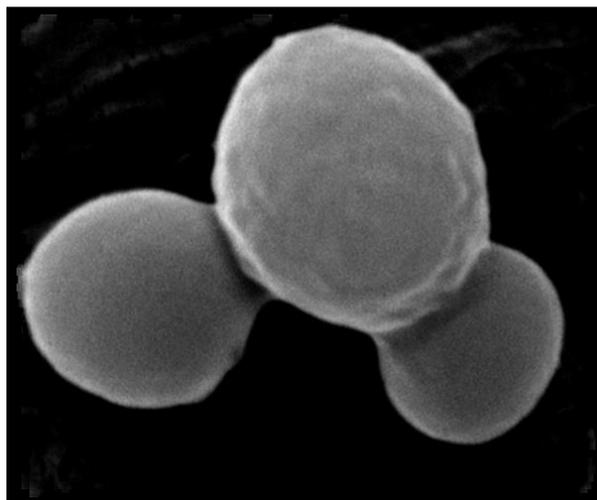


Figura 1. *D. hansenii*. Fotografía al microscopio tomada por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba.

2.1 *Debaryomyces hansenii*: Generalidades y aplicaciones biotecnológicas

D. hansenii es una levadura osmo-, xero- y generalmente considerada halotolerante (Breuer & Harms, 2006) aunque, existe cierta discordancia con este último término ya que algunos autores la consideran halófila (González-Hernández & Peña, 2002; Navarrete C. et al., 2022). Esta levadura puede ser aislada de ambientes salinos y con poca actividad acuosa como puede ser lagos salinos, agua de mar o alimentos como el queso o los embutidos (Figura 2) (Fleet G.H., 1990; Butinar L. et al., 2005).



Figura 2. Lugares donde es posible aislar a *D.hansenii*.

Es considerada una levadura no patógena, aunque se han registrado dos casos, concretamente de su anamorfo *Candida famata*, en los que actuó como agente patógeno emergente (Wagner D. et al., 2005; Pisa D. et al., 2007). Con respecto a su filogenia, *D. hansenii* es una levadura hemiascomicética perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae* (Sherman D. et al., 2004) a la cual también pertenece *S. cerevisiae*, sin embargo, se encuentra más próxima filogenéticamente a *Candida albicans* (Figura 3). De hecho, al igual que se ha descrito en *C. albicans* (Santos M.A.S. et al., 2011) el codón CUG (leucina) es traducido principalmente como serina (97%) por lo que *D. hansenii* usa un código genético alternativo (Sherman D. et al., 2004). Otra característica de su genoma es que posee mil genes más que *S. cerevisiae*, muchos de estos genes poseen funciones desconocidas, sin embargo, parte de estos genes podrían estar relacionados con la tolerancia a una alta salinidad, ya que experimentos de expresión

Introducción

heteróloga de una genoteca de *D. hansenii* en *S. cerevisiae* indicaron que las cepas mutantes fueron más resistentes a la sal que el *wild type* (Prista C. et al., 2002). Además, se ha identificado una familia de genes relacionada con la respuesta al estrés salino, cuyos transcritos aún son desconocidos y que no hay constancia de la existencia de genes ortólogos en ningún otro organismo estudiado (Ramos J. y colaboradores, no publicado).

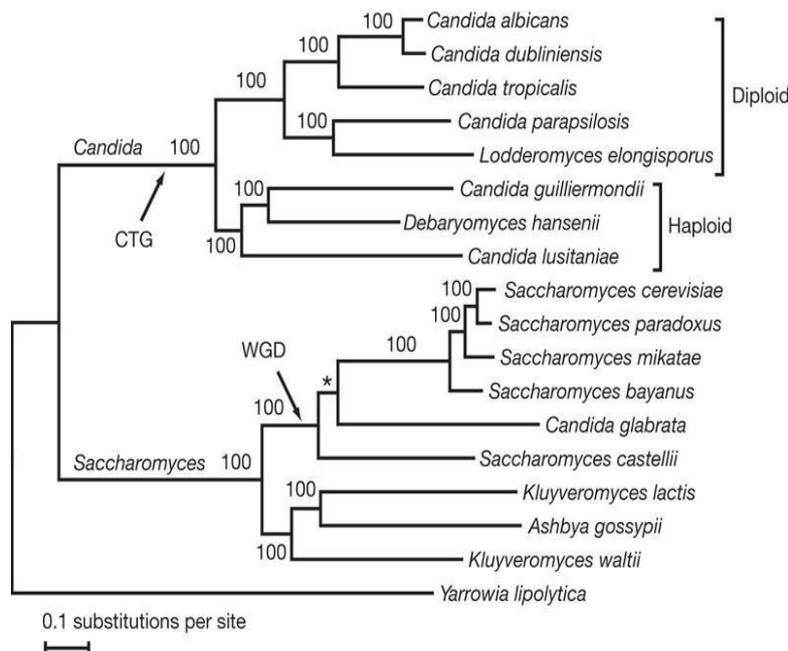


Figura 3. Relaciones filogenéticas de *D. hansenii* (Butler et al., 2009).

D. hansenii es una levadura que participa en diversos procesos biotecnológicos, entre ellos, cabe destacar su participación en la maduración de embutidos (Ramos-Moreno L. et al., 2021), debido a la implicación durante el desarrollo de las propiedades organolépticas características de estos productos (Andrade M.J. et al., 2010; Ramos J. et al., 2017; Ramos-Moreno L. et al., 2019b), en parte gracias a algunas características propias de esta levadura como, por ejemplo, la capacidad de producir exopeptidasas o su actividad lipasa (Bolumar T. et al., 2003; Takaç & Sengel, 2010). También, cabe destacar su gran potencial como agente de control biológico frente a hongos no deseados que estropean estos productos, como pueden ser, los pertenecientes al género *Penicillium* o *Aspergillus*, debido a la producción de toxinas *killer* que actúan inhibiendo la proliferación de estos hongos a lo largo de este proceso (Peromingo B. et al., 2019; Cebrián E. et al., 2022). Su papel en la maduración de embutidos no es la única

utilidad de esta levadura en la industria biotecnológica, también se utiliza para la producción de compuestos químicos como el xilitol y arabitol, dos de los edulcorantes más utilizados en la industria alimentaria (Rivas B. et al., 2003; Koganti S. et al., 2011).

Durante un largo periodo, el potencial biotecnológico de esta levadura estaba limitado por la escasa disponibilidad y eficiencia de herramientas moleculares para la manipulación genética, que junto a la falta de trabajos estandarizados provocaron grandes dificultades para la comprensión del funcionamiento de esta levadura durante el desarrollo de los distintos procesos biotecnológicos y en la identificación y obtención de cepas industriales de interés (Prista C. et al., 2016). En los últimos años, no solo se ha conseguido adaptar la metodología en protocolos de edición genética como, por ejemplo, el CRISP/CAS9 (Spasskaya D.S. et al., 2021; Strucko T. et al., 2021) sino que incluso, se han realizado ensayos estandarizados en biorreactores (Navarrete C. et al., 2021a) y se han adaptado protocolos de las varias técnicas denominadas “-ómicas” (Navarrete C. et al., 2021b), que han permitido obtener información más amplia sobre el funcionamiento de los diversos procesos en esta levadura. La adaptación de estos protocolos podría suponer un avance para la obtención y selección de cepas industriales de interés, así como la optimización de estas cepas en los diferentes procesos biotecnológicos.

2.2 Adaptaciones al estrés salino

2.2.1 Información general

Como se ha dicho anteriormente, *D. hansenii* habita ambientes hipersalinos y con poca actividad acuosa como pueden ser los lagos salinos o el agua de mar, nichos en los que esta levadura está constantemente sometida a una alta salinidad. Para mitigar el efecto de esta situación, la levadura ha desarrollado una serie de adaptaciones (Tabla 1), que a pesar de que están presentes en la mayoría de las levaduras, proporcionan a *D. hansenii* una mayor tolerancia a la sal que, por ejemplo, a *S. cerevisiae* (Prista C. et al., 2016).

Una de las adaptaciones más destacables, es la presencia de numerosos transportadores de membrana (Figura 4) principalmente Hak1 y Trk1, que permiten la regulación del contenido intracelular de K^+ y Na^+ . Estos transportadores se saturan a concentraciones

Introducción

de sal más elevadas que los presentes en otras levaduras más comunes (Norkrans & Kylin, 1969; Prista C. et al., 2007). El transportador HAK1 tiene una peculiaridad, ya que normalmente actúa como un simportador $K-H^+$, sin embargo, es capaz de transportar K^+ y Na^+ acoplados (Martínez J.L. et al., 2011). Hak1 y Trk1, no son los únicos transportadores que están presentes, por otra parte, podemos encontrar otros transportadores pertenecientes a las familias Ena (una ATPasa de sodio) y Nha (un antiportador sodio-protón) encargados de la expulsión de sodio, que se encuentran generalmente en las levaduras (Prista C. et al., 2016), y así como la presencia de diferentes transportadores situados en la membrana de algunos orgánulos, en los que se puede llegar a acumular sodio como, por ejemplo, las vacuolas o el aparato de Golgi (Prista C. et al., 2016; Herrera R. et al., 2017).

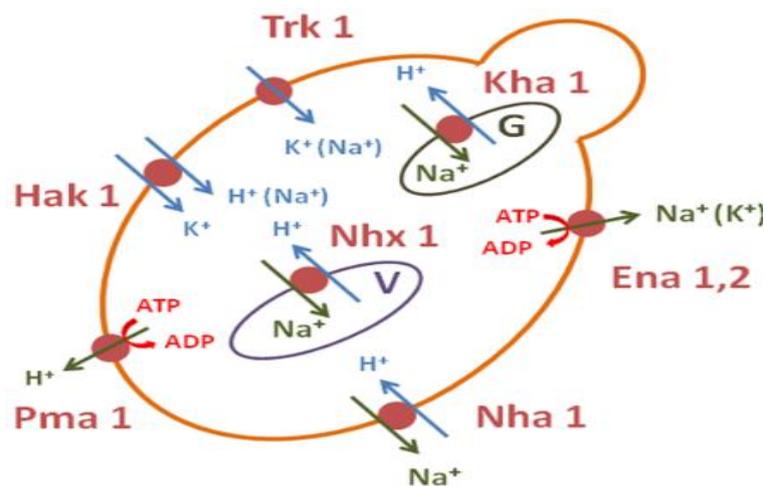


Figura 4. Modelo propuesto de los múltiples transportadores presentes en *D. hansenii* (Prista C. et al., 2016).

Aparte de los transportadores, existen otros factores involucrados en la adaptación a los medios salinos, como pueden ser las enzimas. En este caso, se ha descrito una proteína ortóloga a Hal2p, una nucleosidasa que hidroliza 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) en adenosin-5'-fosfato (AMP) y en fosfato inorgánico (Pi), que en *S. cerevisiae* juega un papel importante en la tolerancia a litio y sodio (Gläser H.U. et al., 1993), sin embargo, se ha comprobado que la Hal2p presente en *D. hansenii* es más tolerante a la sal, especialmente a las sales de litio, que en *S. cerevisiae* (Aggarwal M., et al. 2005). Asimismo, se ha identificado una enzima ortóloga a la fosfatasa Ppz que en *S. cerevisiae* es sensible al litio mientras que en *D. hansenii* es más tolerante (Minhas A. et al., 2012).

La presencia de sal provoca cambios en la composición de la membrana plasmática (Turk M. et al., 2007). Este cambio de composición implica una subida en los niveles de concentración del ergosterol, esteroles fundamental para la estabilidad, fluidez de la membrana y la regulación de los transportadores de presentes en ella (Kodedová & Sychrová, 2015), y cambios poco significativos en la composición de fosfolípidos. La presencia de altas concentraciones de sal en el medio causa un ligero incremento de la tasa de esteroides frente a los fosfolípidos, de forma que la relación esteroides/fosfolípidos en células de *D. hansenii* crecidas en estas condiciones es más similar a la calculada para otros organismos halófilos/halotolerantes y significativamente menor que a la descrita en *S. cerevisiae*. La fluidez de membrana no se ve afectada por una alta salinidad en el medio, sin embargo, se desconoce la razón exacta de este hecho, aunque, existe la hipótesis de que el aumento del grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana plasmática, en presencia de altas concentraciones de NaCl, evita la pérdida de la fluidez de membrana (Turk M., et al. 2007). La capacidad de proliferar en ambientes salinos y de mantener una baja relación esteroides/fosfolípidos posiblemente estén relacionadas, sin embargo, esta relación no se ha investigado en profundidad. Por último, cabe mencionar la producción y excreción de glicerol al medio en presencia de sal (Adler L., et al., 1985) permitiendo su acumulación en el interior celular para el mantenimiento del balance osmótico. Publicaciones posteriores demostraron que este hecho, se debe al aumento de la expresión del gen *GPD1* (Thomé P.E., 2004) cuya sobreexpresión se traduce en una estimulación de la actividad de la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa (G3PD).

Tabla 1 Resumen de las principales adaptaciones de *D. hansenii* al estrés salino

Adaptación	Descripción breve	Referencia
Transportadores de membrana	Trk1 y Hak1, así como presencia de transportadores en algunos orgánulos	Prista C., et al., 2016; Herrera R., et al., 2017
Enzimas	Proteínas ortólogas a Halp2 y ppZ más tolerantes a sal	Aggarwal M., et al., 2005; Minhas A., et al., 2012
Composición de membrana	Aumento del ergosterol y relación esteroides/fosfolípidos baja	Turk M., et al. 2007
Glicerol	Aumento de la expresión de <i>GPD1</i> y de la actividad de la G3PD	Adler L., et al., 1985; Thomé P.E., 2004

Introducción

Además de todas estas adaptaciones, la presencia de NaCl es capaz de proteger frente a factores como puede ser el pH o la temperatura, hecho que no sucede en la levadura modelo *S. cerevisiae*. Por ejemplo, cuando se someten a ambas levaduras a un rango de temperaturas supra óptimas (entre 38°C-42°C para *D. hansenii* y entre 47-49°C para *S. cerevisiae*), la mortalidad en *D. hansenii*, incluso en concentraciones muy bajas de NaCl (0,1 M), se ve drásticamente reducida (alrededor de un 75%). Esta reducción es superior a la calculada para *S. cerevisiae*, incluso en condiciones de salinidad similares. Esta disminución, se produce del mismo modo en altas concentraciones de sodio. Adicionalmente, se ha comprobado que el crecimiento de *D. hansenii* en condiciones de pH extremos (3,8 y 7,8) es mayor en presencia de NaCl y en comparación a la de *S. cerevisiae* (Almagro A. et al., 2000). Todo lo expuesto anteriormente ha contribuido a que *D. hansenii* se consolide como organismo modelo para los estudios relacionados con el estrés salino.

2.2.2 Estrés oxidativo en relación con el estrés salino

Con el fin de protegerse frente a los múltiples tipos de estrés, las levaduras han desarrollado redes complejas de respuesta, en las que los diferentes mecanismos se encuentran relacionados entre sí. Estos tipos de redes se han estudiado en la levadura modelo *S. cerevisiae*, dando a conocer algunos aspectos como, por ejemplo, que esta levadura posee un mecanismo inespecífico de respuesta para varias clases de estrés ambiental que pueden actuar tanto de forma independiente como simultáneamente (Ma N. et al., 2015; Auesukaree C., 2017).

Recientemente, se ha publicado un artículo, que a pesar de no ser el primero en tratar el tema, debido a la existencia de uno previo a este (Navarrete C. et al., 2009), si constituye un gran acercamiento para la comprensión de la relación existente entre la respuesta al estrés salino y al estrés oxidativo en *D. hansenii* (Ramos-Moreno L. et al., 2019a), y de sus diferencias con lo observado en otras levaduras, teniéndose en cuenta distintos enfoques. A nivel de proteínas, se comprobó que enzimas como la catalasa o la glutatión reductasa, que forman parte de la denominada defensa frente al estrés oxidativo, incrementaron su actividad en presencia de NaCl. Por otra parte, las proteínas extraídas de células que fueron expuestas a estrés salino presentaron un estado redox similar a las de las células expuestas a estrés oxidativo. A nivel transcripcional, se

concluyó que la presencia de NaCl y KCl en el medio provoca un incremento en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés salino como puede ser *HOG1*, que codifica una MAP quinasa que regula la transcripción de las respuestas al estrés salino por alta osmolaridad (HoG), y *CAT1*, que codifica la catalasa peroxisomal. La regulación de *HOG1* se llevó a cabo de manera diferente a lo estudiado en *S. cerevisiae*, ya que en esta se produce postranscripcionalmente mediante fosforilación (Ma & Li, 2013; García-Neto W. et al., 2017), mientras que, en *D. hansenii* se reguló a nivel transcripcional. Otra diferencia presente en esta levadura es que *CAT1* se estimuló en presencia de sal, hecho que no ocurre en otras levaduras (Segal-Kischinevzky C. et al., 2011). Por otra parte, se estudiaron otros genes como son *GSH*, *TRX2* y *MSN2*, cuyos transcritos se encuentran relacionados con la respuesta a estrés salino. Cabe destacar que la sobreexpresión de los genes más notable siempre se produjo en presencia de NaCl. Por último, se analizó los posibles cambios en otros genes de interés como pueden ser *ENA1*, que codifica un transportador de membrana, y *RCN1*, que codifica un inhibidor ligado a diferentes tipos de estrés como el osmótico o el térmico en otras levaduras. La transcripción del gen *ENA1* fue estimulada en presencia de sales, pero no por los agentes inductores del estrés oxidativo, mientras que, la transcripción del gen *RCN1* solo fue estimulada por factores que inducen estrés oxidativo.

En el enfoque metabólico, los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron similares entre células sometidas a estrés salino y células sometidas a estrés oxidativo. En este estudio se realizaron otros ensayos a niveles más fisiológicos como puede ser el análisis de la acumulación de iones, la cual fue favorecida en presencia de agentes inductores del estrés oxidativo, este hecho junto a la falta de estimulación en la transcripción de *ENA1* en condiciones de estrés oxidativo, sugiere la presencia de metabolitos intermediarios comunes para ambos tipos de estrés.

Como se ha dicho anteriormente, esta publicación supone el primer gran acercamiento para comprender la relación entre los múltiples tipos de estrés que pueden afectar a *D. hansenii*, sin embargo, como pasa en el resto de las levaduras, los distintos factores involucrados en estas redes de respuestas no se encuentran totalmente descritos y es necesario seguir investigando las relaciones entre las diversas vías de respuesta a los tipos de estrés.

Introducción

2.2.3 *Debaryomyces hansenii* y las técnicas “-ómicas”

A lo largo de los años, se han realizado múltiples aproximaciones centradas en los cambios en el metabolismo durante la exposición de *D. hansenii* a una alta salinidad. En estos estudios, se han realizado teniendo más en cuenta un enfoque más fisiológico, dejando en un segundo plano a las diferentes técnicas “-ómicas”, como pueden ser la proteómica o la transcriptómica.

Durante mucho tiempo, únicamente existían dos publicaciones centradas exclusivamente en la proteómica. El primero de ellos, se centró en los posibles cambios en el proteoma tras la exposición de *D. hansenii* a NaCl durante 3 horas (Gori K. et al., 2007), los resultados sugirieron que la exposición a dicha sal produce un cambio en el metabolismo hacia una mayor producción de glicerol debido al incremento de las proteínas relacionadas con el metabolismo de este y con las primeras etapas del glucólisis, junto a una represión de las enzimas relacionadas con las etapas tardías de la glucólisis y del ciclo de Krebs. El segundo trabajo, se realizó un análisis del proteoma durante el crecimiento en diferentes concentraciones altas o limitantes de potasio (Martínez J.L. et al., 2012). Los resultados de este artículo mostraron cambios en proteínas previamente estudiadas (Gori K. et al., 2007). Estos resultados también sugirieron un incremento en proteínas relacionadas con el estrés como pueden ser las chaperonas durante el crecimiento en concentraciones limitantes de potasio.

Recientemente, se ha publicado un artículo en el que se abarcan diversas técnicas “-ómicas” como pueden ser, proteómica, transcriptómica y por primera vez en esta levadura, fosfoproteómica (Navarrete C. et al., 2021b). Este trabajo, junto al realizado en biorreactores por parte del mismo grupo de investigación, supone un avance para el entendimiento de las respuestas a estrés salino de *D. hansenii* (Navarrete C. et al., 2021a; Navarrete C. et al., 2021b).

Primero de todo hay que señalar que estos experimentos se realizaron con células previamente adaptadas al estrés salino. Los análisis mediante RNA-seq y del proteoma realizados mostraron un incremento tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico del metabolismo aerobio, así como de otros procesos relacionados como la captación de glucosa, fosfatos, zinc o hierro. Otros aspectos relacionados con la respuesta a la sal como la regulación y la actividad de los múltiples transportadores de membrana fueron

estudiados, mostrando, un aumento de la expresión de algunos genes como, por ejemplo, *ENA1* y *KHA1*, así como una mayor presencia de los respectivos transportadores Ena1 y Kha1 (un antiportador presente en el aparato de Golgi), sin embargo, no se produjeron cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican *TRK1* y *HAK1* ni en la presencia de los correspondientes transportadores debido a que las células se encontraban previamente adaptadas a una alta salinidad. Los resultados sugirieron la existencia de un transportador aún no caracterizado (B5RUG) que está involucrado en la respuesta a una alta concentración de sodio. Los análisis en la transcripción de los genes *PHO84* y *PHO89*, que codifican un transportador de alta afinidad de fosfato inorgánico (Pi) y un transportador Na⁺/fosfato respectivamente, mostraron una mayor sobreexpresión en presencia de sodio en el medio que en presencia de potasio. La transcripción de genes relacionados con otros procesos celulares, como el caso de la esporulación se vio reprimida en presencia de ambas sales.

Más allá de los genes que codifican los distintos transportadores en esta levadura, la transcripción de otros genes, cuyas funciones siguen siendo desconocidas, fue estimulada por la presencia de sodio o potasio en el medio. Esta estimulación fue diferente para cada tipo de sal, mostrando así algunas diferencias entre la respuesta a sodio y la respuesta a potasio. Los análisis del fosfoproteoma realizados indicaron que la respuesta a una alta concentración de sodio está más coordinada e implica una mayor regulación de la actividad de las proteínas mientras que, la respuesta a la presencia de una alta concentración de potasio es más vasta y poco regulada. De esta publicación se ha concluido, entre varias cosas, que el cloruro de sodio (NaCl) es la sal que más favorece, desde todos los niveles estudiados, el crecimiento de esta levadura (Navarrete C. et al., 2021b).

La respuesta al estrés salino constituye un sistema complejo en el que varios elementos se ven implicados, a pesar de los recientes avances realizados en la adaptación de la metodología, y de los resultados obtenidos en los últimos estudios, todavía quedan aspectos por conocer del efecto de las diferentes sales sobre *D. hansenii*.

2.3 Metabolismo

El metabolismo de *D. hansenii* se ha estudiado a lo largo de los años, sin embargo, debido a la gran heterogeneidad de los ensayos realizados (cepas, crecimiento, tratamiento de sal...) existen una serie de contradicciones entre los distintos autores. Un ejemplo de una de estas contradicciones reside en la capacidad fermentativa de esta levadura, ya que hay autores que afirman que *D. hansenii* posee capacidad fermentativa y que esta se ve incrementada en presencia de sales (González-Hernández J.C. et al., 2005) mientras que, otros concluyen que la capacidad fermentativa es nula y su metabolismo es completamente aerobio (Gancedo & Serrano, 1989; Breuer & Harms, 2006). También, varios autores han analizado los posibles efectos de la sal sobre el metabolismo aerobio y han concluido que la sal produce un aumento de la aerobiosis. Este hecho se ve reflejado en una mayor tasa de respiración y una mejora en el crecimiento celular (Thomé-Ortiz P.E. et al., 1998; Breuer & Harms, 2006).

En la actualidad, las observaciones más relevantes sobre el metabolismo en relación con el estrés salino han sido llevadas a cabo por el grupo de investigación del Dr. Antonio Peña de la Universidad de Méjico. Estas observaciones son fruto de la realización de tres estudios cuyos resultados fueron publicados en tres artículos. En la primera publicación, se realizó una comparación con *S. cerevisiae* de algunos parámetros metabólicos, como puede ser la producción de etanol. Los resultados obtenidos indicaron que *D. hansenii* posee capacidad fermentativa, no obstante, es mucho menor a la de *S. cerevisiae*. Por lo que los autores concluyeron que *D. hansenii* posee un metabolismo mayoritariamente aerobio, y no uno completamente aerobio como describían algunos autores (Sánchez N.S. et al., 2006). Sin embargo, en la actualidad, estos resultados no han podido ser confirmados por otros grupos de investigadores (Navarrete C. et al., 2021a). En el segundo artículo de este grupo, se realizaron varios experimentos con la finalidad de analizar los posibles cambios de la actividad de varias enzimas relacionadas con procesos metabólicos como son la glucólisis, el ciclo de Krebs y el ciclo de ácido glicólico, en células que fueron expuestas a altas concentraciones (1M) de KCl o NaCl. Adicionalmente, se comprobó los posibles cambios en la concentración de algunos metabolitos relacionados con estas rutas metabólicas, así como en los niveles de fosfatos. De los resultados publicados, hay que destacar que se produjo una

acumulación de metabolitos como el succinato y el fumarato, este hecho acompañado de la disminución de las actividades de enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs como la Isocitrato deshidrogenasa, fueron las bases en los que los autores se apoyaron para proponer un cambio en el patrón metabólico a favor del ciclo del glioxilato en células que fueron expuestas a 1M KCl o 1M NaCl, sin embargo, no dejaron claro la relevancia de este hecho. Otro resultado, cuya relevancia tampoco fue aclarada, fue el incremento de los niveles de fosfato en estas condiciones (Sánchez N.S. et al., 2008) En el tercer y último artículo se realizó una serie de ensayos con el fin de observar cambios en la expresión de genes relacionados con varios procesos fisiológicos como, por ejemplo, el metabolismo o el ciclo celular tras someter a *D. hansenii* a diferentes condiciones de salinidad y pH. Esta observación se llevó a cabo mediante la realización de múltiples microarrays, los cuales sugirieron que una alta salinidad y un alto valor de pH provoca una represión en la mayoría de los genes relacionados en procesos celulares como la respiración, la glucólisis y en algunos genes relacionados con el ciclo celular. Este hecho se tradujo en una baja tasa de crecimiento y supervivencia de esta levadura provocando una disminución en las Unidades Formadoras de Colonias tras exponer a las células a estas condiciones. Por último, los autores concluyeron que a pesar de que *D. hansenii* puede tolerar condiciones de alta salinidad y pH alcalinos, su comportamiento fisiológico óptimo se produce en ausencia de sales y pH 6,0, clasificando a *D. hansenii* como una levadura alcalino-halotolerante y no halofílica (Sánchez N.S. et al., 2018).

Estos tres artículos constituyen un amplio análisis sobre el metabolismo en *D. hansenii* y arrojan luz sobre el funcionamiento de esta levadura, en distintas condiciones de salinidad y pH, sin embargo, la metodología llevada a cabo en estos trabajos no sería la óptima, ya que las condiciones en la que se llevan a cabo ponen en duda su interpretación fisiológica y reproducibilidad: La temperatura de crecimiento es 30°C, temperatura considerada supra óptima para esta levadura, siendo 26°C la temperatura óptima. Otro inconveniente es la utilización de medios de cultivo cuya composición difiere de la generalmente utilizada en este tipo de estudios. Por último, tanto las sales y el rango de sus concentraciones utilizadas en estos ensayos son limitadas, centrándose exclusivamente en el cloruro de potasio (KCl) y cloruro de sodio (NaCl), sales conocidas por poseer un efecto beneficioso sobre la levadura.

Introducción

2.3.1 El ciclo del ácido glioxílico

Uno de los hechos con mayor relevancia de los trabajos previamente nombrados es el cambio en el patrón metabólico a favor del ciclo del ácido glioxílico en presencia de KCl o NaCl. El ciclo del ácido glioxílico (o ciclo del glioxilato) es una ruta metabólica que consiste en la utilización de citrato (en forma de acetil-CoA) como fuente de carbono para la síntesis de azúcares. Este ciclo comienza con la fragmentación del isocitrato en succinato (compuesto de 4 carbonos) y glioxilato (compuesto de 2 carbonos) mediante la acción de la isocitrato liasa (ICL). Posteriormente, el acetil-CoA dona un grupo acetilo al glioxilato, que se convierte en malato tras una reacción catalizada por la malato sintasa (MS), mientras que, el succinato es metabolizado de forma similar que en el ciclo de ácido tricarboxílico hasta malato. Por último, el malato se deshidrogena a oxalacetato (obteniéndose dos moléculas de este compuesto) que es utilizado en el proceso de la gluconeogénesis (Figura 5). Por cada vuelta de este ciclo se produce una molécula de flavín adenín dinucleótido hidruro (FADH₂) y una molécula de nicotinaminada adenina dinucleótido hidruro (NADH) (Kornberg H.L., 1966; Dolan & Welch., 2018).

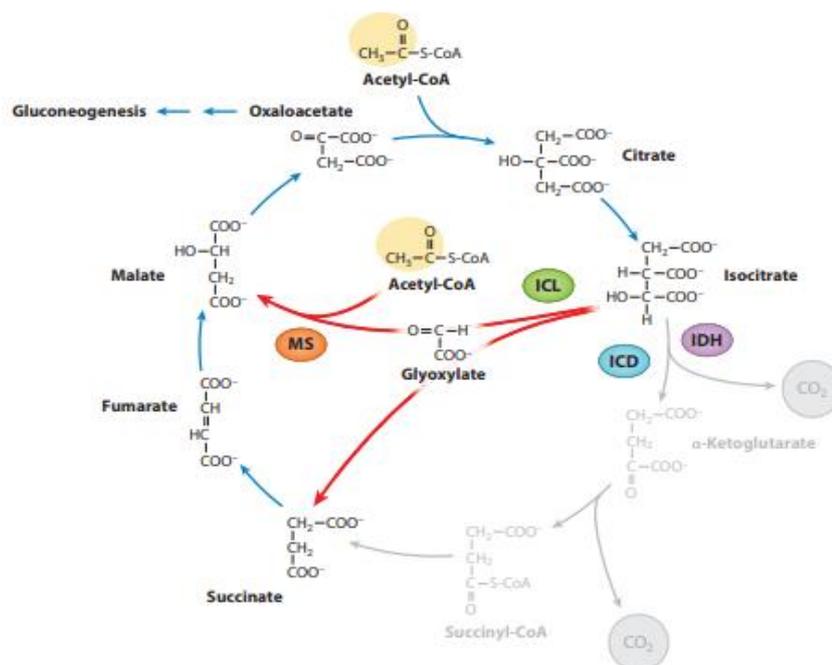


Figura 5. Esquema general del Ciclo del ácido glioxílico (Dolan & Welch.,2018).

Este ciclo está presente en bacterias, plantas y levaduras, no hay constancia de su presencia en animales, sin embargo, se han identificado genes que codifican enzimas relacionadas con este ciclo durante los estadios larvarios de algunos nematodos (Kondrashov F.A. et al., 2006). A pesar de que, el ciclo de glioxilato se considera un *bypass* del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para el anabolismo de azúcares a partir de compuestos de carbono más simples (Figura 5) (Kornberg H.L., 1966; Dolan & Welch., 2018), este ciclo podría tener otras implicaciones relacionadas con la respuesta a los diferentes agentes inductores de estrés, por ejemplo, se ha observado que como respuesta al estrés oxidativo en *Pseudomonas aeruginosa*, se produce una sobreexpresión de genes relacionados con el ciclo de glioxilato como, por ejemplo, *aceA* (que codifica la enzima Isocitrato liasa) (Ahn S. et al., 2016). De igual manera, se ha descrito en bacterias marinas que la deficiencia de hierro provoca la estimulación de dicho ciclo como respuesta (Koedooder C. et al., 2018). En levaduras como, por ejemplo, en *S. cerevisiae*, durante el desarrollo del proceso de envejecimiento celular, se produce un aumento en las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo del glioxilato, mientras que, las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs se ven reprimidas (Samokhvalov V. et al., 2004). Otro ejemplo en levaduras es la estimulación del ciclo del ácido glioxílico en *Candida glabrata*, durante el proceso de infección invasiva, en el cual se produce una sobreexpresión de los genes *ICL1* y *MLS1* que codifican las enzimas Isocitrato liasa y Malato sintasa respectivamente, enzimas claves en el ciclo de glioxilato. Asimismo, la patogenicidad se ve reducida en cepas mutantes de esta levadura con el gen *ICL1* deletado (Chew S.Y. et al., 2019). Este hecho, es similar al observado en otras especies del género *Candida* como puede ser el caso de *C. albicans*, en la cual, los mutantes $\Delta ICL1$ y $\Delta MLS1$ muestran una menor patogenicidad con respecto al *wild type* (Lorenz & Fink, 2001).

En organismos superiores como las plantas se sospecha que la Isocitrato liasa juega un papel importante en la respuesta al estrés salino (Yuenyong W. et al., 2019), ya que una alta concentración de NaCl en el medio, provoca un incremento en los niveles de expresión del gen *OsCIL*, que codifica la enzima Isocitrato liasa en la planta de arroz, igualmente se ha podido comprobar que mutantes de *Arabidopsis thaliana* con el gen

Introducción

AtICL, que codifica la enzima Isocitrato liasa, delecionado muestran un peor crecimiento en presencia de NaCl que el *wild type*.

En general, el ciclo de glioxilato está relacionado con varios tipos de estrés o condiciones en todos los organismos en el que se encuentra presente. Existen varias publicaciones sobre esta relación, que convergen hacia la misma conclusión general de que el ciclo del glioxilato contribuye a la adaptación de estos seres a las múltiples situaciones de estrés, sin embargo, sigue siendo necesario profundizar en este tema. En la levadura *D. hansenii*, la relación entre el ciclo del glioxilato y el estrés salino se encuentra vagamente descrita. Los artículos publicados del grupo de Dr. Peña constituyen el único aporte científico realizado en relación con este aspecto, por lo que, sería necesario investigar de forma más detallada la activación del ciclo del glioxilato como posible mecanismo de respuesta de esta levadura frente al estrés salino. Estas aproximaciones deberían realizarse siguiendo una metodología optimizada y que permita la comparación del efecto de los diversos tipos de sales y de un amplio rango de concentraciones de estas.

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio a nivel fisiológico, bioquímico y transcripcional de la respuesta al estrés salino en *D. hansenii* provocado por algunos cationes alcalinos como son el sodio y litio, constituyendo así una aproximación global a este fenómeno. Como resultado general de este trabajo, se ha demostrado que tanto la respuesta y el efecto del sodio y del litio sobre esta levadura son completamente heterogéneos.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es obtener información de diferentes factores implicados en la respuesta a estrés salino en *Debaryomyces hansenii*. Con esta finalidad se ha abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de la salinidad inducida por sodio o litio sobre diferentes procesos fisiológicos y sobre la homeostasis iónica en *D. hansenii*.
2. Estudiar la influencia del pH, sobre la tolerancia a sodio y litio.
3. Analizar aspectos básicos del metabolismo de *D. hansenii* en presencia de sal, como es el consumo de glucosa o la capacidad fermentativa.
4. Determinar cambios en las diferentes rutas metabólicas en respuesta al estrés salino inducido por sodio y litio.

Material y métodos

Material y métodos

1. Material biológico.

Durante el desarrollo de la tesis se ha utilizado como organismo base la cepa silvestre CBS767 de la levadura *Debaryomyces hansenii*, proporcionada por la colección de Holanda "Central Bureau von Schimmelculturess" (<https://wi.knaw.nl/>).

2. Medio de cultivos

A lo largo de este trabajo se han utilizado diferentes medios cultivos para el crecimiento, el mantenimiento y la realización de los distintos experimentos.

Tanto para el crecimiento de *D. hansenii* como para la realización de la mayoría de los experimentos se utilizó el medio Yeast Nitrogen Base completo (YNBc) cuya composición es (Sherman F., 2002):

- 1,75 g/L de YNB completo (Difco)
- 20 g/L de glucosa

Cuando fue necesario se añadió agar al 2% para preparar el medio en su versión sólida. Este medio fue suplementado con diferentes concentraciones de NaCl, LiCl y combinaciones de LiCl con KCl o NaCl para la realización de los diferentes ensayos.

Tanto en el estudio del efecto de pH y de las condiciones limitantes sobre la tolerancia al sodio y al litio y el estudio del flujo de cationes se utilizó el medio Yest Nitrogen Base-Formidium (YNB-F) con el fin de poner en ayuno de potasio a las células, es decir, crecerlas en condiciones limitantes de potasio. Este medio es ideal para el proceso de ayuno ya que contiene condiciones limitantes de potasio y cuya composición es:

- 1,75 g/L YNB-Formidium™
- 20 g/L Glucosa
- 4 g/L Sulfato de amonio

El pH fue ajustado a 5,8 con hidróxido de amonio (NH₄OH) en ambos medios. Aparte, el YNB-F se ajustó a pH a 4,5 con ácido clorhídrico (HCl) y 7,0 con hidróxido de amonio (NH₄OH) cuando fue necesario. Para el mantenimiento de las cepas se utilizó el medio Yeast Peptone Dextrose (YPD) cuya composición es (Sherman F., 1991):

- 20 g/L de glucosa
- 10 g/L de extracto de levadura
- 20 g/L de peptona
- 20 g/L de agar

Este mantenimiento se realizó en medio sólido, la operación se repetía de forma semanal y las placas de Petri con los microorganismos se mantenían a 4°C. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave, a temperatura de 120°C y 1 atm de sobrepresión durante 20 minutos.

3. Tampones

A lo largo de este trabajo se han empleado diferentes tampones cuya composición se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tampones y soluciones utilizados en los diferentes experimentos

Experimento	Tampones o soluciones	Composición
Flujo de cationes	MES	Ácido-2-[N-Morfolino] etanosulfónico 10mM MgCl ₂ 0,1 mM Ajustado el pH a 5,8 añadiendo Ca(OH) ₂
Rotura celular	Tris-HCl	Tris 10 mM Ajustado el pH a 5,8 añadiendo Ca(OH) ₂
Ensayos enzimáticos	TEA	Clorhidrato de Trietanolamina 40 mM Ajustado el pH a 7,6 añadiendo NaOH
	MOPS	Ácido 3- (N-morpholino)-propanesulfónico sal de sodio 40 mM Ajustado el pH a 7,0 con HCl
	Imadazol	Imadazol 50 mM HCl 25 mM Ajustar pH a 8,0 con HCl
Análisis a nivel de transcripción	Tampón de lisis	2 % Triton X-100 1 % SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl ajustado a pH 8,0 con HCl 0,1 mM EDTA ajustado a pH 8,0 con NaOH
	TE	Tris 10 mM, ajustado a pH 8,0 con HCl EDTA 1 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH
	TAE 50X	Tris 2 M, ajustado a pH 8,0 con HCl EDTA 50 mM, ajustado a pH 8,0 con NaOH Ácido acético 1 M
	Agua DEPC	Dietilpirocarbonato 0,1% Agitado durante 4 horas Esterilizado en autoclave 2 veces

Material y métodos

Los tampones utilizados en los diferentes experimentos se conservaron en frío hasta el momento de su uso. El tampón MES fue suplementado con 2% de glucosa antes de su utilización.

4. Análisis del efecto del catión litio sobre el crecimiento y viabilidad de *Debaryomyces hansenii*

Con el fin de analizar el efecto del catión litio sobre el crecimiento de *D. hansenii* se realizaron tres modalidades de experimentos: El primer tipo de experimento se realizó en medio sólido mediante test de goteo con diluciones seriadas, el segundo se realizó en medio líquido observando el crecimiento de la levadura mediante espectrofotometría a lo largo del tiempo. Por último, se realizó un estudio de la viabilidad de las células tras entrar en contacto durante un determinado tiempo con LiCl. En estos experimentos las sales de sodio y potasio se utilizaron como control.

4.1 Análisis del crecimiento en medio sólido. Test de goteo

Este tipo de experimento se realizó para determinar de manera cualitativa el efecto del catión litio sobre *Debaryomyces hansenii*. Para ello se partió de un precultivo de la levadura en YNBc que fue incubado a 26° C y 150 rpm durante al menos 48 horas, pasado ese tiempo las células fueron recolectadas mediante centrifugación durante 4 minutos a 4°C y 2000 g, fueron lavadas dos veces con agua destilada fría estéril y se resuspendieron hasta obtener una absorbancia a 600 nm (A_{600nm}) de 1. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril 1:10, 1:100, 1:1000. De cada dilución se inocularon 5 µL en placas de YNBc suplementadas con diferentes concentraciones de KCl, NaCl, LiCl y en una placa sin ningún tipo de sal añadida que actuó como control.

Para analizar el efecto de los cationes potasio y sodio sobre el posible efecto del litio en el crecimiento de la levadura las diluciones anteriormente realizadas se inocularon en placas de YNBc suplementadas con combinaciones de concentraciones de KCl o NaCl y diferentes concentraciones de LiCl.

Por último, se analizó el efecto del pH y de las condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a sodio y litio. Para ello, las diluciones anteriormente realizadas se inocularon en placas de YNB-F a pH 4,5; 5,8 y 7,0 y con diferentes concentraciones de NaCl y LiCl

Todas las placas se incubaron a 26° C durante 48 horas para permitir el crecimiento de las células, y se tomaron imágenes del resultado.

4.2 Análisis del crecimiento en medio líquido. Curvas de crecimiento

Para complementar los resultados obtenidos en el test de goteo, también se analizó de manera cuantitativa el efecto del litio sobre el crecimiento en medio líquido mediante la realización de curvas de crecimiento.

Para ello se partió de un precultivo cuyas condiciones de crecimiento fueron explicadas en el apartado anterior, las células fueron recolectadas mediante centrifugación durante 4 minutos a 4°C y 2000 g, luego fueron lavadas y resuspendidas en agua estéril fría. Se midió la A_{600} de dicha suspensión de células y con la medida obtenida se realizaron los cálculos necesarios para inocular la misma cantidad inicial de células ($A_{600nm}=0,06$) en matraces de YNBc suplementados con KCl, NaCl y LiCl, además de un matraz sin ningún tipo de sal adicionada que actuó como control del experimento.

Para determinar el efecto de los cationes potasio y sodio sobre el efecto del litio en el crecimiento de la levadura, se inocularon aparte matraces de YNBc suplementados con combinaciones de concentraciones de KCl o NaCl y diferentes concentraciones de LiCl similares a las del apartado anterior.

Por último, para determinar el efecto del pH y las condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a litio, se inocularon matraces de YNB-F a pH 4,5; 5,8 y 7 suplementado con diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.

Una vez inoculados los matraces se dejaron incubando durante al menos 12 horas a 26°C y 150 rpm, a partir la cuales se siguió el crecimiento celular mediante espectrofotometría (A_{600nm}) de forma periódica durante al menos 12 horas.

Material y métodos

4.3 Ensayo de toxicidad. Viabilidad

Una vez determinado el efecto del catión litio sobre el crecimiento de *D. hansenii* se quiso determinar la viabilidad de células expuestas a este catión a diferentes tiempos.

Para ello, se partió de varios precultivos de células crecidos en condiciones anteriormente explicadas, hasta que estos alcanzaron un determinado momento de crecimiento celular correspondiente a un valor de A_{600nm} de 0,2. Una vez alcanzado dicho valor de A_{600nm} , se adicionó diferentes concentraciones de NaCl o LiCl a cada uno de los precultivos.

Posteriormente, se tomó 1 mL de cada uno de los matraces a las 0 y 24 horas tras la adición de estas sales y se realizaron diluciones hasta 1:1000, las cuales se inocularon en placas de YNBc sin ningún tipo de sal añadida. El inóculo se extendió con un asa de Digralsky y las placas se incubaron en una estufa a 26°C durante 48 horas. Tras la incubación, se determinó el efecto sobre la viabilidad mediante el conteo de las Unidades de Formadoras de Colonias (UFC) en cada una de las placas.

5. Métodos bioquímicos

A continuación, se resume la metodología seguida en los diversos análisis bioquímicos realizados a lo largo de este trabajo.

5.1 Análisis del contenido intracelular y del flujo de cationes

El análisis de la acumulación o la pérdida de cationes se determinó mediante el estudio del contenido de cationes en la célula. Los tiempos de toma de muestras se ajustaron en función al tipo de ensayo.

5.1.1 Contenido intracelular de potasio, sodio y litio

El contenido intracelular de potasio, sodio y litio de *D. hansenii* fue estudiado mediante la inoculación de esta levadura en diferentes matraces de YNBc suplementado con diversas concentraciones de KCl, NaCl, LiCl y un matraz sin ningún tipo de sal añadida, que actuó como control. Estos matraces se incubaron a 26°C y 150 rpm hasta que alcanzaron un intervalo de A_{600nm} entre 0,3-0,7. Una vez alcanzaron este intervalo, se tomaron distintas muestras de 1 ml en el caso del potasio y el sodio, y de 5 mL en el caso del litio que se filtraron en filtros Milipore AAWP de 0,8 μm de diámetro y se lavaron

con una solución 20 mM de $MgCl_2$. Adicionalmente, se realizó un segundo lavado llevado a cabo mediante arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro. El contenido celular fue obtenido mediante lisis ácida de las células retenidas en los filtros con 5 mL de una solución de 0,2 M de HCl y 10 mM de $MgCl_2$ durante al menos 3 horas en frío.

Posteriormente se centrifugaron los extractos (4.500 g, 2 minutos) con el fin de separar los restos celulares. Por último, se midieron las concentraciones de cationes presentes en los extractos mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian). El contenido de estos cationes se expresó en nmoles del catión por mg de peso seco de células (Navarrete C. et al., 2010; Ramos J. et al., 1990).

5.1.2 Flujo del catión Litio

El flujo del catión litio hacia el interior celular fue determinado mediante la realización de experimentos de transporte de entrada de dicho catión en células ayunadas de potasio.

A partir de un cultivo de YNBc, cuya composición se indica en el *Apartado 2 de Materiales y Métodos*, se obtuvieron células (48h, 26°C y en agitación) que fueron centrifugadas (2000g, 4°C, 4 minutos), lavadas dos veces con agua MiliQ estéril fría y resuspendidas en YNB-F, medio con concentraciones limitantes de potasio, tal y como se comenta anteriormente (*Apartado 2 de Materiales y Métodos*), para su ayuno durante 3 horas de acuerdo con protocolos establecidos (Ruiz-Castilla F. et al., 2021).

Una vez pasado el tiempo de ayuno, la entrada de litio se determinó mediante la resuspensión de células ayunadas a una $A_{600nm} = 0,3$ en 50 mL de tampón MES, al cual se le añadió una concentración de 0,25 M de LiCl. Cuando se estudió el efecto de los cationes potasio y sodio sobre la entrada del catión en células ayunadas, estas se resuspendieron en condiciones similares a las anteriormente descritas en tampón MES, al cual se añadió una concentración concreta de KCl o NaCl y una concentración de 0,25 M de LiCl. En ambos casos se recogieron 5 mL de muestra de forma periódica tras la exposición al catión o combinaciones de cationes, y se procedió a su filtrado en filtros Milipore de 0,8 μm de forma similar a la explicada en el apartado anterior. Las muestras se depositaron en frío durante al menos tres horas y una vez pasado ese tiempo se centrifugaron y se midieron mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Material y métodos

5.2 Determinación de niveles de fosfatos

El análisis de los niveles de fosfatos se realizó en células crecidas en YNBc suplementado con KCl, NaCl y LiCl cuando están alcanzaron unos valores de A_{600nm} entre 0,5 y 0,7. Los niveles de fosfato fueron determinados siguiendo el protocolo establecido por Fiske y Subbarow (1925) modificado por Sanui H. (1974), este se basa en la cuantificación a una absorbancia a 310 nm (A_{310nm}) del ácido fosfomolibdico (PMA) formado por la reacción de los fosfatos inorgánicos con el ácido molibdico. Los fosfatos inorgánicos fueron extraídos tratando a las células con 10% de ácido tricloroacético (TCA) en frío y centrifugando, se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril y se le añadió 100 μ L de PMA y 500 μ L de acetato de butilo. Posteriormente, se homogenizó el tubo eppendorf y se centrifugó durante 1 minuto a 2000 g y el sobrenadante se midió espectrofotométricamente a una A_{310nm} .

Los resultados obtenidos se extrapolaron a una recta patrón elaborada con diferentes concentraciones de KH_2PO_4 y se expresaron en mmol Pi/mg proteína. Para ello, las proteínas presentes en el pellet se midieron mediante ensayo del ácido bicinónico (BCA) (Thermo Scientific™, EE.UU.) (Smith P.K. et al., 1985). Este ensayo consistió en la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ provocada por la presencia de proteínas. El Cu^+ es capaz de reaccionar con el BCA y formar un complejo púrpura medible a una absorbancia a 562 nm (A_{562nm}). Los valores de proteínas fueron calculados a través de una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de Seroalbúmina bovina (BSA).

5.3 Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se realizó siguiendo el protocolo establecido por Steels et al., (1994). Este protocolo se basa en hacer reaccionar una concentración conocida de ácido tiobarbitúrico con productos derivados de la lipoperoxidación y cuantificar los productos formados de dicha reacción a una absorbancia a 532 nm (A_{532nm}). Los productos derivados de la lipoperoxidación se obtuvieron de células que crecieron en condiciones similares a las descritas en el *Apartado 5.2 de Materiales y Métodos*. Las células obtenidas fueron resuspendidas en 200 μ L de TCA al 10% y 200 μ L de PBS y se agitaron vigorosamente en un “vortex” durante 20 segundos con arena de 0,3 mm de diámetro. El proceso se repitió durante seis ciclos con intervalos de 20 segundos de hielo.

Con el fin de separar los extractos celulares de los restos celulares y la arena, se centrifugó a 2000 g durante 3 minutos. El sobrenadante se traspasó a un tubo eppendorf estéril al que se le añadieron 100 μ L de 0,1 M EDTA y 600 μ L de una solución al 1 % (w/v) de ácido tiobarbitúrico en 0,05 M NaOH. El tubo se incubó durante 15 minutos a 70°C, tras enfriamiento, se midió la A 532 nm. Las proteínas presentes en el pellet se midieron mediante ensayo del BCA (Thermo Scientific TM, EE.UU.) (Smith P.K. et al.,1985), el principio de este ensayo ya se ha explicado con anterioridad.

Los resultados obtenidos se extrapolaron a una recta patrón elaborada con diferentes concentraciones de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP).

5.4 Ensayo de actividades enzimáticas

En este trabajo se han determinado los cambios en actividades de enzimas relacionadas con la glucólisis, el ciclo del Ácido Cítrico y del ácido glioxílico debido al estrés salino provocado por NaCl y LiCl. Para ello, se sometieron a las células a diferentes concentraciones de estas sales y se realizaron los análisis de actividades enzimáticas según los protocolos establecidos.

5.4.1 Preparación de extractos celulares

Con el objetivo de analizar los posibles cambios en la actividad de enzimas de interés, se preparó un precultivo de células que creció en las condiciones previamente descritas hasta que alcanzó la fase exponencial ($A_{600nm}=0,5-0,7$). Una vez alcanzado dicho intervalo de absorbancia se adicionó al precultivo diferentes concentraciones de NaCl o LiCl y se dejó en incubación hasta los diferentes tiempos de recolección. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 2000 g durante 4 minutos a 4°C, lavadas con agua fría estéril, concentradas en tubos eppendorf y almacenadas a -80°C hasta la preparación de los extractos celulares.

La preparación de extractos celulares se realizó mediante la resuspensión de las levaduras en 10 mM Tris-HCl pH 7,4 y la agitación de forma vigorosa en un “vortex” durante 1 minuto con arena de 0,3 mm de diámetro. El proceso se repitió con intervalos de 1 minuto en hielo hasta que las células fueron rotas, lo cual se comprobó al microscopio.

Material y métodos

Con el fin de separar los extractos celulares de los restos y de la arena se realizó una centrifugación (2000 g, 4°C, 15 minutos) y el sobrenadante fue depositado en tubos eppendorf estériles, que fueron almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización.

5.4.2 Análisis de actividades enzimáticas

Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro DU 650 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.), de acuerdo con los protocolos establecidos para cada una de las enzimas analizadas.

La actividad de la Hexoquinasa (HK) se determinó mediante la aparición de NADPH formado por la reacción acoplada de D-glucosa a glucanato-6-fosfato, este proceso se puede seguir espectrofotométricamente a 340 nm. Esta reacción se llevó a cabo en tampón 40 mM de TEA a pH 7,6, 8 mM de MgCl₂, 1 mM de NADP⁺, 0,65 mM de ATP y 1 U/mL de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Bergmeyer H.U. et al., 1985).

La actividad de la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) se determinó siguiendo el protocolo indicado por el kit comercial "GAPDH Activity Assay Kit" de Sigma-Aldrich (MAK277, Sigma). El principio del kit consistió en la transformación del Gliceraldehido-3-fosfato (GAP) en 1,3-bifosfoglicerato (1,3 BPG) por la enzima Gliceraldehido-3-deshidrogenasa. El resultado de esta reacción dio lugar a un compuesto coloreado medible a una absorbancia a 450 nm (A_{450nm}) cuya concentración final es proporcional a la actividad de dicha enzima.

La actividad de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH) fue determinada mediante la aparición de NADH formado por la reacción del D, L-Isocitrato y el NAD⁺ llevado a cabo por la IDH, este proceso se puede seguir espectrofotométricamente a 340nm. Esta reacción se llevó a cabo en tampón 40 mM MOPS-HCl a pH 7,0, 1,5 mM de MgCl₂, 0,7 mM de NAD⁺ y 10 mM de D, L-isocitrato (Bernt & Bergmeyer, 1974).

La actividad de la Isocitrato liasa (IL) se determinó mediante la aparición de un compuesto coloreado formado tras la unión del glioxilato producido en la reacción con fenilhidrazina, la formación de este compuesto se puede seguir espectrofotométricamente a 324nm. Para llevar a cabo esta reacción se realizó en

tampón 50 mM imidazol a pH 8,0; 5 mM de MgCl₂, 4 mM de fenilhidrazina, 1 mM de D, L-isocitrato y 4 mM EDTA (Chell R.M. et al., 1978).

La actividad de la Malato Sintasa (MS) se determinó mediante la aparición de un compuesto coloreado formado tras la unión de la Coenzima A (CoA) con el ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), la formación de este compuesto se puede seguir espectrofotométricamente a 412nm. Para llevar a cabo la reacción se realizó en tampón 50 mM imidazol a pH 8,0, 10 mM de MgCl₂, 0,25 mM de Acetil-CoA, 1 mM de glioxilato y 0,2 mM de DTNB (Silverstein R.M., 1975).

Se cuantificó la cantidad de proteína presente en los extractos celulares obtenidos mediante el método Bradford (BioRad, España) (Kruger N.J. et al., 1994) a partir de valores de una curva estándar elaborada con concentraciones conocidos de seroalbúmina bovina (BSA) con el fin de normalizar los datos obtenidos en los diferentes análisis de las actividades enzimáticas. Los datos se expresaron en N° de veces con respecto al tiempo 0 (U/ mg proteína).

5.5 Determinación de concentración de metabolitos

Las concentraciones de glucosa, glicerol y etanol se determinaron en sobrenadante libre de células crecidas en diferentes concentraciones de NaCl o LiCl, mientras que las concentraciones de metabolitos relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico y del ácido glioxílico fueron determinados en extractos celulares obtenidos de forma similar a lo explicado en el *Apartado 5.4.1 de Materiales y Métodos*. En ambos casos, las muestras fueron recogidas en el mismo momento del crecimiento celular (A_{600nm} 0,5-0,7).

Las concentraciones de todos los metabolitos fueron determinadas mediante análisis en HPLC (modelo 1100-1200 Series HPLC System, Agilent Technologies, Alemania). El volumen de inyección de cada muestra fue 20 μ L, el eluyente 5mM H₂SO₄ y un flujo puesto a punto a 0,6 ml/h. La temperatura de la columna de Aminex HPX-87H (Bio-Rad) se mantuvo a 60°C (Navarrete C. et al., 2021a).

6. Estudio y análisis a nivel de transcripción

El estudio del análisis de la transcripción se realizó mediante la amplificación de ADNc procedente de la retrotranscripción de ARNm obtenido de células de *D. hansenii* en distintas condiciones de estrés.

6.1 Obtención de células

A partir de un precultivo (26°C, 150 rpm) en el cual se dejaron crecer células, hasta que estas alcanzasen la fase exponencial (A_{600nm} 0,5-0,7) tras lo cual fueron sometidas a las diferentes condiciones de estudio.

Las condiciones en las que se han estudiado los genes de interés fueron distintas concentraciones de NaCl y LiCl durante distintos tiempos: 0, 2 horas y 6 horas. Cada vez que se alcanzaba los tiempos indicados, las células fueron centrifugadas (2000g, 4 minutos, 4°C) y lavadas con agua fría estéril con el fin de concentrar las células en tubos eppendorf.

6.2 Extracción de ADN

Con el objetivo de extraer ADN cromosómico se centrifugó y se lavó un cultivo de 50 mL en fase exponencial ($A_{600} \approx 0,6-0,8$). Tras esto, se concentraron las células y se repartieron las células obtenidas en tubos eppendorf.

Para la ruptura y extracción del ADN cromosómico de las muestras a cada tubo obtenido anteriormente se le añadió 0,2 mL de arena estéril, 0,2 mL de tampón de lisis y 0,2 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).

Cada tubo eppendorf fue sellado con Parafilm y fue agitado en un “vortex” en 10 pulsos de 1 minuto con intervalos de 1 minuto en hielo para la correcta ruptura de células. Posteriormente, se añadió 0,2 mL de TE se centrifugó 5 minutos a 12.000 g y se extrajo la fase acuosa superior en un nuevo tubo con ayuda de una micropipeta. Tras esto, se procedió a añadir 1 mL de etanol 100% se mezcló por inversión y se volvió a centrifugar 2 minutos a 12.000 g.

Tras esta centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado obtenido en 0,4 mL de TE al cual se añadió 10 µL de acetato sódico (pH 4,8) y 1 mL de

etanol 100%. Se volvió a centrifugar 2 minutos a 12.000 g y se descartó el sobrenadante dejando secar el precipitado. Una vez seco, se resuspendió en 50 μ L de tampón TE.

6.3 Extracción de ARN

Con el objetivo de extraer ARN, al precipitado de células se le añadió aproximadamente 0,2 mL de arena estéril y 1 mL de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). El tubo eppendorf se selló con Parafilm para evitar pérdidas y se agitó 10 veces en un “vortex” durante 1 minuto con intervalos de 1 min en hielo. Posteriormente, se incubó 5 minutos a 70°C en un termobloque y se repitió otro periodo de agitación con “vortex” idéntico al anterior.

Tras esto, se añadió 200 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó durante 1 minuto y se centrifugó 15 minutos a 4°C y 12.000 g. Tras la centrifugación se pudo apreciar en el eppendorf tres fases: una inferior orgánica de color verde (contiene las proteínas, lípidos y restos celulares), una interfase de ADN cromosómico y una superior acuosa e incolora que contiene el ARN. Se recogió esta última fase y se transfirió a un eppendorf limpio.

Una vez transferida esta fase acuosa a un nuevo eppendorf, se le añadió eppendorf 0,5 mL de isopropanol y se mezcló por inversión para posteriormente incubar durante al menos 30 minutos a -80°C. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 12.000 g y 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió 0,5 mL de etanol al 70% resuspendiendo el precipitado. Una vez resuspendido el precipitado, se procedió a centrifugar durante 10 min a 12.000 g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, que fue resuspendido en 10 μ L de H₂O ultrapura (MiliQ) tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) para inhibir ARNasas.

6.4 Tratamiento con ADNasa

En el ARN total aislado a partir de las levaduras podemos encontrar ADN genómico contaminante que puede alterar el resultado del análisis. Con el fin de eliminar este ADN contaminante, las muestras fueron tratadas con la enzima ADNasa I (New England Biolabs) que degrada el ADN sin alterar el ARN. Al tubo eppendorf con 10 μ L de ARN a tratar se le añadió 34 μ L de H₂O miliQ DEPC, 5 μ L de tampón ADNasa 10x (New England Biolabs) y 1 μ L de ADNasa en este orden. Se resuspendió con una micropipeta y se incubó 1 hora en un termobloque a 37°C. Tras este tiempo, se le añadió 150 μ L de H₂O

Material y métodos

miliQ DEPC y 100 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), tras lo cual, se agitó vigorosamente en un “vortex” y se centrifugó durante 5 minutos a 13.400 g. Tras la centrifugación se recogió la fase acuosa superior en un nuevo tubo eppendorf.

A esta fase acuosa superior se le añadió 20 µL de Acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 1 mL de etanol y se incubó a -80°C durante al menos 30 minutos. Tras la incubación se centrifugó a 13.400 g, 15 minutos y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez seco se resuspendió en 10 µL de H₂O miliQ DEPC.

El tratamiento con ADNasa se repitió tantas veces como fueron necesarias hasta comprobar mediante reacciones de Rt-PCR sin síntesis previo de ADNc que no había amplificación en ciclos anteriores al 30 con cebadores específicos del gen de la actina (*ACT1*).

6.5 Cuantificación del ARN aislado

Tras el aislamiento y el tratamiento con ADNasa, se procedió a su cuantificación. La concentración de ARN de las muestras fue cuantificada mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Scientific, este además de cuantificar la concentración permite evaluar la pureza de los ácidos nucleicos aislados.

6.6 Retrotranscripción a ADNc

La retrotranscripción es un proceso que implica la generación de un fragmento de ADN copia (ADNc) a partir de ARNm. Este proceso, junto a la técnica de PCR, es utilizado para estudiar la expresión de un gen en distintas condiciones ambientales y de estrés. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN usando el Kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la casa comercial: 4 µL de 5X iScript react. mix, 1 µL de iScript reverse transc. y 14 µL de H₂O mQ DEPC. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf), con una etapa de hibridación a 25°C durante 5 minutos y una etapa de elongación de 20 minutos a 46°C. Por último, se desactivó la enzima durante 1 minuto a 95°C.

Una vez obtenido el ADNc, se almacenó a 4°C para su utilización a corto-medio plazo. Para periodos de almacenamiento superiores se conservó a -20°C.

6.7 Determinación de la expresión génica mediante RT-PCR

Para la cuantificación mediante PCR de la expresión génica se utilizó la mezcla supermix iQ SYBR Green (Bio-Rad). Siguiendo la metodología indicada por el producto cada pocillo de una placa de PCR se rellenó con 7,5 µL de la supermix, 1 µL de ADNc, 2 µL de la mezcla de cebadores correspondientes a una concentración de 1 µM y 4,5 µL de H₂O mili Q DEPC.

La información relativa a los genes estudiados fue encontrada mediante similitud u homología de genes identificados en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* por disponer de una mayor información en la base de datos. Los cebadores utilizados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Cebadores utilizados

Gen	Similitud encontrada (NCBI)	Secuencia (Forward/Reverse 5' → 3')
ACT1	<i>S. cerevisiae</i> ACT1	F: CGAACACGGTATTGTCACCAACTGGGACGA R: CGGTCAACAAAAGTGGGTGTTCTTCTGGGG
DEHA2D12936g	<i>S. cerevisiae</i> ICL1	F: CAAGCAAGCCAAGGAATTCGCTGAAGGTGT R: AACCGGCTAAGGTGATGAATTGCCAGACGT
DEHA2E13530g	<i>S. cerevisiae</i> MS	F: TGGCATCAATTCAGACAGAGCCAAGCACA R: GGTAAGTCTCCCTGTCTCTTTGGCCTGT
DEHA2C10758g	<i>S. cerevisiae</i> IDH1	F: GCCACTTTCATTTGCGCTGAGTCCGCTT R: ACCGAGTCAGTGATTCCTTACCGACACCA
DEHA2G05786g	<i>S. cerevisiae</i> IDH2	F: AGGATATCTACGCCGTGCCAAGGTCCCA R: ACCCTTACCAACTGGGGTAGCTAATGGTCCCT

La placa con todos los pocillos cargados se introdujo en el termociclador MJMini Personal Thermal Cycler de Bio-Rad programado con los siguientes pasos:

- 3 minutos a 95°C para la activación de la enzima
 - 15 segundos a 95°C para la desnaturalización
 - 30 segundos a 70°C para la hibridación y la elongación
- } 40 ciclos

Una vez finalizados estos ciclos se programó para lectura de placa tras ciclo y para la obtención de las curvas de desnaturalización (Melting) de 65°C a 95°C incrementando la temperatura de 0,5 grados cada 5 segundos.

7. Análisis estadísticos y bioinformática

Para el procesamiento de los datos y la realización de la estadística básica se utilizó el programa Microsoft Excel 2019 (Microsoft Office Professional 2019). Los cebadores utilizados para la determinación de la expresión mediante RT-PCR fueron diseñados con el software Oligo v7. Para la programación de los diferentes ciclos utilizados en el *Apartado 6 de Materiales y Métodos* se utilizó el programa Bio Rad CFX Manager v3.1.

Cada experimento fue repetido al menos con 3 réplicas biológicas. La significancia de las diferencias entre las medias fue determinada mediante ANOVA, seguido de una comparación múltiple *post hoc* en ambos casos se utilizó el software Graphad Prism v8. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con los siguientes símbolos: *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

Resultados

Resultados

Como se ha mencionado anteriormente, *Debaryomyces hansenii* se ha convertido en modelo de estudios sobre halotolerancia y respuesta al estrés salino a lo largo de los años, sin embargo, estos estudios casi siempre se han realizado detalladamente para los cationes potasio y sodio, dándole menos importancia a otros cationes alcalinos, como puede ser litio. Por otra parte, el efecto de la sal sobre el metabolismo de esta levadura ha sido estudiado en escasas ocasiones, sin embargo, la heterogeneidad de las condiciones de los pocos ensayos realizado ha provocado la existencia de contradicciones entre los diferentes autores, impidiendo la obtención de conclusiones precisas sobre esta materia. En uno de los artículos más relevantes sobre este aspecto los autores propusieron la activación del ciclo del ácido glioxílico, una ruta alternativa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en respuesta a la presencia de sal (Sánchez N.S. et al. 2008), sin embargo, este hecho no fue estudiado en detalle en artículos posteriores.

En la presente tesis, se ha querido ampliar la información sobre los posibles efectos del estrés salino provocado por la presencia de sales de potasio, sodio y litio, haciendo especial hincapié en los dos últimos cationes. Con esta finalidad, se han realizado diversos experimentos que abarcan desde estudios de crecimiento a otros de homeostasis iónica, de metabolismo o de expresión génica y cuyos resultados se muestran a continuación.

1. Análisis del efecto de las sales sobre el crecimiento y viabilidad

En primer lugar, hay que mencionar que existen dos publicaciones en las que el efecto del litio sobre la fisiología de *D. hansenii* es estudiado, proponiendo que es un elemento tóxico para esta levadura (Prista C. et al. 1997; Almagro A. et al., 2001). Sin embargo, esta supuesta toxicidad no está estudiada detalladamente en estos artículos. Por este motivo, los primeros experimentos de esta tesis se han centrado en la realización de ensayos fisiológicos ampliando así la información sobre esta supuesta toxicidad y, además, sobre el efecto del potasio y el sodio en esta levadura.

Estos ensayos se han realizado teniendo en cuenta varios aspectos como pueden ser las diversas concentraciones, las combinaciones de estos o la posible influencia de otros elementos abióticos como el pH sobre la tolerancia a estos cationes.

1.1 Efecto de las diferentes concentraciones de sal

Los primeros experimentos realizados en la presente tesis consistieron en el análisis del crecimiento en medio sólido mediante la realización de test de goteo, en los cuales varias diluciones seriadas de *D. hansenii* fueron inoculadas en placas de YNBc suplementado con múltiples concentraciones de potasio, sodio y litio. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos.

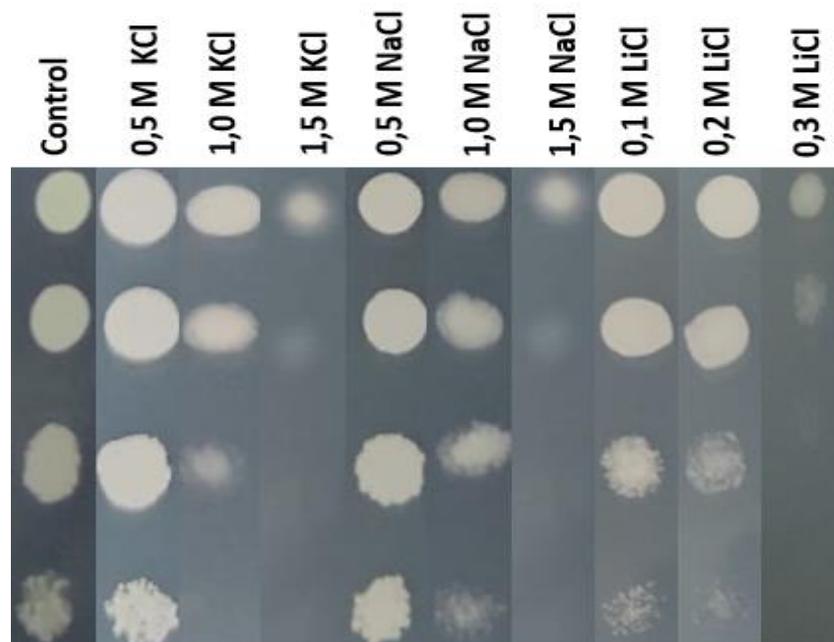


Figura 6 Análisis del crecimiento en medio sólido mediante test de goteo. A partir de una suspensión de células ($A_{600} = 1$) se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de las cuales se inocularon 5 μ L en placas de YNBc suplementado con diferentes concentraciones de KCl, NaCl y LiCl. El control corresponde a placas de YNBc sin ningún tipo de sal añadida. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes.

Se puede observar que una concentración moderada-alta (0,5 M) tanto de potasio como de sodio produjo una mejora en el crecimiento de la levadura. Esta mejora fue desapareciendo a medida que se aumentaba la concentración de ambos cationes. En 1,5 M tanto de potasio como de sodio se puede visualizar un efecto negativo sobre el crecimiento de la levadura. Por otra parte, al contrario de que ocurrió con el potasio y el sodio, cuando el litio se encontró presente en el medio nunca se observó dicha mejora, incluso, se llegó a producir un efecto perjudicial sobre el crecimiento utilizando

Resultados

concentraciones más pequeñas (0,3 M) en comparación a las estudiadas para los casos del potasio y el sodio.

Para profundizar en los resultados obtenidos en medio sólido, adicionalmente, se realizaron ensayos en medio líquido en los que el crecimiento celular se siguió mediante espectrofotometría (A_{600nm}). Las curvas de crecimiento correspondientes a las condiciones estudiadas se muestran en la Figura 7.

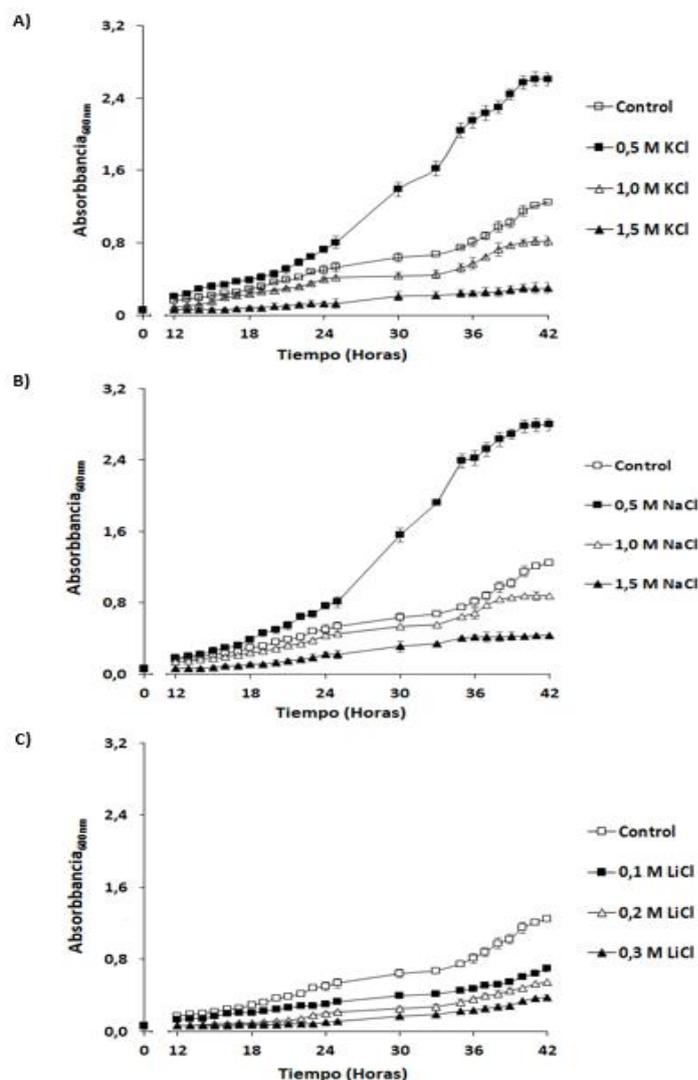


Figura 7. Análisis del crecimiento celular en medio líquido mediante curvas de crecimiento. Las células de *D. hansenii* crecieron en matraces de YNBc suplementado con diferentes concentraciones de KCl (A), NaCl (B) y LiCl (C). El crecimiento celular se siguió mediante espectrofotometría (A_{600nm}) durante 42 horas. El control corresponde al crecimiento de células inoculadas en matraces de YNBc sin ningún tipo de sal añadida. Los matraces fueron siempre inoculados con la misma cantidad inicial de células correspondiente a una $A_{600}= 0,06$. Las medias y las desviaciones estándar fueron estimadas de al menos tres experimentos independientes.

Los resultados en medio líquido fueron similares a los observados en medio sólido. Generalmente, el crecimiento en presencia de potasio fue similar al crecimiento en presencia de sodio. Una concentración de 0,5 M de ambos cationes produjo una mejora del crecimiento que se vio reflejado en valores altos de A_{600nm} después de más de 40 horas de incubación y en una pendiente más acusada del crecimiento. Por el contrario, una concentración de 1,5 M tanto de potasio como sodio produjo un empeoramiento del crecimiento que se pudo visualizar en un aumento de la fase de adaptación. Con respecto al litio, nunca se vio un efecto positivo sobre la levadura, sino que se produjo un empeoramiento del crecimiento en comparación al observado en el control, corroborando así los resultados obtenidos previamente en medio sólido. También hay que señalar que, la fase de adaptación al litio fue mucho más larga que la del potasio y la del sodio, incluso en algunos casos, esta fase se alargó hasta casi las 24 horas después de la inoculación de las células en el medio.

Una vez realizado este primer acercamiento se pudo afirmar que, en nuestras condiciones de estudio, el litio ejerció un efecto tóxico o perjudicial sobre *D. hansenii*, constatando así lo propuesto en los estudios previamente mencionados. También se pudo corroborar el efecto beneficioso del potasio y el sodio descrito en publicaciones previas.

1.2 Influencia del potasio y el sodio sobre el efecto del litio

Una vez que se determinaron los efectos de los cationes en solitario y se confirmó la toxicidad del litio y el efecto beneficioso del potasio y el sodio, se quiso comprobar si estos dos cationes podían influir sobre el efecto tóxico del litio. Para ello se realizaron test de goteo en placas de YNBc suplementado con una concentración moderadamente perjudicial de litio (0,25 M LiCl) tanto en ausencia como en presencia de una concentración de 0,5 M potasio o sodio. En la Figura 8 se puede apreciar como el potasio y el sodio influenciaron positivamente sobre el efecto del litio. Cuando el litio se encontró en combinación con potasio o sodio su efecto sobre la levadura se vio atenuado, sin embargo, esta mitigación no fue total ya que como se puede observar el crecimiento de la levadura siempre fue mayor en un control, células crecidas en placas YNBc sin ningún tipo de sal añadida, que en cualquiera de las condiciones estudiadas.

Resultados

Además, se puede contemplar que el efecto que ejerció el potasio fue ligeramente superior al del sodio.

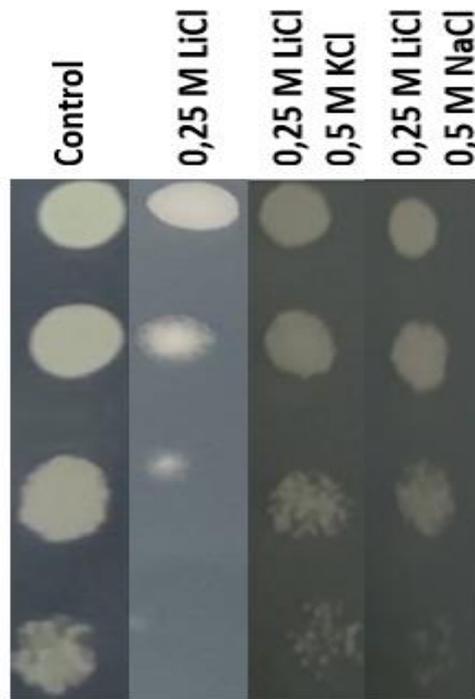


Figura 8. Análisis del efecto del potasio y sodio sobre la tolerancia a litio. A partir de una suspensión de células ($A_{600}=1$) se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de las cuales, se inocularon 5 μ L en placas de YNBc suplementado con 0,25 M LiCl solo o en combinación de 0,5 M de KCl o NaCl. El control corresponde a placas de YNBc sin ningún tipo de sal añadida. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes.

Con el fin de comparar cuantitativamente el efecto del potasio y el sodio sobre la toxicidad del litio, se realizaron ensayos en medio líquido en los que se calculó el crecimiento relativo respecto a células crecidas en 0,25 M de LiCl. Esta comparación se puede ver en la Figura 9.

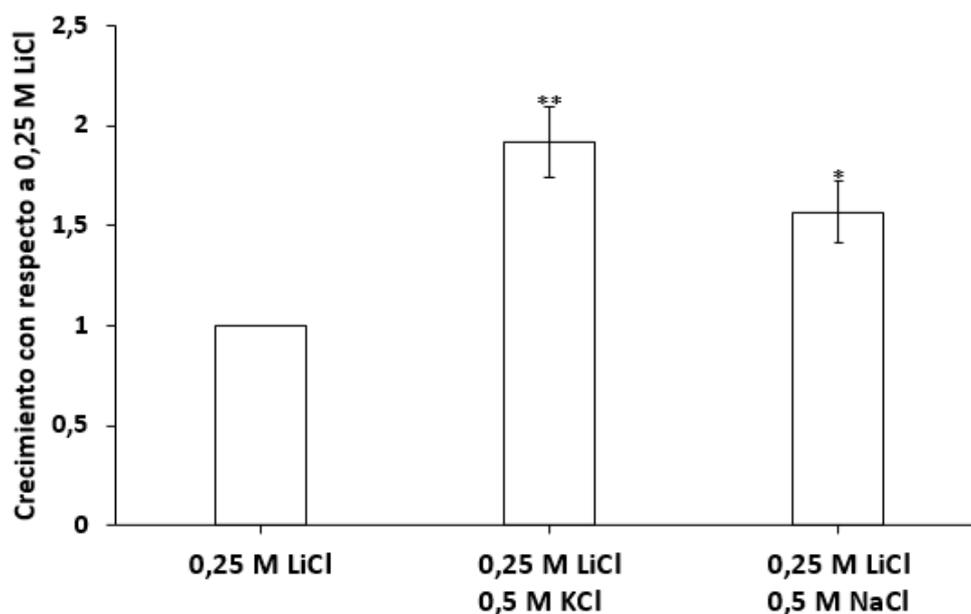


Figura 9. Efecto del potasio y sodio sobre la toxicidad del litio en medio líquido. La misma cantidad de células ($A_{600}=0,06$) fue inoculada en matraces de YNBc suplementado con 0,25 M de LiCl solo o en combinación de 0,5M de KCl o NaCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 24 horas a las cuales se midió la A_{600} . Los resultados se encuentran expresados en crecimiento con respecto a 0,25 M LiCl. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a 0,25 M LiCl fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Los resultados obtenidos confirmaron el efecto amortiguador del potasio y el sodio sobre la toxicidad del litio, reflejados en valores de crecimiento relativo por encima de 1. Esta mejora fue más pronunciada en el caso del potasio, ya que la levadura creció casi dos veces más que en 0,25 M de LiCl. Por otro lado, la mejora provocada por el sodio fue ligeramente menor a la producida por la presencia de potasio.

Tras la realización de estos ensayos, se pudo afirmar que en las condiciones estudiadas tanto el potasio como el sodio atenuaron parcialmente el efecto tóxico del litio. También se confirmó que el potasio produjo una mayor disminución de este efecto que el sodio.

1.3 Efecto del pH sobre la tolerancia a sodio y litio

Tras haber realizado un primer acercamiento en el análisis del efecto de los diferentes cationes sobre *D. hansenii*, se quiso estudiar como otros factores abióticos, como el pH, podían afectar a la tolerancia a estos, haciendo hincapié, en el caso del sodio y el litio. Para ello, se realizaron varios experimentos tanto en medio sólido como en medio

Resultados

líquido a diferentes pH. Estos ensayos se llevaron a cabo en YNB-F, un medio con concentraciones limitantes de potasio, con el fin de comprobar si esta limitación afectaba a la tolerancia de sodio y litio.

Los primeros experimentos que se realizaron en este caso fueron test de goteo en placas de YNB-F con diferentes concentraciones de sales sodio y litio añadidas a pH 4; 5,8 y 7. La figura 10 muestra los resultados obtenidos.

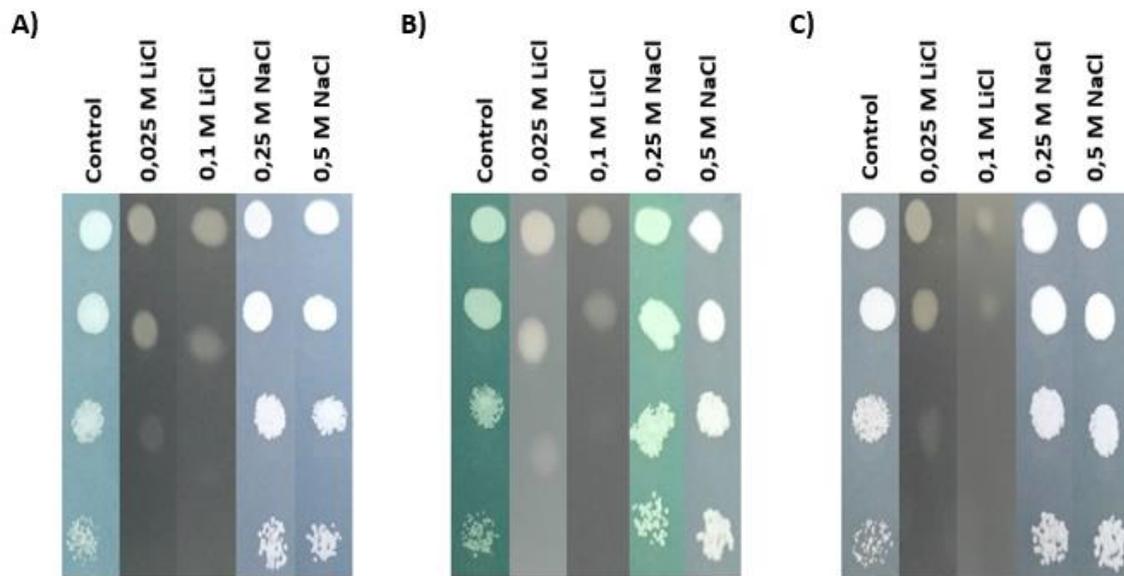


Figura 10 Efecto del pH en condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a sodio y litio en medio sólido. A partir de una suspensión de células ($A_{600} = 1$) se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de las cuales, se inocularon 5 μL en placas de YNB-F suplementado con NaCl y LiCl a pH 4,5 (A); 5,8 (B) y 7 (C). Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes. El control corresponde a placas de YNB-F sin ningún tipo de sal añadida. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes.

De forma general, no se observaron diferencias entre los resultados obtenidos en las condiciones de pH estudiadas. El litio siguió ejerciendo un efecto perjudicial sobre la levadura en todos los pH analizados, a pesar de que, la levadura se expuso a concentraciones menores a las previamente estudiadas. Por otra parte, el sodio siguió provocando una mejora del crecimiento, incluso utilizando concentraciones ligeramente inferiores a las previamente estudiadas, sin embargo, no se pudo determinar que concentración promovió un mayor aumento del crecimiento.

En la figura 11 se puede ver un experimento similar al anterior pero adicionalmente, se añadió 10 mM KCl en cada una de las condiciones (exceptuando el control). Si se compara las figuras 10 y 11 se puede comprobar que el potasio atenuó parcialmente el efecto perjudicial del litio, además, las diferencias entre los diferentes pH siguieron siendo inexistentes. Con respecto al sodio, hay que señalar que no se produjo ningún cambio significativo en el crecimiento en presencia de este catión tras la adición de potasio. Por último, una concentración de 10 mM de potasio no fue suficiente para producir una mejora en el crecimiento de la levadura con respecto al control.

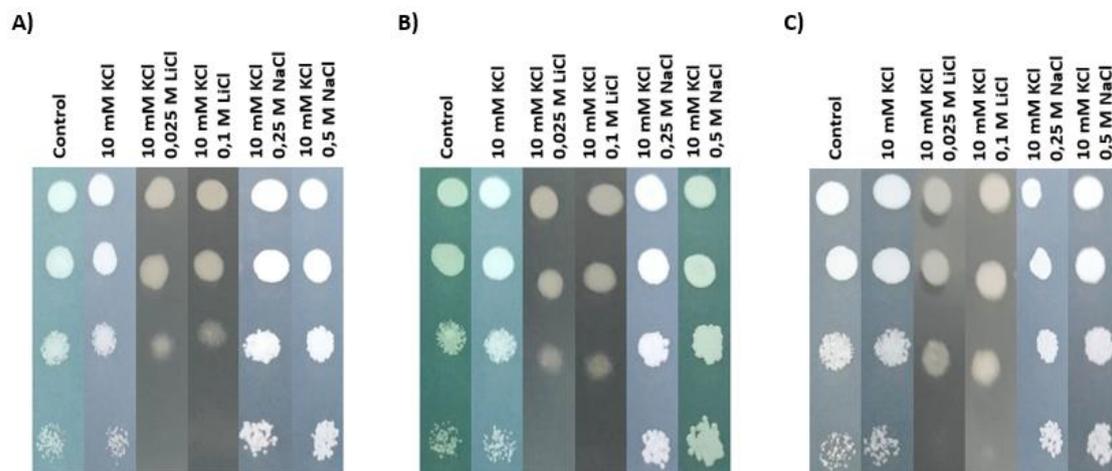


Figura 11. Influencia del potasio sobre la tolerancia a litio y sodio en diferentes pH. A partir de una suspensión de células ($A_{600} = 1$) se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de las cuales, se inocularon 5 μ L en placas de YNB-F suplementado con KCl, NaCl y LiCl a pH 4,5 (A); 5,8 (B) y 7 (C). Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes. El control corresponde a placas de YNB-F sin ningún tipo de sal añadida. Las placas se incubaron a 26°C durante 48 horas a las cuales se tomaron las imágenes.

Una vez realizados los test de goteo, se llevaron a cabo análisis en medio líquido con el fin de medir cuantitativamente la influencia del pH sobre la tolerancia a litio y sodio, complementando así, los resultados obtenidos en medio sólido. La figura 13 muestra el crecimiento relativo de la levadura en las diferentes condiciones.

Resultados

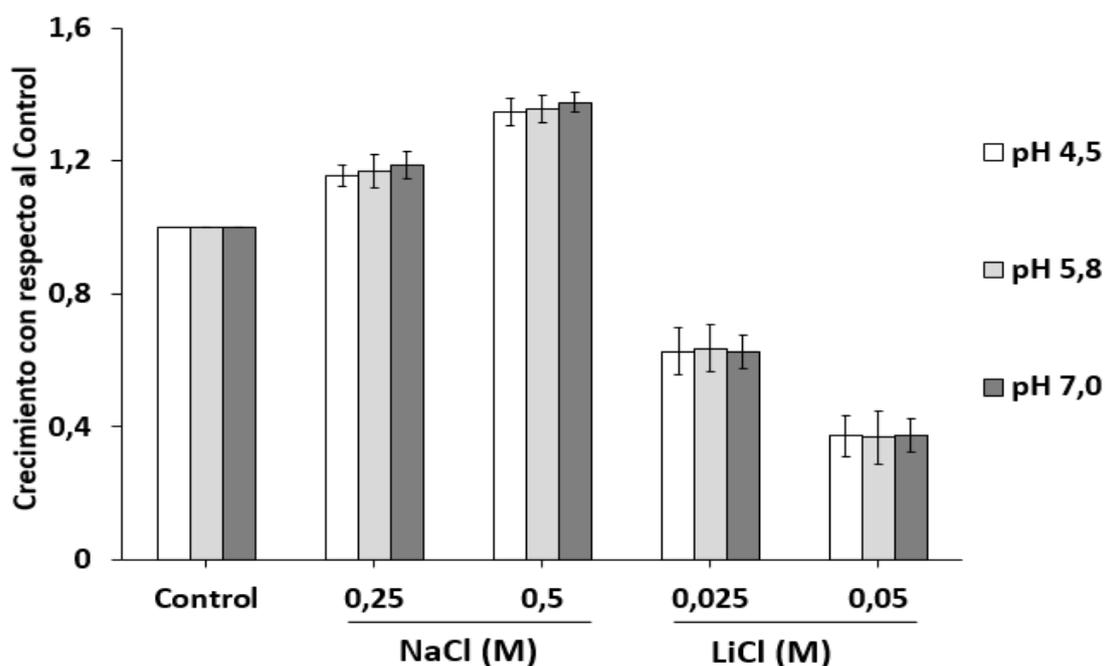


Figura 12. Efecto del pH en condiciones limitantes de potasio sobre la tolerancia a sodio y litio en medio líquido. La misma cantidad de células ($A_{600} = 0,06$) fue inoculada en diferentes matraces de YNB-F suplementados con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl a diferentes pH. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 24 horas a las cuales se midió la A_{600} . Los resultados se encuentran expresados en crecimiento relativo con respecto al control correspondiente al crecimiento de células inoculadas en matraces de YNB-F sin ningún tipo de sal añadida a diferentes pH. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. No se detectaron diferencias significativas entre las medias estimadas de las diferentes condiciones de pH

Al igual que en los ensayos en medio sólido, no se encontraron diferencias significativas entre los datos obtenidos de crecimiento relativo en los valores de pH estudiados. Al contrario de lo que ocurría en medio sólido, en estos ensayos si se pudieron visualizar diferencias más apreciables entre las concentraciones de litio y sodio utilizadas. Independiente del pH, el litio tuvo un impacto muy negativo sobre el crecimiento de la levadura, que se reflejó en la obtención de valores de crecimiento relativo entre 0,4 y 0,6. Por otra parte, el sodio siguió provocando un aumento en el crecimiento independientemente del pH.

Los múltiples ensayos realizados en nuestras condiciones de estudios indicaron que el pH no tuvo ningún efecto sobre la tolerancia a sodio y litio. Por otra parte, la limitación del potasio en el medio afectó a la tolerancia a litio, empeorándola, pero no tuvo ningún efecto sobre el sodio.

1.4 Viabilidad celular

Tras comprobar como los diferentes cationes afectaban al crecimiento de la levadura, se quiso analizar el efecto del sodio y el litio sobre la viabilidad celular de *D. hansenii*. Para ello, se realizó un ensayo en el que se añadieron concentraciones elevadas de sal a cultivos de células, en los que se contabilizaron las Unidades Formadoras de Colonias a las 0 y 24 horas tras la adición de dichas sales. La figura 13 muestra los datos obtenidos del conteo de las Unidades Formadoras de Colonias.

Como se puede contemplar, una concentración de 0,5 M de sodio produjo un aumento de las divisiones celulares tras 24 horas de incubación, que se vio reflejado en un número de Unidades Formadoras de Colonias significativamente superior al observado en el control. Por otro lado, una concentración de 1 M de este catión provocó una proliferación celular mucho menor a la observada en 0,5 M; pudiéndose visualizar un número de Unidades Formadoras de Colonias similar al calculado en el control. En el caso del litio cabe destacar que, al contrario de lo que se podría esperar, las altas concentraciones utilizadas en este ensayo no mataron a la levadura de forma inmediata, sino que inhibieron su proliferación provocando que el número de Unidades Formadoras de Colonias contadas a las 24 horas fuese significativamente menor en comparación al control, pero parecido al determinado a tiempo 0.

Resultados

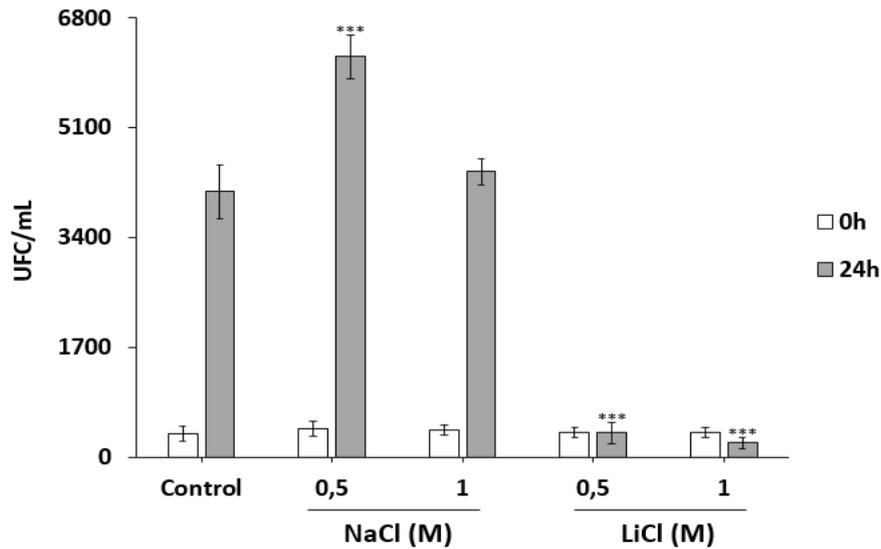


Figura 13. Efecto del sodio y litio sobre la viabilidad celular de *D. hansenii*. Se partió de varios cultivos de células crecidas en YNBc hasta que alcanzaron un determinado momento del crecimiento celular correspondiente a una $A_{600nm} = 0,2$, tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl en cada uno de los casos. Se realizaron diluciones seriadas del orden 10 de cada una de las condiciones a las 0 y 24 horas después de la adición de las diferentes sales. Se inocularon y extendieron 10 μ l de cada una de las diluciones en placas de YNBc sin ningún tipo de sal añadida. Las placas se incubaron en una estufa a 26°C durante 48 horas. Tras la incubación, se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonia. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: ***, $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de ser un elemento tóxico, el litio no produce un daño mortal a las células, sino que, inhibe el proceso de división celular. Por el contrario, ciertas concentraciones de sodio producen un efecto muy positivo sobre la proliferación y viabilidad celular, siempre y cuando, la concentración no sea muy alta.

2. Homeostasis iónica. Contenido y flujo de cationes.

Tras haber confirmado el efecto perjudicial del litio sobre el crecimiento y la viabilidad de *D. hansenii* mediante la realización de los diferentes ensayos de carácter fisiológico, se quiso seguir ampliando la información sobre este catión en relación con otros procesos celulares como puede ser la homeostasis iónica. Por otra parte, también se buscó deducir cuales podrían ser las causas del efecto amortiguador del potasio y el sodio sobre la toxicidad del litio.

Para ello los siguientes ensayos que se realizaron en la presente tesis se centraron en estudiar como la presencia de diferentes cationes en el medio afectó a la homeostasis iónica. Este tema se abordó mediante la realización de análisis del contenido intracelular y del flujo del litio en diferentes condiciones de estudio.

2.1 Análisis del contenido intracelular de potasio, sodio y litio

En primer lugar, el contenido intracelular de potasio, sodio y litio fue determinado en células crecidas en YNBc complementado con diferentes concentraciones de KCl, NaCl y LiCl. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos en el análisis.

Tabla 4 Contenido intracelular de Potasio, Sodio y Litio en células de *D. hansenii* crecidas en YNB suplementado con diferentes concentraciones de KCl, NaCl y LiCl.

	Cación externo					
	KCl		NaCl		LiCl	
	0,5 M	1,5 M	0,5 M	1,5 M	0,1 M	0,3 M
Cación interno (nmol/mg cel.)	415±12**	456±12***	400±12**	413±32*	27±1***	30±3***

Las muestras fueron tomadas cuando el crecimiento celular alcanzó un valor de $A_{600nm} = 0,3-0,7$. El contenido intracelular de cationes fue cuantificado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica. Los datos se encuentran expresados nmol/mg de células. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Se puede observar que, conforme la concentración de los diferentes cationes en el medio aumentó, estos se acumularon en el interior celular, sin embargo, este hecho no ocurrió de forma proporcional, sino que se vio delimitado hasta un valor máximo

Resultados

diferente para cada catión. La máxima acumulación de sodio alcanzó un valor cercano a 415 nmol/mg cel, mientras la del potasio fue ligeramente mayor y se situó alrededor de 450 nmol/mg cel, por último, en el caso del litio fue entre 30 nmol/mg cel. Los valores intracelulares calculados para el potasio y el sodio fueron similares entre sí, pero diferentes a los obtenidos el litio, los cuales fueron bastante inferiores a los observados en cualquier otra condición estudiada, llegando a alcanzar más de un orden de magnitud de diferencia. Este hecho fue de especial relevancia ya que cabría esperar que la concentración intracelular del litio alcanzase valores similares a los obtenidos en los ensayos realizados con potasio y sodio.

Los resultados de este experimento complementaron a los observados en los ensayos fisiológicos indicando que, en concentraciones intracelulares muy bajas, en comparación a las calculadas habitualmente para el potasio y sodio, el litio fue perjudicial para *D. hansenii*.

2.2 Contenido y flujo de litio en presencia de potasio y sodio

Una vez determinada la acumulación de los diferentes cationes por separado, se quiso comprobar si la presencia de potasio o sodio podría afectar a la acumulación intracelular de litio ya que como se observó en los ensayos de crecimiento tanto el potasio como el sodio influyeron sobre el efecto tóxico de este catión. Con esta finalidad, se determinó el contenido de litio en células crecidas en YNBc suplementado con 0,25 M de LiCl en ausencia o presencia de una concentración de 0,5 M de KCl o NaCl. En la tabla 5 se muestra los valores de litio intracelular en ausencia o presencia de potasio y sodio.

Los resultados obtenidos muestran que el valor de litio obtenido en células crecidas en presencia de solamente 0,25 M LiCl fue mayor (28 ± 2 nmol/mg cel) que cuando crecieron en combinación junto 0,5 M de KCl (13 ± 2 nmol/mg cel) o de NaCl (12 ± 3 nmol/mg cel). Estos resultados indicaron que el potasio y sodio provocaron una menor acumulación intracelular del litio.

Tabla 5. Contenido intracelular de Litio en células crecidas en YNBc suplementado con 0,25 M LiCl en ausencia o presencia de 0,5 M de KCl o NaCl

Li ⁺ (nmol/mg cel)	0,25 M LiCl	
	0,5 M KCl	0,5 M NaCl
	28±2	12±3 ^{***}

Las muestras fueron tomadas cuando el crecimiento celular alcanzó un valor de $A_{600\text{nm}} = 0,3-0,7$. El contenido intracelular de litio fue cuantificado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica. Los datos se encuentran expresados nmol/mg de células. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: ^{***}, $p < 0,001$.

Para complementar el ensayo anterior, se realizó un análisis del flujo del litio hacia el interior celular. Este experimento se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 5.1.2 de *Materiales y Métodos*. Las células ayunadas fueron resuspendidas en tampón MES ($A_{600\text{nm}}=0,3$) suplementado con 0,25 M de LiCl solo o en combinación de 0,5 M de KCl o NaCl. Se tomaron muestras durante 60 minutos tras la resuspensión y se midió el contenido intracelular de cada una de ellas. La figura 14 muestra la representación gráfica del flujo del litio en las diferentes condiciones estudiadas.

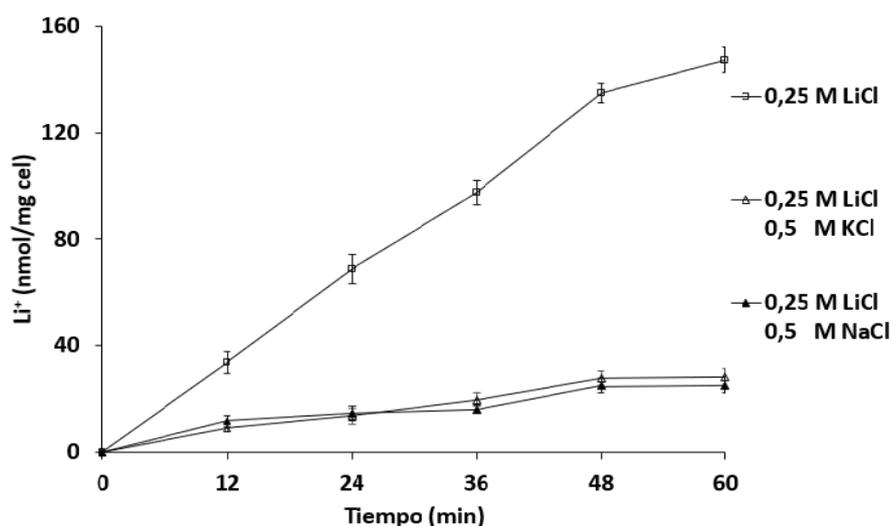


Figura 14. Flujo del catión litio hacia el interior celular. Este ensayo se realizó en células ayunadas y resuspendidas ($A_{600\text{nm}}=0,3$) en tampón MES a pH 5,8 suplementado con 0,25 M de LiCl solo o en combinación de 0,5 M KCl o NaCl. Se tomaron muestras durante 60 minutos tal y como se indica en el Apartado 5.1.2 de *Materiales y Métodos*. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes.

Resultados

Como se puede observar, cuando el litio se encontraba solo en el medio la entrada hacia el interior celular se produjo en mayor cantidad, hecho reflejado en una pendiente más acusada y prolongada, además de un alto valor de nmol/mg cel, cercano a 140, tras 60 minutos de muestreo. Cuando este catión se encontró en combinación de potasio o sodio, la entrada de este catión se vio drásticamente reducida, pudiéndose observar que la pendiente fue más llana, como consecuencia se produjo una acumulación máxima menor a la del caso anterior, alcanzando valores cercanos a 20 nmol/mg cel. Otro hecho que hay que destacar, es que la saturación del flujo hacia el interior celular se produjo antes cuando los cationes se encontraron en combinación, llegándose a producir tras unos 48 minutos después de la resuspensión en el tampón. Sin embargo, cuando el litio se encontró en solitario los primeros indicios de saturación se pudieron observar a partir de los 60 minutos. Por último, la reducción de la entrada de litio fue similar tanto para el caso del potasio como para el sodio, por lo que no se pudieron observar diferencias relevantes.

Tras la realización de estos dos experimentos se pudo concluir que, en las condiciones estudiadas, el potasio y el sodio afectan a la acumulación del lito, reduciéndola mediante la disminución del flujo hacia el interior celular de este catión. Este hecho podría estar relacionado con el efecto amortiguador del potasio y el sodio sobre la toxicidad del litio.

3. Niveles de fosfato y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Los ensayos realizados hasta este momento han confirmado la idea de que el litio actúa como un catión tóxico, incluso en cantidades intracelulares pequeñas. Por el contrario, el potasio y el sodio, tiene un efecto beneficioso sobre la fisiología de la levadura.

Para seguir indagando como sodio y litio podrían afectar otros procesos celulares, como puede ser la acumulación de fosfato, así como a los relacionados con otros tipos de estrés, como puede ser el estrés oxidativo se realizaron diferentes ensayos que consistieron en determinar concentraciones intracelulares de metabolitos de interés. Primeramente, se analizaron los posibles cambios en los niveles de fosfato en células crecidas en diferentes condiciones de salinidad. Por otra parte, para comprobar si el litio, al igual que el sodio, guardaba relación con el estrés oxidativo, se cuantificó la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en células crecidas en presencia de NaCl o LiCl. Hay que señalar que a partir de estos ensayos solamente se utilizaron sodio y litio ya que se buscaba corroborar y ampliar información de estos dos cationes.

3.1 Determinación de los niveles de fosfato en presencia de sodio y litio

En un estudio previo, los autores afirmaron que la presencia de potasio y sodio aumentaba los niveles de fosfato en el interior de la célula (Sánchez N.S. et al., 2008), sin embargo, este solo fue probado para una única concentración de 1 M de KCl o NaCl. Con el fin de ampliar la información sobre este hecho, se determinaron los niveles de fosfato en células crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.

La cuantificación se llevó a cabo adaptando la metodología descrita por Fiske y Subbarow (1925) modificada por Sanui H. (1974). La figura 15 muestra los resultados normalizados en función de los miligramos de proteína celular extraídos.

Resultados

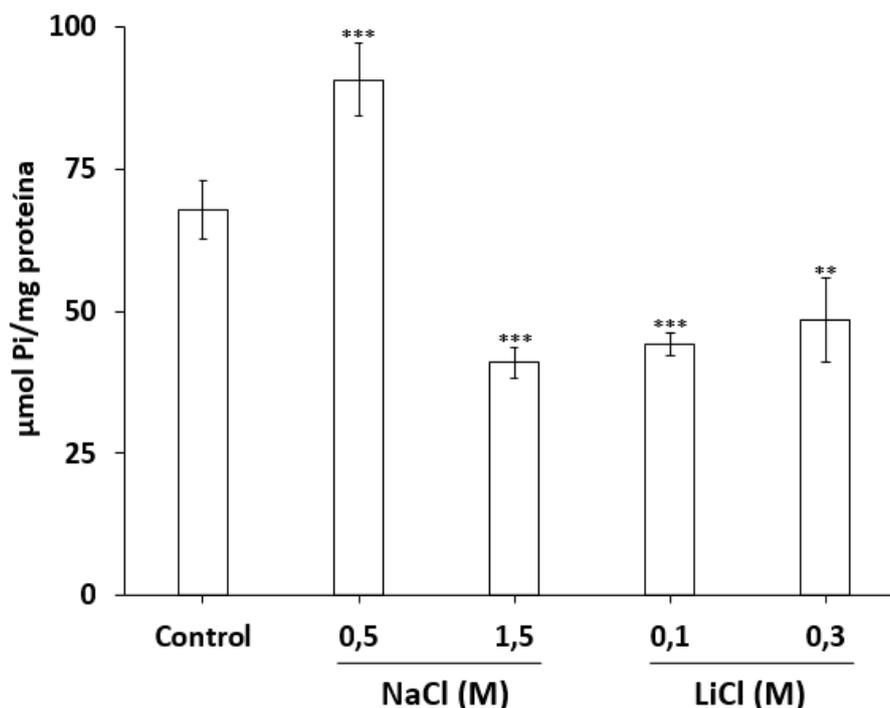


Figura 15. Niveles de fosfato en células de *D. hansenii* crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las muestras fueron tomadas cuando el crecimiento celular alcanzó un valor de $A_{600nm} = 0,5-0,7$. Los fosfatos inorgánicos (Pi) fueron extraídos y cuantificados según el protocolo establecido por Fiske & Subbbarow (1925) modificado por Hanui S. (1974). Los valores obtenidos están expresados en $\mu\text{mol Pi/miligramos}$ de proteína. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Cuando las células crecieron en medio suplementado con una concentración de 0,5 M de sodio, se produjo un aumento significativo de los niveles de fosfato con respecto al control. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración en el medio de este catión hasta 1,5 M; no se pudo visualizar ningún incremento, sino que, en este caso, los niveles de fosfato sufrieron un descenso significativo. Cuando las células crecieron en presencia de litio nunca se observó un aumento en la concentración de fosfato independientemente de la concentración utilizada. Por el contrario, se produjo una reducción significativa que fue similar a la calculada para 1,5 M de NaCl; obteniéndose valores cercanos a $50 \mu\text{mol Pi/mg proteína}$ en ambos casos.

Estos resultados confirmaron que, dependiendo de la concentración, el sodio provoca un aumento de los niveles de fosfato en el interior y que como sucedió en los ensayos

anteriores el litio actuó de forma distinta al sodio, en este caso, produciendo una disminución de la concentración intracelular de fosfato.

3.2 Cuantificación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en estrés salino

A lo largo de los años, se han publicado varios artículos que relacionan los mecanismos de respuesta al estrés salino con los del estrés oxidativo en levaduras (Ma N. et al., 2015; Auesekaree C., 2017), de los cuales solo dos de estos estudios se han centrado en estudiar esta relación en *D. hansenii* (Navarrete C. et al., 2009; Ramos-Moreno L. et al., 2019a). En estas publicaciones se propone que la presencia de sal, como por ejemplo el NaCl, estimula procesos celulares relacionados con el estrés oxidativo, un ejemplo de uno de estos procesos en común podría ser el aumento de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que se produce un incremento de estos metabolitos de forma similar al observado durante la presencia de compuestos inductores del estrés oxidativo, como es el caso del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Ramos-Moreno L. et al., 2019a). Sin embargo, ninguno de estos dos estudios previos proporciona información con respecto al efecto del litio sobre estos procesos celulares en común con el estrés oxidativo, ya que únicamente se ha estudiado para el caso del potasio y el sodio.

Con el fin de analizar los posibles efectos del litio sobre determinados procesos celulares relacionados con el estrés oxidativo se procedió a cuantificar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Estos compuestos se forman tras la reacción de dicho ácido con los productos procedentes de la lipoperoxidación, proceso por el cual las especies reactivas de oxígeno (ROS) reaccionan con los lípidos provocando la degradación de estos. Debido al origen de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), la cuantificación de estos metabolitos es una técnica que se puede utilizar para analizar las consecuencias del estrés oxidativo en la célula. Este ensayo se realizó adaptando la metodología proporcionada por Steels et al. (1994) en células de *D. hansenii* crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. La figura 16 muestra los resultados obtenidos.

Resultados

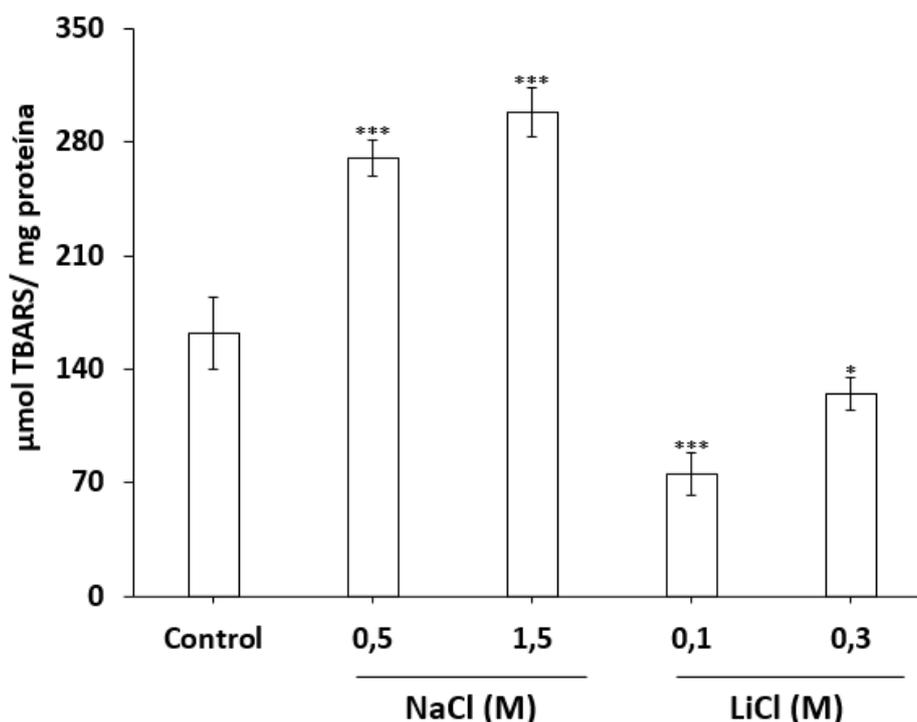


Figura 16. Cuantificación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en células crecidas en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las muestras fueron tomadas cuando el crecimiento celular alcanzó un valor de $A_{600nm} = 0,5-0,7$. Las Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) fueron extraídas y cuantificadas según el protocolo establecido por Steels et al. (1994). Los valores obtenidos están expresados en $\mu\text{mol TBARS/miligramos}$ de proteína. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Como se puede observar, a medida que la concentración de sodio en el medio aumentaba, los niveles de TBARS aumentaron de forma significativa con respecto al control. Este aumento no se produjo de forma proporcional por lo que los valores obtenidos fueron bastante similares tanto para una concentración de 0,5 M y 1,5 M de este catión, estos valores se situaron alrededor de 300 $\mu\text{mol TBARS/miligramos}$ de proteína en ambos casos. Cuando el litio estuvo presente en el medio, se puede observar que en ninguna de las condiciones estudiadas se produjo un aumento de la concentración de TBARS, sino al contrario, provocó una disminución significativa con respecto al control. Este descenso de los niveles de TBARS fue más notable cuando se utilizó una concentración de 0,1 M de este catión, alcanzando valores cercanos a 70 $\mu\text{mol TBARS/miligramos}$ de proteína que cuando las células crecieron en presencia de 0,3 M de litio, en este caso la concentración se situó alrededor de 140 TBARS/miligramos. Este

resultado fue inesperado ya que cabría esperar que una mayor concentración de litio provocara un descenso mayor en los niveles de TBARs. Sin embargo, en este caso diferentes concentraciones de este catión tuvieron efectos ligeramente diferentes.

Estos resultados vuelven a indicar que el sodio y el litio producen efectos diferentes en la levadura. Aparte, estos resultados podrían reforzar la idea de que el sodio podría estimular procesos relacionados con el estrés oxidativo, ya que el aumento de los niveles de TBARs podría deberse a una mayor presencia de especies reactivas de oxígeno en el interior celular. Por otro lado, los efectos del litio podrían no guardar una relación directa con el estrés oxidativo, tal y como está descrita para el caso del sodio, ya que la disminución en la concentración de TBARs podría ser consecuencia de un descenso de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior celular.

4. Ensayos metabólicos

El efecto de la sal sobre el metabolismo de *D. hansenii* ha sido estudiado por varios autores a lo largo de los años, sin embargo, estos estudios se han realizado de forma heterogénea impidiendo la obtención de conclusiones claras con relación a aspectos básicos como puede ser la capacidad fermentativa de la levadura. Por otra parte, la activación de rutas metabólicas alternativas, como la del ácido glioxílico, en presencia de sal propuesta por el grupo de investigación liderado por el Dr. Antonio Peña de la Universidad de Méjico (Sánchez N.S. et al., 2008) no ha sido estudiada en detalle por autores posteriores. Por último, la información sobre el efecto del litio en el metabolismo de esta levadura es escasa o casi inexistente ya que todos los estudios en relación con este tema se han realizado centrándose en los cationes potasio y sodio.

Con el fin de obtener y ampliar información sobre el efecto del sodio y litio sobre aspectos más metabólicos de la levadura, el último bloque de experimentos de esta tesis se han centrado en ensayos que abarcan diferentes técnicas como la medición, en el medio o en el interior celular, de metabolitos de interés mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), el análisis de actividades enzimáticas relacionadas con etapas tempranas de la glucólisis y de rutas metabólicas como el ciclo de Krebs o el ciclo del ácido glioxílico. Por último, se determinaron los posibles cambios en la transcripción de genes que codifican enzimas de interés.

4.1 Consumo de glucosa. Producción de glicerol y etanol.

En primer lugar, se quiso comprobar si la presencia de diferentes concentraciones de sal tenía efectos sobre aspectos básicos del metabolismo, como puede ser el consumo de la fuente de carbono del medio, en este caso glucosa. Adicionalmente, se quiso corroborar y ampliar la información obtenida en estudios previos sobre otros aspectos como son la producción de glicerol y la capacidad fermentativa de la levadura. Con esta finalidad, se midió la concentración de glucosa, glicerol y etanol en medio libre de células crecidas diferentes condiciones de salinidad mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los resultados obtenidos con relación al consumo de glucosa en diferentes concentraciones de sal (resultados no mostrados) fueron inconcluyentes, posiblemente debido al exceso de esta fuente de carbono en el medio, por lo que no se encontraron cambios significativos en las medidas realizadas. Como consecuencia, fue imposible obtener información sobre este posible efecto del estrés salino en el proceso del consumo de glucosa. En el caso de la producción de etanol, tanto en condiciones de salinidad por la presencia de sodio, en concentraciones de 0,5 M y 1,5 M, o litio en concentraciones de 0,1 M y 0,3 M, como en las del control, sin ninguna sal añadida, no se produjeron cantidades significativas de este metabolito, indicando así, que esta cepa de *D. hansenii* carecía de una mínima capacidad fermentativa tanto en ausencia como en presencia de sales. Por último, la figura 17 muestra la concentración extracelular de glicerol en presencia de diferentes concentraciones de sodio y litio.

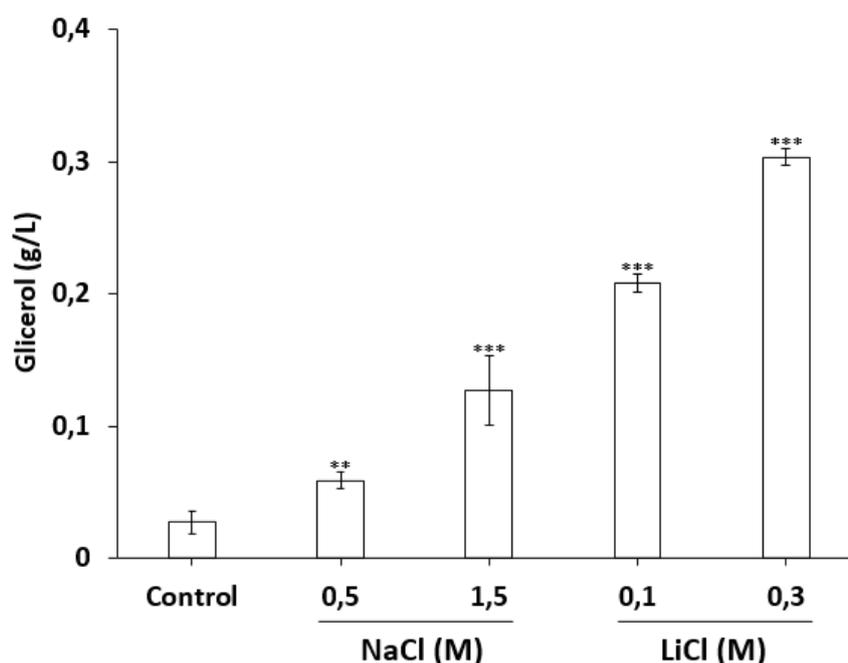


Figura 17. Concentración de glicerol medido en sobrenadante libre de células que crecieron en YNBc suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las muestras fueron tomadas cuando el crecimiento celular alcanzó un valor $A_{600nm} = 0,5-0,7$. El glicerol fue medido mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Los valores están expresados en gramos por Litro. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Resultados

Se puede observar que la presencia de sodio y litio producen un aumento significativo con respecto al control en los niveles extracelulares de glicerol, siendo este incremento más destacable en el caso del litio. El sodio y el litio actuaron de forma similar, sin embargo, el efecto del litio sobre la producción de glicerol fue más destacable que el efecto del sodio.

4.2 Actividades enzimáticas. Hexoquinasa y Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

Tras medir algunos metabolitos de interés en sobrenadante libre de células, se quiso analizar y comparar el efecto del sodio y el litio sobre la actividad de enzimas relacionadas con la etapa temprana de la glucólisis como pueden ser, la Hexoquinasa (HK) y la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

La hexoquinasa (HK) constituye la primera enzima de la vía glucolítica, es la encargada de transformar la glucosa en glucosa-6-fosfato mediante fosforilación, acción similar a la que realiza la glucoquinasa. La actividad de la hexoquinasa se determinó adaptando el protocolo establecido por Bergmeyer H.U. et al. (1985) en extractos celulares obtenidos tal y como se indica en el *Apartado 5.4.1 de Materiales y Métodos*. La figura 18 muestra la actividad enzimática expresada en número de veces con respecto al tiempo 0 (U/ mg proteína) a las 2 y 6 horas tras la adición de NaCl o LiCl al medio.

Como se puede observar el sodio produjo una disminución de actividad de esta enzima, mientras que el litio generalmente no tuvo efecto sobre la actividad enzimática, excepto en el caso de la concentración y el tiempo más altos, en el que se puede ver una disminución de la actividad.

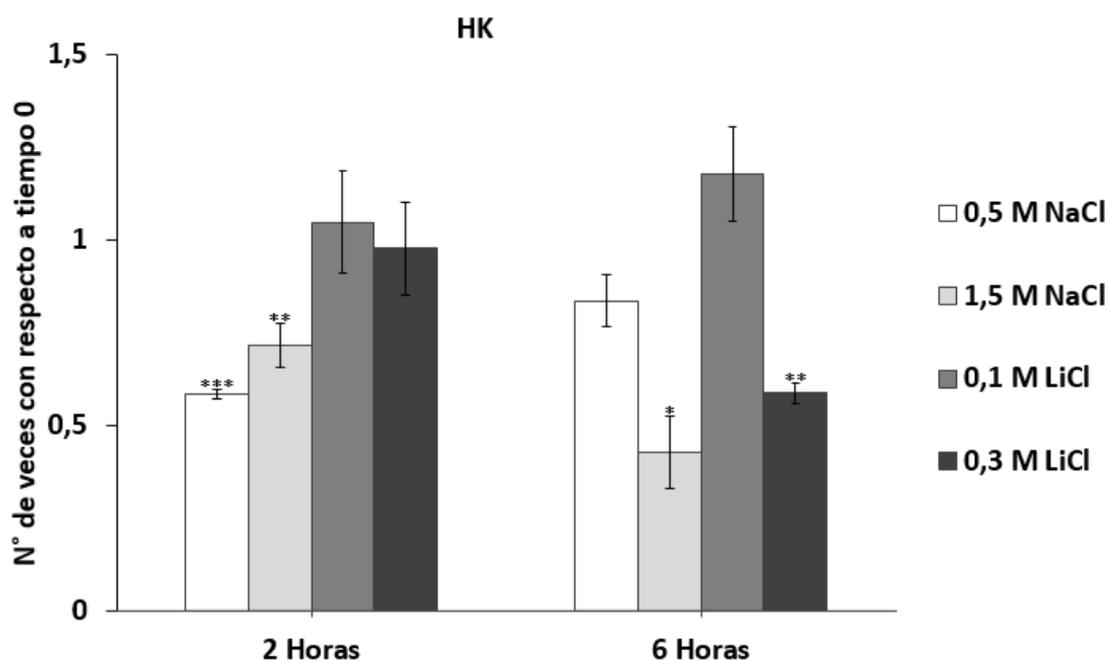


Figura 18. Actividad enzimática de la hexoquinasa (HK). Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Adicionalmente, se analizaron los posibles cambios en la actividad de la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en presencia de sodio y litio. Esta enzima está implicada en uno de los pasos más importantes de la glucólisis ya que de su reacción se obtiene 1,3-bifosfoglicerato y poder reductor en forma de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH). La actividad de esta enzima se cuantificó mediante la utilización del Kit comercial “GAPDH Activity Assay Kit” de Sigma-Aldrich (MAK277, Sigma) en extractos celulares obtenidos de igual manera que para el caso de la hexoquinasa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19.

Resultados

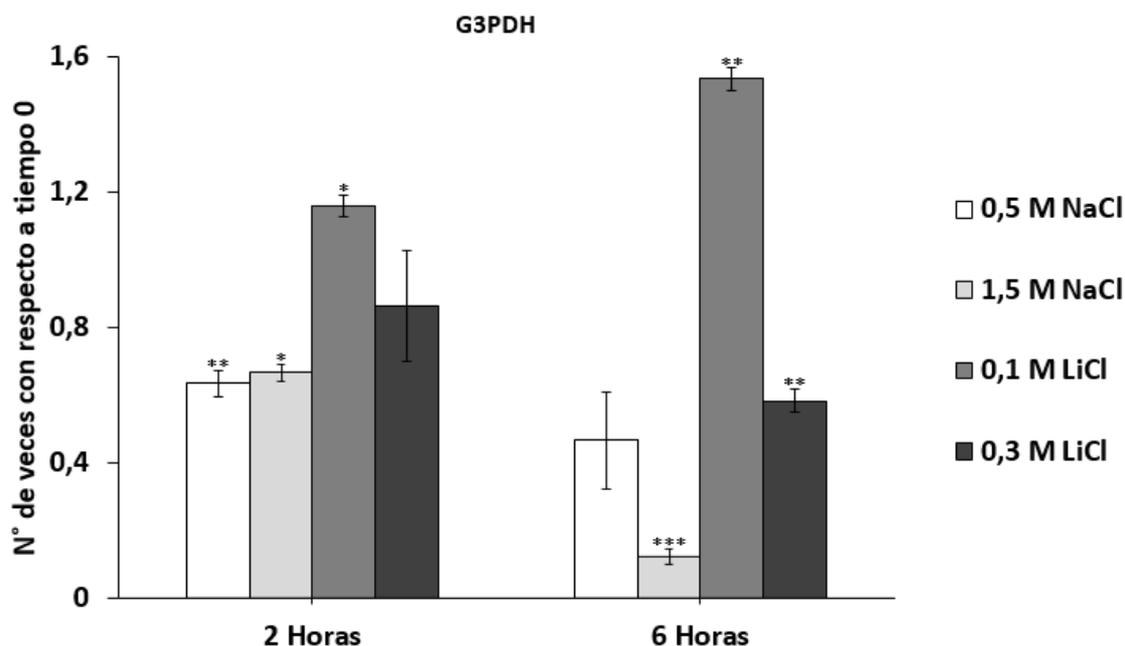


Figura 19. Actividad enzimática de la gliceraldehido-3-deshidrogenasa (G3PDH). Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Como podemos contemplar, el sodio inhibió la actividad de la G3PDH, por otro lado, el efecto del litio sobre la enzima dependió de la concentración añadida al medio. Cabe mencionar que una concentración relativamente baja de litio (0,1 M) produjo un aumento de la actividad enzimática en todo momento, al contrario que en el caso de 0,3 M de este catión que causó una disminución de la actividad a las seis horas.

La tabla 6 muestra un resumen de los resultados obtenidos durante el análisis de la actividad enzimática de la hexoquinasa (HK) y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). De forma general, el sodio y el litio no tuvieron el mismo efecto sobre estas dos enzimas, especialmente, durante las primeras dos horas. Cuando el ensayo se alargó hasta las seis horas, las concentraciones más perjudiciales de cada catión; 1,5 M para el caso del sodio y 0,3 M para el caso del litio, actuaron de forma similar causando un descenso de la actividad. También cabe destacar que, en la mayoría

de las ocasiones, una concentración de 0,1 M de litio produjo un aumento de la actividad.

Resultados

Tabla 6. Resumen de la Actividad enzimática correspondiente a la Hexoquinasa (HK) y a la Gliceraldehido-3-deshidrogenasa (G3PDH) medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.

Cación Externo	2 Horas				6 Horas			
	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M LiCl	0,3 M LiCl	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M LiCl	0,3 M LiCl
HK	0,58±0,01***	0,71±0,06**	1,04±0,14	0,98±0,12	0,83±0,07	0,43±0,09*	1,18±0,127	0,59±0,14**
G3PDH	0,63±0,04**	0,67±0,03*	1,16±0,03*	0,863±0,16	0,47±0,145	0,12±0,02***	1,53±0,03**	0,58±0,04**

Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

4.3 Ensayos relativos al ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato

Una vez analizados algunos aspectos básicos sobre los efectos de la sal sobre el metabolismo se quiso seguir profundizando más en este tema, prestando especial atención a como el sodio y litio afectan a diferentes rutas metabólicas como son el ciclo de Krebs o el ciclo de ácido glioxílico. El trabajo más relevante sobre este aspecto propone que se produce una activación del ciclo de ácido en presencia de una concentración 1 M de KCl y NaCl, esta activación afecta tanto a nivel de enzimático como a concentración metabolitos (Sánchez N.S. et al., 2008), sin embargo, no se ha profundizado en el estudio de este tema por autores posteriores.

El último bloque de experimentos realizados en esta tesis comprendió una serie de experimentos enfocados a estas dos rutas metabólicas. Se realizaron múltiples análisis desde un nivel más metabólico hasta uno más transcripcional. Hay que destacar que estos ensayos se realizaron centrándose en el punto de intersección entre ambas rutas metabólicas.

4.3.1 Determinación de metabolitos de interés

Primeramente, se determinaron los cambios en la concentración intracelular de metabolitos relacionados con el ciclo de Krebs y ciclo del ácido glioxílico. Esta cuantificación se realizó en extractos celulares obtenidos tal y como se indica en el *Apartado 5.4.1 de Materiales y Métodos* mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Como se puede observar en las células crecidas en presencia de sodio se produjo una mayor acumulación de los metabolitos relacionados con el ciclo de ácido glioxílico como son el glioxilato y el malato. Por el contrario, los niveles intracelulares de oxoglutarato, metabolito intermediario del ciclo de Krebs, disminuyeron de forma significativa. Cuando las células crecieron en presencia de litio, podemos contemplar que la concentración de los intermediarios del ciclo del ácido glioxílico, glioxilato y malato, disminuyó hasta niveles no detectables. Sin embargo, se puede observar un aumento significativo de los niveles de oxoglutarato.

Resultados

Tabla 7. Concentración de diferentes metabolitos relacionados con el ciclo del ácido tricarboxílico y del ácido glioxílico medidos en extractos de células crecidas en YNBc suplementado con NaCl o LiCl.

	Cación Externo				
	Control	NaCl		LiCl	
		0,5 M	1,5 M	0,1 M	0,3 M
Oxoglutarato	190,62±5,75	90±7,12**	78±5,23**	369,09±10,03*	277,65±16,52*
Glioxilato	0,85±0,15	4,48±0,29***	1,48±0,11*	N.D.	N.D.
Malato	2,1±0,07	9,00±0,15**	5,12±0,12*	N.D.	N.D.

Cuando el crecimiento celular alcanzó un valor de $A_{600nm} = 0,5-0,7$; los metabolitos fueron extraídos y se cuantificaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Los resultados están expresados en $\mu\text{g}/\text{miligramos}$ de proteína. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores que, por ser tan bajos durante la cuantificación, resultaron no detectables, están indicados como N.D. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Estos resultados nos indican que el sodio y el litio tienen efectos diferentes sobre estas rutas metabólicas. Además, refuerzan la idea de que el sodio podría aumentar el flujo metabólico hacia el ciclo del glioxilato debido al aumento de metabolitos relacionados con esta ruta en presencia de este catión, relegando a un segundo plano al ciclo de Krebs. Por otro lado, el litio no estimula, sino que podría reprimir esta ruta metabólica a favor de una mayor activación del ciclo de Krebs, ya el descenso de la concentración de intermediarios relacionado con el ciclo del ácido fue tan grande que alcanzaron valores no detectables en las condiciones estudiadas.

4.3.2 Actividad de la Isocitrato deshidrogenasa, Isocitrato liasa y Malato sintasa

Para complementar los resultados obtenidos en la cuantificación de los metabolitos de interés, se analizaron los posibles cambios en la actividad de enzimas claves del ciclo de Krebs y del ciclo del ácido glioxílico e implicadas en la síntesis de dichos metabolitos, como son, la Isocitrato deshidrogenasa (IDH), la Isocitrato liasa (ICL) y Malato sintasa (MS). Estas determinaciones se llevaron a cabo en extractos de células que crecieron en

YNBc hasta la fase exponencial, tras lo cual se añadieron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl.

La Isocitrato deshidrogenasa (IDH) fue la primera enzima cuya actividad fue analizada. Esta enzima forma parte del ciclo de Krebs y cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del isocitrato, obteniéndose 2-oxoglutarato y poder reductor en forma de NADH. El análisis se llevó a cabo adaptando la metodología proporcionada por Bernt & Bergmeyer (1974). La figura 20 muestra la actividad enzimática relativa con respecto al tiempo 0.

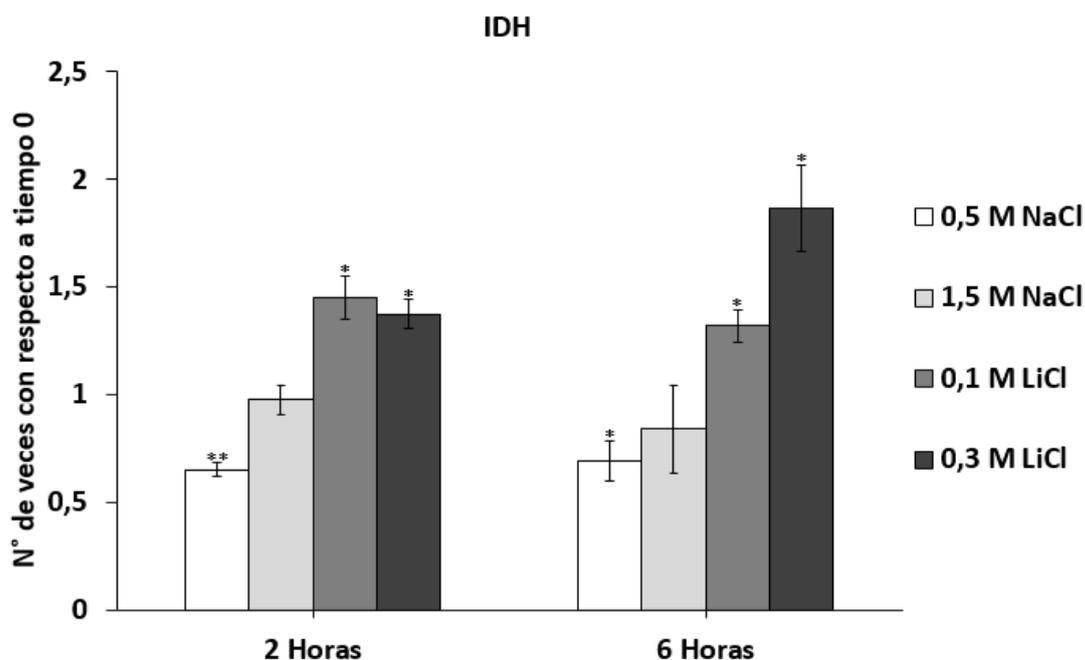


Figura 20. Actividad enzimática de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH). Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$

Los resultados obtenidos muestran que solamente una concentración moderada-alta de sodio (0,5 M) provocó un descenso de la actividad enzimática, mientras que el litio siempre causó un incremento situado entre 1,5 y 2 veces con respecto al tiempo 0.

Resultados

Posteriormente, se analizaron enzimas relacionadas con el ciclo del ácido glioxílico como son la Isocitrato Liasa (ICL) y la Malato sintasa (MS). La Isocitrato liasa es la enzima que inicia la ruta del ácido glioxílico, fragmentando el isocitrato. Como productos de esta reacción se obtienen glioxilato y succinato. La actividad enzimática se determinó mediante la adaptación del protocolo proporcionado por Chell R.M et al., (1978). La figura 21 muestra los resultados obtenidos.

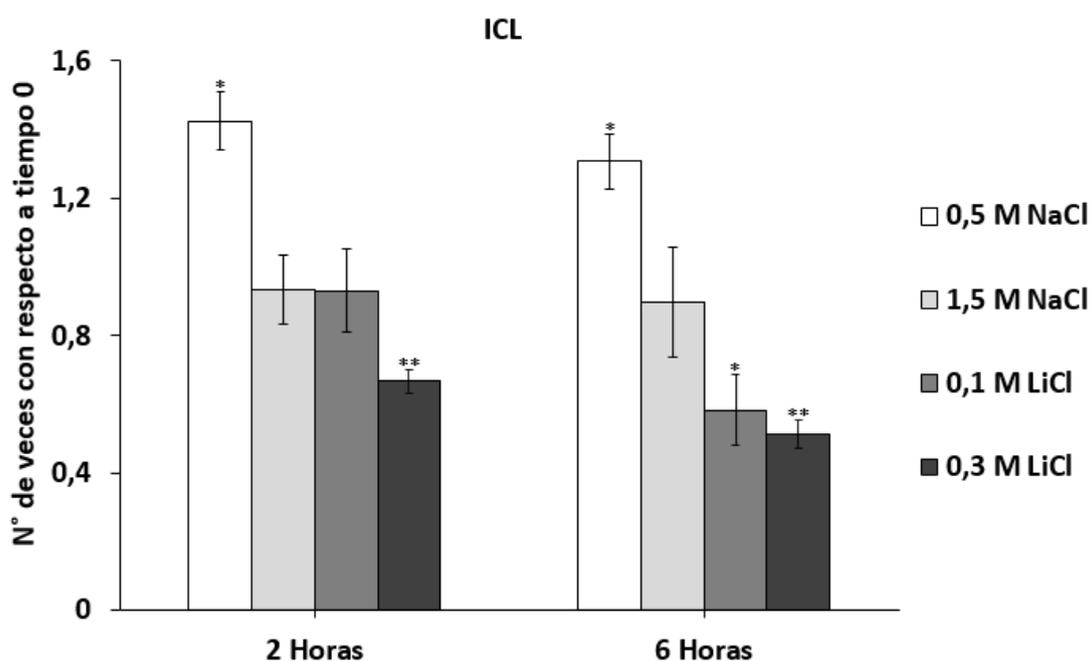


Figura 21. Actividad enzimática de la Isocitrato liasa (ICL). Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Como se puede observar, únicamente afectó una concentración moderada-alta (0,5 M), de sodio produjo un aumento de la actividad, en cambio, el litio la disminuyó. Hay que subrayar el efecto del sodio fue más notable en etapas tempranas del ensayo, mientras que el litio tuvo un mayor impacto en etapas tardías y en el caso de la concentración más alta.

Por último, se analizó la actividad de la Malato sintasa (MS). Esta enzima cataliza la transferencia de un grupo cetilo donado por el Acetil-CoA, convirtiendo el glicoxilato en malato. El análisis de la actividad enzimática se llevó a cabo según el protocolo establecido por Silverstein R.M et al. (1975). La actividad con respecto al tiempo 0 de esta enzima se encuentra representada en la figura 22.

Al igual que ocurrió cuando se estudió los cambios en la actividad de la Isocitrato liasa, una concentración moderada-alta de sodio originó un aumento de la actividad, en cambio, el litio afectó negativamente al rendimiento de la enzima. Si observamos detalladamente, el aumento provocado por el sodio fue más notable a las dos horas, alcanzado valores cercanos a 2 veces con respecto al tiempo 0. En el caso del lito, su efecto fue más notable a las seis horas de tratamiento.

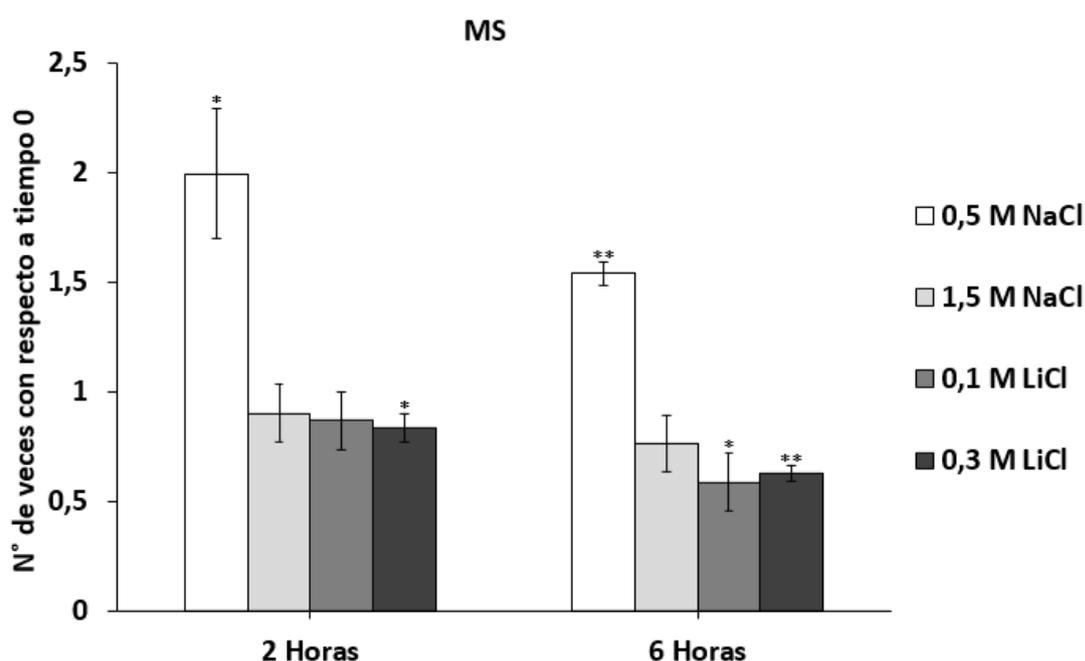


Figura 22. Actividad enzimática de la Malato sintasa (MS). Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Resultados

La tabla 8 muestra una visión resumida del efecto del sodio y en el litio sobre las enzimas claves de la intersección entre el ciclo de Krebs y el ciclo del ácido del glioxílico. De forma general, el sodio estimuló la actividad de tanto de la Isocitrato liasa como la de la Malato sintasa, enzimas relacionadas con el ciclo del ácido glioxílico. Por el contrario, la presencia de este catión inhibió parcialmente la actividad de la Isocitrato deshidrogenasa. Si se observa detalladamente, solo una concentración de 0,5 M de este catión tuvo un efecto significativo sobre todas las enzimas estudiadas en este apartado, cosa que no siempre ocurre para 1,5 M de NaCl. La presencia de litio en el medio produjo un efecto negativo sobre las enzimas relacionadas con la ruta del ácido glioxílico, mientras que, originó un incremento de la actividad de la Isocitrato deshidrogenasa, enzima clave del ciclo de Krebs. Las concentraciones de litio estudiadas provocaron un efecto similar en la mayoría de las ocasiones.

Tabla 8. Resumen de la actividad enzimática correspondiente a la Isocitrato deshidrogenasa (IDH), Isocitrato liasa (ICL) y a la Malato sintasa (MS) medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl.

Cación Externo	2 Horas				6 Horas			
	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M NaCl	0,3 M NaCl	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M NaCl	0,3 M NaCl
IDH	0,65±0,03**	0,98±0,07	1,45±0,10*	1,38±0,07*	0,70±0,09*	0,84±0,204	1,32±0,07*	1,87±0,2*
ICL	1,42±0,08*	0,93±0,10	0,93±0,12	0,66±0,04**	1,31±0,08*	0,90±0,16	0,58±0,102*	0,51±0,04**
MS	1,99±0,3*	0,91±0,13	0,87±0,13	0,83±0,03*	1,54±0,05*	0,77±0,13	0,59±0,13*	0,63±0,03**

Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se calcularon en U/mg proteína y se representaron en N° de veces con respecto al tiempo 0. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Resultados

4.3.2 Análisis de los niveles de transcripción

Una vez comprobado el efecto del sodio y litio sobre la actividad enzimática en la intersección entre el ciclo de Krebs y el ciclo del ácido glicólico, se quiso verificar si la presencia de estos dos cationes afectaba a la expresión de los genes que codifican las diferentes enzimas. Para ello, se determinaron los niveles de expresión de estos genes mediante la realización de RT-PCR en células que fueron tratadas tal y como se indica en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos.

Los primeros genes analizados fueron *IDH1* (*DEHA2C10758g*) e *IDH2* (*DEHA2G05786g*) que codifican la subunidad 1 y la subunidad 2 de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH). Ambas subunidades son necesarias para la formación del centro activo de la enzima. La figura 23 muestra los cambios en la expresión de ambos genes tras la adición de NaCl y LiCl al medio.

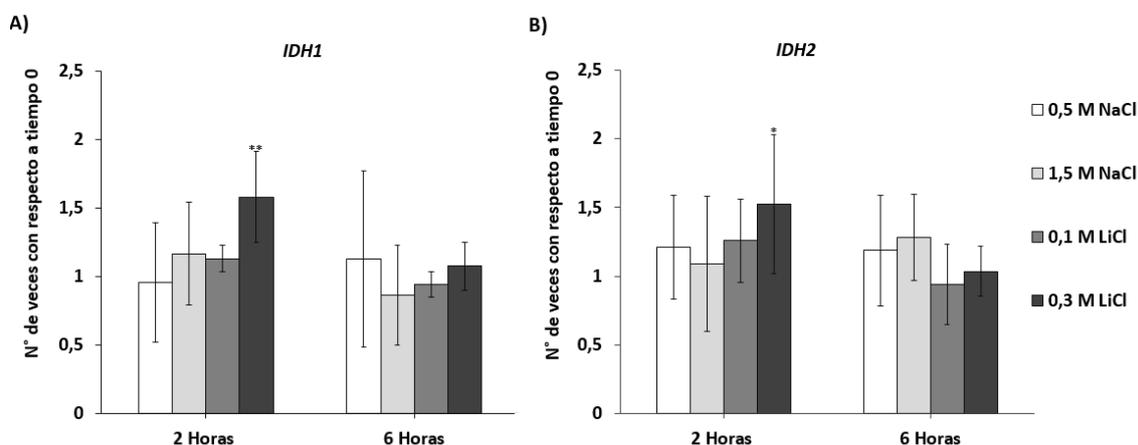


Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de los genes *IDH1* (*DEHA2C10758g*) (A) e *IDH2* (*DEHA2G05786g*) (B). Ambos genes codifican las subunidades necesarias para la formación del centro activo de la enzima Isocitrato deshidrogenasa, enzima perteneciente al ciclo del ácido cítrico. Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBC hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual, se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se encuentran expresados en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Como se puede contemplar el sodio no tuvo ningún efecto sobre la transcripción de ambos genes. De igual forma, el litio no afectó a dicho proceso, excepto en el caso de la concentración más alta de este catión a las dos horas.

Posteriormente, se cuantificaron los posibles cambios en los niveles de transcripción del gen *ICL* (*DEHA2D12936g*) que codifica la enzima Isocitrato liasa (ICL). La figura 24 muestra la expresión relativa del gen tras exponer a las células a diferentes sales.

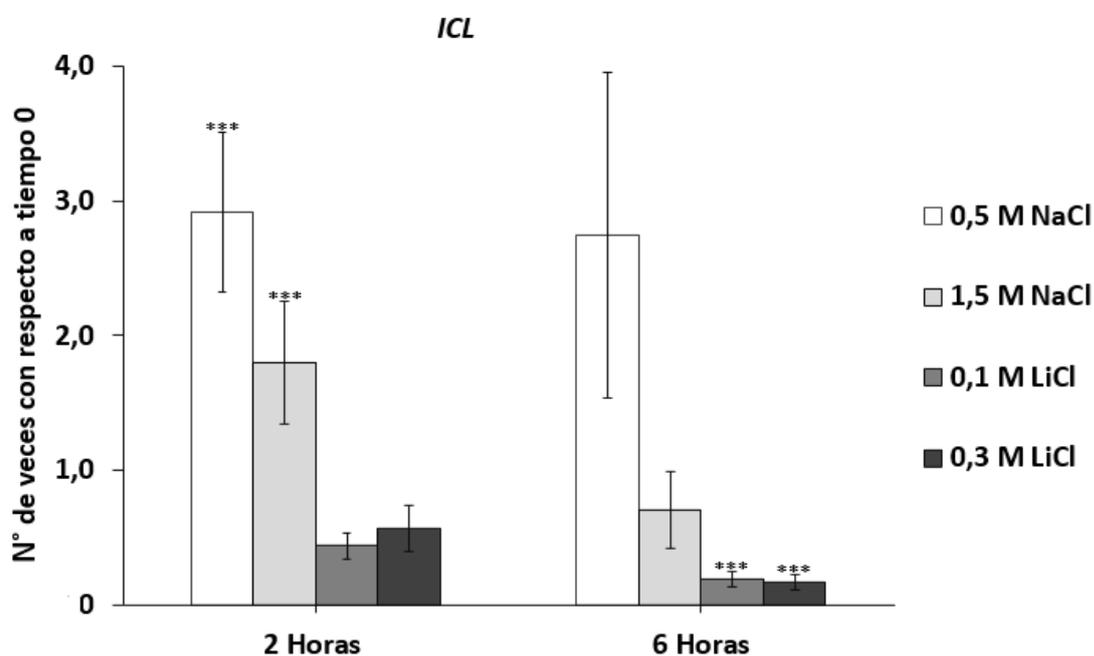


Figura 24. Cambios en los niveles de expresión del gen *ICL* (*DEHA2D12936g*). Este gen codifica la enzima Isocitrato liasa, enzima que inicia el ciclo del ácido glicoxílico. Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual, se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se encuentran expresados en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: ***, $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos muestran que el sodio causó un aumento de la transcripción de este gen, mientras que el litio inhibió dicho proceso. Hay que destacar que los efectos del sodio fueron más notables en etapas tempranas y en concentraciones moderadas-altas del tratamiento. Por otra parte, el litio tuvo efecto en etapas más tardías y de forma similar entre las concentraciones utilizadas.

Resultados

Finalmente, se determinaron los posibles cambios en la expresión del gen *MS* (*DEHA2E13530g*) que codifica la enzima Malato sintasa. En la figura 25 se representaron los cambios en la transcripción del gen *MS*.

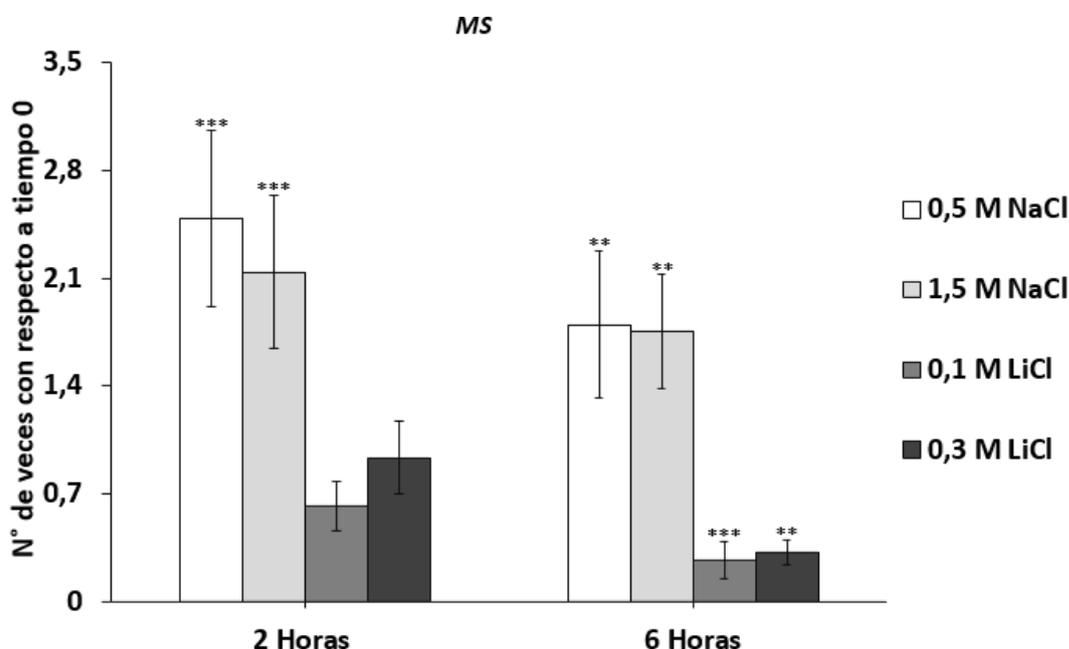


Figura 25. Cambios en los niveles de expresión del gen *MS* (*DEHA2E13530g*). Este gen codifica la enzima Malato sintasa, enzima que actúa en el ciclo del ácido glicoxílico. Las células de *D. hansenii* crecieron en YNBc hasta alcanzar la fase exponencial ($A_{600nm} = 0,5-0,7$) tras lo cual, se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl o LiCl. Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados se encuentran expresados en N° de veces con respecto al tiempo 0, tiempo previo a la adición de las diferentes concentraciones de sal. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto al control fueron representados como: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Como se puede observar el sodio y el litio actuaron de forma similar a cuando se estudió la transcripción del gen *ICL*, el sodio estimuló la transcripción del gen *MS* a diferencia del litio que la inhibió. También se puede observar que el mayor aumento de la transcripción se produjo en etapas tempranas y con una concentración moderada-alta de alta de sodio (0,5 M), así mismo, el litio solo influyó en dicho proceso a las seis horas de tratamiento.

La tabla 9 resume el efecto del sodio y el litio sobre la expresión de los genes estudiados. Mientras que el sodio no tiene ningún efecto sobre los genes necesarios para el

ensamblaje del centro activo de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH), este si provoca una estimulación en la transcripción de los genes que codifican enzimas relacionadas con el ciclo del ácido glioxílico. Con respecto a litio, cabe destacar que estimuló la expresión tanto de *IDH1* como de *IDH2* en casos excepcionales, sin embargo, provocó una disminución de la expresión de los genes que codifican la Isocitrato liasa (*ICL*) y la Malato sintasa (*MS*), indicando una disminución del flujo metabólico hacia el ciclo del ácido glioxílico a favor del ciclo de Krebs.

Resultados

Tabla 9 Resumen de los cambios en la expresión correspondiente a los genes IDH1, IDH2, ICL y MS medidas en células incubadas tras adicionar diferentes concentraciones de NaCl y LiCl

Cación externo	2 Horas				6 Horas			
	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M LiCl	0,3 M LiCl	0,5 M NaCl	1,5 M NaCl	0,1 M LiCl	0,3 M LiCl
<i>IDH1</i>	0,96±0,45	1,17±0,37	1,13±0,45	1,58±0,33**	1,13±0,64	0,86±0,36	0,94±0,3	1,08±0,18
<i>IDH2</i>	1,21±0,38	1,09±0,48	1,25±0,3	1,53±0,5**	1,19±0,4	1,28±0,31	0,94±0,29	1,04±0,18
<i>ICL</i>	2,92±0,59***	1,8±0,045***	0,44±0,1	0,57±0,17	2,72±1,2	0,7±0,28	0,19±0,05***	0,16±0,05***
<i>MS</i>	2,48±0,57***	2,14±0,5***	0,62±0,15	0,93±0,23	1,79±0,48**	1,75±0,37**	0,26±0,12***	0,31±0,08***

Las células se incubaron a 26°C y 150 rpm durante 2 y 6 horas. Los resultados están expresados en N° de veces con respecto al tiempo 0. La media y la desviación estándar fueron estimadas a partir de al menos tres experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos respecto a su control fueron representados como: **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Discusión

1. *Debaryomyces hansenii* y halotolerancia

Como se ha mencionado a largo de la presente tesis, *Debaryomyces hansenii* es una levadura osmo-, xero- y generalmente considerada halotolerante (Breuer & Harms, 2006), aunque este último término ha generado controversia entre los diferentes autores, ya que algunos de ellos la consideran halófila en vez de halotolerante (González-Hernández & Peña, 2002; Navarrete C. et al., 2022). El carácter halófilo/halotolerante de esta levadura se ha estudiado a lo largo de los años. Estas investigaciones no han proporcionado el motivo exacto del porqué de la halotolerancia de *D. hansenii*, sin embargo, todos los estudios realizados sobre este tema confluyen en la misma idea general de que el desarrollo de esta levadura en ambientes hipersalino se debe al funcionamiento en conjunto de las múltiples adaptaciones presentes (Breuer & Harms, 2006; Prista C. et al., 2016). De igual forma, estas publicaciones han aportado información clave sobre diferentes aspectos de la resistencia a sal de esta levadura, por ejemplo, se conoce que el sodio, un catión generalmente tóxico, no solo posee un efecto beneficioso sobre el crecimiento, sino que, al igual que el potasio, posee un efecto protector frente a diferentes agentes inductores de estrés (Prista C. et al., 1997; Almagro A. et al., 2000; Papouskova and Sychrova, 2007; Navarrete C. et al., 2009; Michán C. et al., 2013).

En las condiciones estudiadas en esta tesis se ha demostrado que tanto en medio sólido como en medio líquido (Figuras 6 y 7), el sodio favorece el crecimiento de la levadura, especialmente, una concentración de 0,5 M de este catión que parece ser la óptima, también para otros procesos celulares estudiados a lo largo de la presente tesis. Por otra parte, se ha comprobado que el sodio puede llegar a acumularse en grandes cantidades, en parte, gracias a los diferentes transportadores de membrana como TRK1 y HAK1 (Prista C. et al., 2016), y a un transportador específico a altas concentraciones de sodio aún no caracterizado (B5RUG0) (Navarrete C. et al., 2021b).

A pesar de los múltiples estudios realizados, la información sobre cómo afectan los diferentes cationes alcalinos a la fisiología de *D. hansenii* está casi totalmente centrada en los cationes potasio y sodio, dejando en un segundo plano a otros cationes como el litio, catión generalmente tóxico y utilizado como análogo en estudios de tolerancia a sodio. Como se ha mencionado anteriormente solo existen dos publicaciones en las que

se estudia el efecto del litio sobre la fisiología de esta levadura y en ambas, se propone que este catión es perjudicial (Prista C. et al., 1997; Almagro A. et al., 2001). En las condiciones en las que se ha realizado esta tesis, se ha podido comprobar que el litio es un catión tóxico, incluso en concentraciones relativamente bajas en comparación a las habitualmente estudiadas para potasio y sodio. Asimismo, se ha podido ver que la acumulación intracelular de este catión es muy baja en comparación con la observada para otros cationes alcalinos como puede ser el caso de potasio o sodio. Esto nos indica que el litio es un elemento tóxico incluso en pequeñas cantidades tanto extracelular como intracelularmente, además, se ha podido determinar que este catión no precisamente produce un daño letal a las células, sino que inhibe directamente su crecimiento. A pesar de que en este estudio no se ha pretendido proporcionar información sobre las dianas específicas del litio, este catión, al igual que el sodio, es conocido por inhibir enzimas como HAL2, que codifica una nucleotidasa que desfosforila el 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP) y 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato, en levaduras. (Murguía J.R. et al., 1996). También, se sabe que el litio no solo inhibe enzimas relacionadas con la vía glucolítica como puede ser la fosfoglucomutasa (Csutora P. et al., 2005;) sino que también afecta negativamente a enzimas vinculadas a otras funciones biológicas de las levaduras, como el procesamiento de los múltiples tipos de ARN como son la MRP, una endoribonucleasa que está involucrada en la maduración del ARN ribosomal, y de las exoribonucleasas XRN1p y RAT1p (Dichtl B. et al., 1997). Algunos de estos efectos podrían darse en el caso de *D. hansenii*, por lo que, sería de gran interés realizar más estudios que se centraran en analizar las dianas habituales de este catión con el fin de poder obtener más información sobre la toxicidad del litio y poder determinar las causas exactas de este efecto.

Como se ha dicho previamente, el sodio es conocido por producir un efecto protector frente a agentes externos como alto pH o estrés oxidativo (Almagro A. et al., 2000; Papouskova and Sychrova, 2007; Navarrete C. et al. 2009). En este estudio se ha podido comprobar que el sodio mitiga el efecto tóxico del litio, cabe mencionar que este hecho no estaba documentado a pesar de estar detalladamente estudiado para el caso del potasio (Prista C. et al., 1997). Las mediciones del contenido intracelular de litio en presencia de sodio y potasio realizadas en nuestras condiciones (Tabla 5 y Figura 14) nos

Discusión

dan a entender que una de las causas de este efecto mitigador es la competencia de los diferentes cationes por los transportadores presentes en la membrana celular, provocando una disminución del flujo hacia el interior celular del litio por lo que se acumula en menor medida. No obstante, no se podría descartar la idea de que otros mecanismos celulares estuviesen involucrados en la mitigación del efecto tóxico del litio en presencia de sodio y potasio, como podría ser posibles cambios en la fluidez de membrana, al igual que ocurre en la protección del sodio frente a temperatura o pH (Almagro A. et al.,2000).

Uno de los principales hábitats donde se puede aislar *D. hansenii* es el agua de mar (Breuer & Harms, 2006) cuyo pH oscila entre 7,5 y 8,4; estas condiciones dificultan el flujo de cationes a través de los diferentes transportadores ya que algunos de ellos actúan dependientemente de protones, por lo que una menor concentración en el medio afecta negativamente a su funcionamiento. Con esta premisa, se quiso comprobar si el efecto beneficioso del sodio y la tolerancia litio se veían afectados por el pH. Sin embargo, los resultados obtenidos en los diferentes pH fueron idénticos entre sí, indicando que, en las condiciones estudiadas, el pH no influye en la fisiología de esta levadura. Estos resultados contradicen a un estudio previo, en el que se concluye que un pH relativamente alto afecta negativamente al crecimiento y a la halotolerancia de *D. hansenii* (Sánchez N.S. et al.,2018), posiblemente la causa de la contradicción reside en que las condiciones en las que se realizó este estudio difieren con los ensayos realizados en esta tesis, como puede ser la cepa utilizada o las condiciones de crecimiento empleadas.

Aparte de comprobar el efecto del sodio y litio sobre el crecimiento y la homeostasis iónica de la levadura, también se ha estudiado el efecto de estos cationes en otros procesos celulares como puede ser, la acumulación de fosfato en el interior celular. El fosfato inorgánico (Pi) es un nutriente necesario para el desarrollo de múltiples procesos biológicos como la síntesis de biomoléculas, metabolismo energético o modificación de proteínas, actuando como factor limitante de crecimiento en la mayoría de los organismos (Secco D. et al., 2012; Kamlesh K.Y. et al., 2016). Previamente, se había informado que *D. hasnenii* acumula fosfato inorgánico (Pi) en presencia de altas concentraciones de sodio (1 M) (Sánchez N.S. et al., 2008), sin embargo, se desconocía

si ocurría de igual forma para otras concentraciones de este catión y no se había descrito nada para el caso del litio. En el presente estudio, solo se observó un aumento de la concentración de fosfato en el caso de una concentración moderada-alta de sodio (0,5 M). Esto podría estar relacionado con el aumento de la expresión de los genes *PHO84* y *PHO89*, que codifican un cotransportador de fosfato/H⁺ y un cotransportador fosfato/Na⁺ respectivamente, en condiciones similares (Navarrete C. et al., 2021b). Aunque la acumulación de fosfatos se ve favorecida en condiciones óptimas de crecimiento, en presencia de una concentración de 0,5 M de sodio, un exceso de este catión (1,5 M), al igual que la presencia de litio, afectan negativamente a dicho proceso, sin embargo, se desconocen las causas de este efecto negativo. Como se ha dicho anteriormente, el fosfato tiene un papel fundamental en la célula, una disminución de este macronutriente podría implicar un desarrollo subóptimo de las diferentes funciones biológicas, por el contrario, una mayor acumulación de fosfato podría resultar beneficioso para la célula favoreciendo la adaptación al medio.

Los seres vivos, en este caso las levaduras, presentan redes complejas a respuestas contra diferentes tipos de estrés (Hohmann and Mager, 2003). Estas redes permiten que los organismos se adapten a los diferentes ambientes. Muchas de estas vías tienen mecanismos en común, como es el caso del estrés salino y el estrés oxidativo. En diferentes estudios se ha podido confirmar que la respuesta a estrés salino inducido por sodio o potasio de *D. hansenii* activa elementos relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (Navarrete C. et al., 2009; Ramos-Moreno L. et al., 2019a) Un ejemplo de esta relación entre ambos tipos de estrés sería el aumento de la concentración intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de ambos cationes (Ramos-Moreno L. et al., 2019a). Sin embargo, se desconoce si otros cationes alcalinos, como por ejemplo el litio, son capaces de activar respuestas relacionadas con el estrés oxidativo, por lo que, en esta tesis se ha realizado una aproximación para despejar esta incógnita mediante la cuantificación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARs), moléculas directamente asociadas con las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los resultados obtenidos en la cuantificación de Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARs) guardan relación con lo observado en estudios previos, reforzando la idea general de que el sodio es capaz de estimular procesos habituales en

Discusión

la respuesta al estrés oxidativo (Navarrete C. et al., 2009; Ramos-Moreno L. et al., 2019a) ya que el aumento de los TBARs puede indicar una mayor presencia de especies reactivas de oxígeno. Con respecto al litio, los resultados indican que la respuesta a la presencia de este catión no compartiría mecanismos con el estrés oxidativo o si lo hace, ocurriría de manera diferente a la observada para el sodio, por lo que, sería necesario la realización de más ensayos para determinar la relación entre el estrés salino inducido por el litio y el estrés oxidativo.

A lo largo de esta primera parte de la discusión hemos podido comprobar que, en nuestras condiciones, lejos de actuar como análogo, el litio tiene efectos diferentes al sodio en *D. hansenii*. Por otra parte, una concentración de 0,5 M de sodio parece inducir un rendimiento óptimo en los diferentes procesos celulares hasta ahora estudiados, indicando así, que esta concentración es la más favorable para *D. hansenii*. Este hecho coincide con un estudio previo en el que se afirma que el sodio es el catión adecuado para favorecer el crecimiento de la levadura (Navarrete C. et al., 2021b), aunque, difiere en la concentración óptima (1 M para este caso). La diferencia puede deberse a que este estudio se ha llevado a cabo en biorreactores donde se puede llevar un control más estricto de las diferentes variables durante el crecimiento celular o a la utilización de células previamente adaptadas a una alta concentración de sal.

2. Estrés salino y metabolismo

A lo largo de los años se han realizado pocos estudios en relación al metabolismo de *D. hansenii* y el efecto de la sal sobre él. Aún no se ha logrado obtener conclusiones claras de algunos aspectos del metabolismo debido a la poca homogeneidad de los diferentes experimentos realizados o a las diferencias entre cepas. Uno de los aspectos que actualmente se sigue debatiendo es la capacidad fermentativa de *D. hansenii*. Algunos autores afirman que esta levadura posee un metabolismo completamente aerobio (Gancedo & Serrano, 1989; Breuer & Harms, 2006) mientras que otros autores concluyen que esta levadura tiene capacidad fermentativa y que esta se incrementa en presencia de sal. Por ejemplo, Calahorra et al., (2009) propone que esta levadura es capaz de fermentar glucosa y que la presencia de 1 M de NaCl o KCl incrementa dicho proceso. En nuestras condiciones de estudio, no se ha podido confirmar la capacidad fermentativa de esta levadura, coincidiendo así con otros autores (Navarrete C. et al., 2021a, b). En esta tesis, se ha intentado corroborar que *D. hansenii* posee capacidad fermentativa de *D. hansenii*, sin embargo, no se ha logrado obtener resultados similares a Calahorra et al., (2009) en ninguna de las condiciones estudiadas, incluyendo el control. Este hecho puede deberse a la utilización de cepas o a otras diferencias, como puede ser, las condiciones de crecimiento. Sin embargo, se ha podido demostrar que la cepa CBS767 de *D. hansenii* no produce etanol.

Otro aspecto del metabolismo más estudiado es la producción de glicerol en presencia de sal. Frente al estrés osmótico, los seres vivos han desarrollado múltiples estrategias, una de ellas, es la producción y acumulación de solutos compatibles (Welsh D.T., 2000; Chen Z. et al., 2007;). El glicerol es un soluto que juega un papel importante en la osmorregulación en las levaduras (Nevoigt & Stahl, 1997; Goold H.D. et al., 2017), asimismo, la producción y acumulación de este soluto suelen ocurrir de forma paralela (Adler L. et al., 1985; André L. et al., 1988; Aslankoochi E., et al., 2015). Los diferentes estudios realizados coinciden en que *D. hansenii* es capaz de producir y acumular glicerol cuando el sodio se encuentra presente en el medio (Adler L. et al., 1985; Prista C. et al., 2005, Navarrete C. et al., 2021a), posteriormente se demostró que la presencia de sal en medio produce un aumento de la expresión del gen *GPD1* (Thomé P.E., 2004) cuya sobreexpresión se traduce en un incremento de la Glicerol-3-fosfato Deshidrogenasa

Discusión

(G3PD), enzima implicada en la formación de glicerol-3-fosfato a partir de la reducción de dihidroxiacetona fosfato. Por otra parte, en el grupo donde se ha desarrollado la presente tesis se ha demostrado en varias ocasiones (Prista C. et al., 1997; Martínez J.L. et al., 2011; Michán C. et al., 2013; Herrera R. et al., 2017), incluyendo este trabajo, que *D. hansenii* acumula mucho sodio y que por tanto este catión podría estar actuando como un soluto compatible complementario al glicerol. Sin embargo, la información del efecto del litio sobre la producción y acumulación de glicerol es escasa. Los resultados obtenidos de la cuantificación de glicerol mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) (Figura 17) muestran que no solo se produce un aumento del glicerol en el medio extracelular en presencia de sodio, sino que también en presencia de litio. De hecho, los niveles de glicerol son más altos en presencia de litio y a pesar de haber utilizado concentraciones menores a las habitualmente utilizadas para el sodio, posiblemente debido a que, al acumularse grandes cantidades de sodio en el interior celular, este catión actúa como soluto compatible, de modo que es necesaria una menor cantidad de glicerol. Por el contrario, el litio se acumula en pequeñas cantidades, por lo que en este caso el soluto más compatible sería el glicerol, produciéndose así una mayor cantidad de este compuesto. Principalmente, la producción de glicerol es una estrategia común para la mayoría de las levaduras utilizada con el fin de mitigar el efecto del estrés osmótico (Nevoigt & Stahl, 1997), aunque podría estar relacionado con otros procesos fisiológicos, pero actualmente se desconocen.

En la presente tesis, se ha querido estudiar el efecto del sodio y el litio durante la primera etapa de la glucólisis, para ello se realizaron análisis de las actividades de dos enzimas, la Hexoquinasa (HK) y la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Ambas enzimas son reprimidas por la presencia de sodio en el medio, especialmente, en el caso de una concentración de 1,5 M de este catión. Los resultados obtenidos coinciden con estudios previos, en los que la cantidad de proteínas relacionadas con la primera etapa de la glucólisis se reducía a las tres horas de adición de sodio al medio (Gori K. et al., 2007). Con respecto al litio, los efectos de este catión sobre la actividad dependieron de la concentración añadida al medio, de forma que una concentración baja de este catión (0,1 M) produjo un aumento de la actividad de ambas enzimas en la mayoría de los casos estudiados. Este hecho podría formar parte de una estrategia para intentar hacer frente

el efecto tóxico del litio, sin embargo, no parece ser una maniobra viable para el caso de una concentración relativamente alta de este catión (0,3 M) debido posiblemente al estado crítico en el que se encuentran las células. Sería interesante realizar estudios adicionales con el fin de aclarar el efecto del sodio y del litio sobre las primeras etapas de las glucólisis en los que no solo se analice la actividad enzimática o los posibles cambios en la concentración de los metabolitos relacionados, sino que también tengan un enfoque más transcriptómico de este proceso. Así mismo, también sería interesante ampliar el estudio a otras levaduras.

El grupo de investigación encabezado por el Dr. Antonio Peña propuso que, la presencia de una concentración 1 M de KCl o NaCl induce un aumento del flujo metabólico hacia el ciclo del ácido glioxílico (Sánchez N.S. et al., 2008). No obstante, no se han realizado estudios posteriores con el fin de obtener más información sobre este hecho. El ciclo del ácido glioxílico es considerado un *bypass* que permite la utilización de compuestos más pequeños (de dos o tres carbonos) como fuente de carbono. Se ha podido comprobar que organismos que carecen de las enzimas de este ciclo, como por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*, son incapaces de asimilar compuestos de carbono más sencillos, como es el caso del etanol, presentando así una menor adaptación frente a otras levaduras capaces de metabolizar dichos compuestos (Flores C. et al., 2000). Por otra parte, esta ruta metabólica es necesaria para algunos procesos celulares, como es el caso de la patogenicidad de algunas especies del género *Candida* (Lorenz & Finz, 2001), y forma parte de la respuesta a diferentes tipos de estrés como puede ser el estrés oxidativo (Ahn S. et al., 2016) o el provocado por la deficiencia de nutrientes, como en el caso de las bacterias marinas (Koedooder C. et al., 2018).

Unos de los principales objetivos de esta tesis ha sido estudiar este posible cambio de patrón metabólico desde tres enfoques diferentes, a través del análisis de los posibles cambios en la concentración de metabolitos relacionados con esta ruta metabólica, seguido de un estudio de la actividad de las enzimas de este enclave metabólico y de la transcripción de sus correspondientes genes. La figura 26 muestra un resumen global del efecto del sodio y del litio en las rutas metabólicas estudiadas. De forma general, y bajo nuestras condiciones de estudio, se ha podido confirmar que el sodio induce la activación del ciclo del glioxilato, esta propuesta se basa en el aumento de la

Discusión

concentración de metabolitos relacionados con dicha ruta metabólica como son el glioxilato y el malato, así como, un aumento de la actividad de enzimas pertenecientes al ciclo del ácido glioxílico, como son la Isocitrato liasa (ICL) o la Malato sintasa (MS). Además, la transcripción de los genes que codifican la Isocitrato liasa (*DEHA2D12936g*) y la Malato sintasa (*DEHA2D13650g*) se incrementó en presencia de sodio. Cabría mencionar que, una concentración de 0,5 M de sodio produjo un efecto más notable que el caso de 1,5 M de este catión, reforzando así la idea que una concentración de 0,5 M de sodio sería la óptima para el crecimiento de *D. hansenii*. Con respecto al litio, cabe destacar que, al contrario que el sodio, no indujo un aumento del flujo hacia el ciclo del ácido glioxílico, sino que, lo inhibió parcialmente. Por otra parte, en presencia de este catión se pudo observar un aumento del ciclo Krebs, reflejado en un incremento de la concentración del oxoglutarato y de la actividad enzimática de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH).

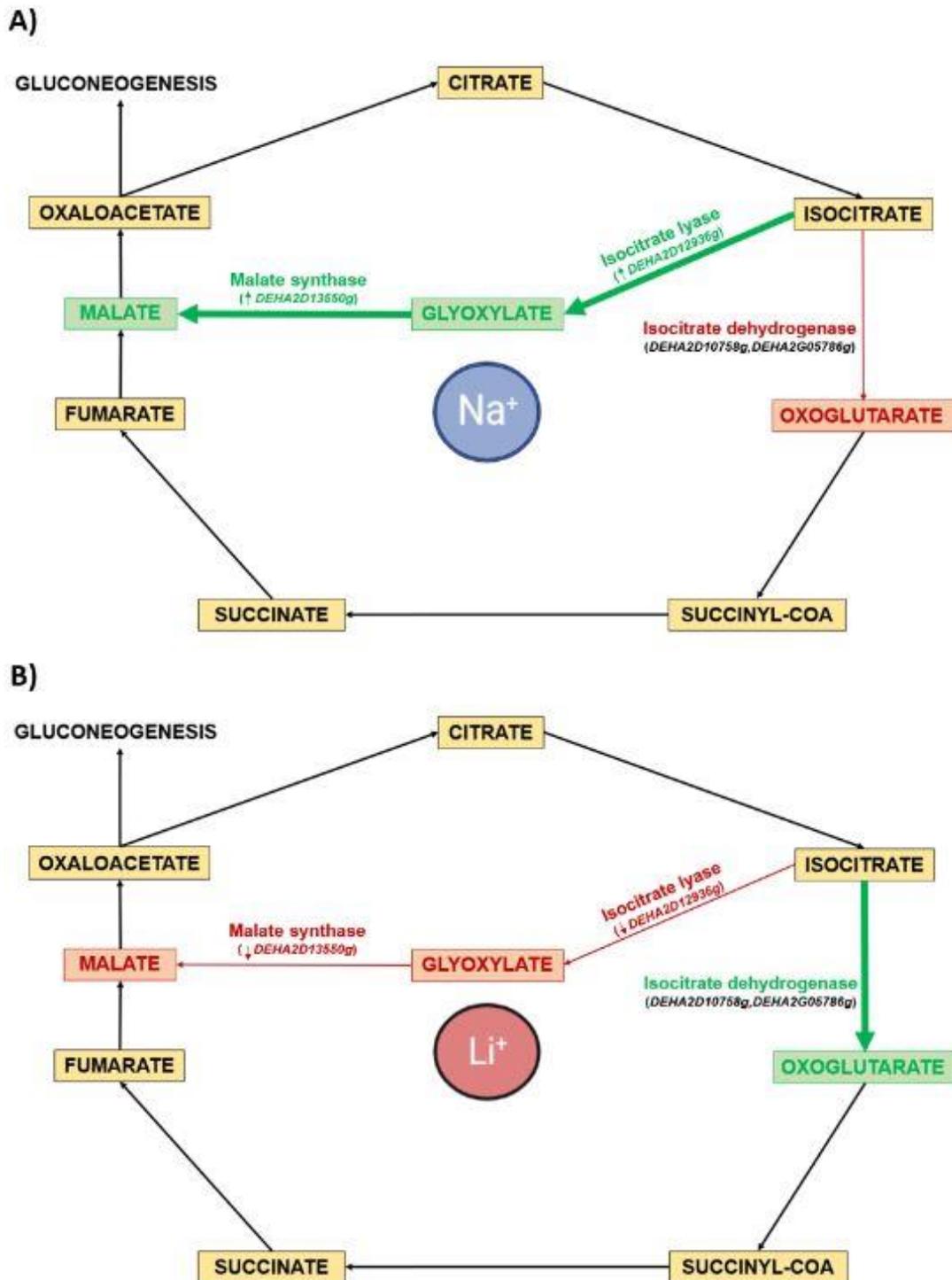


Figura 26. Esquema global del efecto del NaCl (A) y del LiCl (B) sobre el ciclo del ácido glioxílico y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Ruiz-Pérez F. et al., 2023). Mientras que, de forma global, el sodio produjo un aumento de los metabolitos relacionados con el ciclo del ácido glioxílico y un incremento tanto en la actividad enzimática relacionadas con este ciclo como en la transcripción de los genes que codifican dichas enzimas, el litio produjo un efecto contrario al sodio. Además, el litio indujo un aumento de la actividad de la Isocitrato deshidrogenasa (IDH) así como un incremento de los niveles de oxoglutarato.

Discusión

El ciclo del ácido glioxílico permite a los organismos adaptarse metabólicamente al medio en el que se encuentran, mediante la utilización de fuente de carbono más simples (C2 o C3). Aunque, no sabemos con certeza la razón exacta de la activación de este *bypass* en presencia de sodio, sería razonable pensar que la utilización de fuentes de carbono alternativas durante el estrés salino sea una estrategia para hacer frente a estas condiciones. Por ello, sería interesante realizar estudios con mutantes de *D. hansenii* que carecieran de las enzimas relacionadas con el ciclo del ácido glioxílico, aprovechando así los últimos avances realizados con esta levadura en los protocolos de edición génica (Spasskaya D.S. et al., 2021; Strucko T. et al., 2021), así como en las denominadas técnicas “-ómicas” (Navarrete C. et al., 2021b). Por otra parte, sería necesario realizar ensayos similares a los llevado a cabo a lo largo de esta tesis con otras levaduras o microorganismos halotolerantes/halófilos con el fin de poder realizar una comparación con *D. hansenii* y esclarecer su carácter con respecto a la tolerancia a la sal. También sería adecuado realizar estos experimentos con levadura no halotolerantes como el caso de *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe* para comparar el comportamiento de estas levaduras frente al de *D. hansenii*.

En resumen, en la presente tesis se ha podido observar que el sodio y el litio tienen efectos diferentes tanto a nivel fisiológico como metabólico en *D. hansenii*, alejándose de la idea de que ambos cationes actúan como elementos análogos. Por otra parte, hemos corroborado y ampliado la información sobre la toxicidad del litio, remarcando su alta toxicidad, incluso, en pequeñas concentraciones tanto extracelular como intracelularmente. Por último, hemos podido confirmar que, en nuestras condiciones, el ciclo del ácido glioxílico se activa en presencia de sodio, constituyendo una posible adaptación más de esta levadura a ambientes salinos.

Conclusiones

1. El litio, al contrario que el sodio y el potasio, es un elemento tóxico, incluso, en concentraciones muy bajas tanto extracelular como intracelularmente. Sin embargo, no parece producir un daño letal a las células, sino que inhibiría su capacidad de proliferación
2. La presencia de una concentración de 0,5 M de sodio en el medio favorece el crecimiento de la levadura. Sin embargo, concentraciones más altas de este catión son perjudiciales para la levadura.
3. El sodio, al igual que el potasio, ejerce un efecto protector frente a la toxicidad del litio.
4. El pH no afecta de forma importante al efecto beneficioso de sodio y la toxicidad del litio.
5. La capacidad fermentativa de la cepa CBS767 de *D. hansenii* es nula tanto en presencia como ausencia de sal en el medio.
6. El sodio influye negativamente a la actividad de enzimas relacionadas con las primeras etapas de la glucólisis, mientras que, una concentración relativamente baja de litio afecta de forma positiva a estas enzimas.
7. La presencia de sodio en el medio induce un cambio en el patrón metabólico a favor del ciclo del ácido glioxílico.
8. Al contrario que el sodio, el litio favorece el flujo metabólico hacía el ciclo de Krebs.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adler, L., Blomberg, A., & Nilsson, A. (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 162(1), 300-306. <https://doi.org/10.1128/jb.162.1.300-306.1985>
- Aggarwal, M., Bansal, P. K., & Mondal, A. K. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 22(6), 457-470. <https://doi.org/10.1002/yea.1223>
- Ahn, S., Jung, J., Jang, I.-A., Madsen, E. L., & Park, W. (2016). Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(22), 11928-11938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708149>
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (2001). Cloning and Expression of Two Genes Coding for Sodium Pumps in the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3251-3255. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3251-3255.2001>
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2), 191-197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00220-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00220-8)
- Andrade, M. A. J., Córdoba, J. J., Casado, E. M. A., Córdoba, M. G., & Rodríguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage «salchichón». *Meat Science*, 85(2), 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.009>
- André, L., Nilsson, A., & Adler, L. (1988). The Role of Glycerol in Osmotolerance of the Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 134(3), 669-677. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-3-669>
- Aslankoochi, E., Rezaei, M. N., Vervoort, Y., Courtin, C. M., & Verstrepen, K. J. (2015). Glycerol production by fermenting yeast cells is essential for optimal bread dough fermentation. *PloS One*, 10(3), e0119364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119364>
- Auesukaree, C. (2017). Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of*

- Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 133-142.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiosc.2017.03.009>
- Bergmeyer H.U., Grassl, M., & Walter, H. (1985). Hexokinase. En H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, & M. Grassl (Eds.), *Methods on Enzymatic Analysis* (Third, Vol. 2, pp. 222-223).
 - Bernt, E., & Bergmeyer, H. U. (1974). Malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. En H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (Second). Academic Press.
 - Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M.-C., & Toldrá, F. (2003). Purification and Characterization of a Prolyl Aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied and environmental microbiology*, 69, 227-232.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.227-232.2003>
 - Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*, 137, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
 - Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast (Chichester, England)*, 23(6), 415-437.
<https://doi.org/10.1002/yea.1374>
 - Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 229-234. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.043>
 - Butler, G., Rasmussen, M., Lin, M., Sakthikumar, S., Munro, C., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J., Agrafioti, I., Arnaud, M., Bates, S., Brown, A., Brunke, S., Costanzo, M., Fitzpatrick, D., Groot, P., Harris, D., & Cuomo, C. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459, 657-662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
 - Calahorra, M., Sánchez, N. S., & Peña, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1293-1301.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00556.x>
 - Cebrián, E., Núñez, F., Álvarez, M., Roncero, E., & Rodríguez, M. (2022). Biocontrol of ochratoxigenic *Penicillium nordicum* in dry-cured fermented sausages by *Debaryomyces hansenii* and *Staphylococcus xylosus*. *International*

Bibliografía

- Journal of Food Microbiology*, 375, 109744.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109744>
- Chell, R. M., Sundaram, T. K., & Wilkinson, A. E. (1978). Isolation and characterization of isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus sp.* *Biochemical Journal*, 173(1), 165-177.
 - Chen, Z., Cuin, T. A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B. P., & Shabala, S. (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4245-4255. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm284>
 - Chew, S. Y., Chee, W. J. Y., & Than, L. T. L. (2019). The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: Perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0546-5>
 - Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M., & Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526-545. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-4-526>
 - Csutora, P., Strasz, A., Boldizsár, F., Németh, P., Sipos, K., Aiello, D. P., Bedwell, D. M., & Miseta, A. (2005). Inhibition of phosphoglucomutase activity by lithium alters cellular calcium homeostasis and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 289(1), C58-67. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00464.2004>
 - Dichtl, B., Stevens, A., & Tollervey, D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *The EMBO Journal*, 16(23), 7184-7195. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.7184>
 - Dolan, S. K., & Welch, M. (2018). The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. *Annual Review of Microbiology*, 72(1), 309-330. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062257>
 - Fan, T., Wang, M., Li, J., Wang, F., Zhang, Z., & Zhao, X.-Q. (2021). [Exploration of yeast biodiversity and development of industrial applications]. *Sheng Wu Gong*

- Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 37(3), 806-815.
<https://doi.org/10.13345/j.cjb.200650>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375-400.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1)
 - Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *The Journal of Applied Bacteriology*, 68(3), 199-211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x>
 - Flores, C., Rodríguez, C., Petit, T., & Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 507-529. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x>
 - Gancedo, C., & Serrano, R. (1989). Energy-Yielding Metabolism. En A. H. Rose & J. S. Harrison (Eds.), *The yeast* (2nd ed., Vol. 3, pp. 205-259). Academic Press.
 - García-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A. J., & Alberto Luévano-Martínez, L. (2017). High Osmolarity Environments Activate the Mitochondrial Alternative Oxidase in *Debaryomyces Hansenii*. *PLoS ONE*, 12(1), e0169621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169621>
 - Gläser, H. U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin-Kerjan, Y., & Serrano, R. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *The EMBO Journal*, 12(8), 3105-3110.
 - González-Hernández, J. C., Jiménez-Estrada, M., & Peña, A. (2005). Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 9(1), 7-16. <https://doi.org/10.1007/s00792-004-0415-2>
 - González-Hernández, J., & Peña, A. (2002). Adaptation strategies of halophilic microorganisms and *Debaryomyces hansenii* halophilic yeast. *Revista latinoamericana de microbiología*, 44, 137-156.
 - Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 264-278.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12488>

Bibliografía

- Gori, K., Hébraud, M., Chambon, C., Mortensen, H. D., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2007). Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 293-303. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00155.x>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231-1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Herrera, R., Salazar, A., Ramos-Moreno, L., Ruiz-Roldan, C., & Ramos, J. (2017). Vacuolar control of subcellular cation distribution is a key parameter in the adaptation of *Debaryomyces hansenii* to high salt concentrations. *Fungal Genetics and Biology*, 100, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.002>
- Hohmann, S., & Mager, W. H. (Eds.). (2003). *Yeast Stress Responses* (Vol. 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2>
- Isayenkov, S. V. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics*, 46(5), 302-318. <https://doi.org/10.3103/S0095452712050040>
- Kamlesh, K. Y., Singh, N., & Rajasekharan, R. (2016). Responses to phosphate deprivation in yeast cells. *Current Genetics*, 62(2), 301-307. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0544-4>
- Kodedová, M., & Sychrová, H. (2015). Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE*, 10(9), e0139306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139306>
- Koedooder, C., Guéneuguès, A., Van Geersdaële, R., Vergé, V., Bouget, F.-Y., Labreuche, Y., Obernosterer, I., & Blain, S. (2018). The Role of the Glyoxylate Shunt in the Acclimation to Iron Limitation in Marine Heterotrophic Bacteria. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00435>
- Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., & Ju, L.-K. (2011). Production of arabitol from glycerol: Strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 257-267. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3015-3>

- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2009). Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.09.008>
- Kondrashov, F. A., Koonin, E. V., Morgunov, I. G., Finogenova, T. V., & Kondrashova, M. N. (2006). Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: Evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biology Direct*, 1(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-31>
- Kornberg, H. L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 99(1), 1-11.
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 9-15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>
- Locascio, A., Andrés-Colás, N., Mulet, J. M., & Yenush, L. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* as a Tool to Investigate Plant Potassium and Sodium Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), E2133. <https://doi.org/10.3390/ijms20092133>
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412(6842), 83-86. <https://doi.org/10.1038/35083594>
- Ma, D., & Li, R. (2013). Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia*, 175(1-2), 13-23. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9600-5>
- Ma, N., Li, C., Dong, X., Wang, D., & Xu, Y. (2015). Different effects of sodium chloride preincubation on cadmium tolerance of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(8), 1002-1012. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400847>
- Martínez, J. L., Luna, C., & Ramos, J. (2012). Proteomic changes in response to potassium starvation in the extremophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 12(6), 651-661. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00815.x>

Bibliografía

- Martínez, J., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal genetics and biology: FG & B*, 48, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.013>
- Michán, C., Martínez, J. L., Alvarez, M. C., Turk, M., Sychrova, H., & Ramos, J. (2013). Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Research*, 13(2), 180-188. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12020>
- Minhas, A., Sharma, A., Kaur, H., Rawal, Y., Ganesan, K., & Mondal, A. K. (2012). Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7301-7312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299438>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Murguía, J. R., Bellés Albert, J.-M., & Serrano, R. (1996). *The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity*. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29029>
- Navarrete, C., Estrada, M., & Martínez, J. L. (2022). *Debaryomyces hansenii*: An old acquaintance for a fresh start in the era of the green biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03280-x>
- Navarrete, C., Frost, A. T., Ramos-Moreno, L., Krum, M. R., & Martínez, J. L. (2021a). A physiological characterization in controlled bioreactors reveals a novel survival strategy for *Debaryomyces hansenii* at high salinity. *Yeast*, 38(5), 302-315. <https://doi.org/10.1002/yea.3544>
- Navarrete, C., Petrežsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J., Ariño, J., Sychrová, H., & Ramos, J. (2010). Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Research*, 10(5), 508-517. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00630.x>

- Navarrete, C., Sánchez, B. J., Savickas, S., & Martínez, J. L. (2021b). DebaryOmics: An integrative –omics study to understand the halophilic behaviour of *Debaryomyces hansenii*. *Microbial Biotechnology*, 15(4), 1133-1151. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13954>
- Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J. L., Calero, F., & Ramos, J. (2009). Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 582-590. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00500.x>
- Nevoigt, E., & Stahl, U. (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 231-241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, 14(9), e1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv Für Mikrobiologie*, 62(4), 358-372. <https://doi.org/10.1007/BF00425641>
- Norkrans, B., & Kylin, A. (1969). Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 836-845. <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.836-845.1969>
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 63(2), 334-348. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.334-348.1999>
- Papouskova, K., & Sychrova, H. (2007). The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.005>
- Patra, P., Das, M., Kundu, P., & Ghosh, A. (2021). Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances*, 47, 107695. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>
- Peromingo, B., Andrade, M. J., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., & Núñez, F. (2019). Biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* by native

Bibliografía

- Debaryomyces hansenii* in dry-cured meat products. *Food Microbiology*, 82, 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.024>
- Pisa, D., Ramos, M., Molina, S., García, P., & Carrasco, L. (2007). Evolution of antibody response and fungal antigens in the serum of a patient infected with *Candida famata*. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 5), 571-578. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47042-0>
 - Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4005-4009. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.4005-4009.1997>
 - Prista, C., González-Hernández, J. C., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2007). Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 153(9), 3034-3043. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006080-0>
 - Prista, C., Loureiro-Dias, M. C., Montiel, V., García, R., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 5(8), 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
 - Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, 33(10), 523-533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
 - Prista, C., Soeiro, A., Vesely, P., Almagro, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2002). Genes from *Debaryomyces hansenii* increase salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* W303. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 151-157. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00079.x>
 - Ramos, J., Haro, R., & Rodríguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1029(2), 211-217. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90156-i](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90156-i)
 - Ramos, J., Melero, Y., Ramos-Moreno, L., Michán, C., & Cabezas, L. (2017). *Debaryomyces hansenii* Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 1576-1585. <https://doi.org/10.4014/jmb.1704.04045>

- Ramos-Moreno, L., Ramos, J., & Michán, C. (2019a). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2753-3>
- Ramos-Moreno, L., Ruiz-Castilla, F. J., Bravo, C., Martínez, E., Menéndez, M., Dios-Palomares, R., & Ramos, J. (2019b). Inoculation with a terroir selected *Debaryomyces hansenii* strain changes physico-chemical characteristics of Iberian cured pork loin. *Meat Science*, 157, 107875. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107875>
- Ramos-Moreno, L., Ruiz-Pérez, F., Rodríguez-Castro, E., & Ramos, J. (2021). *Debaryomyces hansenii* Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*, 9(7), 1512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071512>
- Rebello, S., Abraham, A., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Karthika Bahuleyan, A., Aneesh, E. M., & Pandey, A. (2018). Non-conventional yeast cell factories for sustainable bioprocesses. *FEMS Microbiology Letters*, 365(21). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny222>
- Rivas, B., Torre, P., Domínguez, J. M., Perego, P., Converti, A., & Parajó, J. C. (2003). Carbon material and bioenergetic balances of xylitol production from corncobs by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology Progress*, 19(3), 706-713. <https://doi.org/10.1021/bp025794v>
- Ruiz-Castilla, F. J., Rodríguez-Castro, E., Michán, C., & Ramos, J. (2021). The Potassium Transporter Hak1 in *Candida Albicans*, Regulation and Physiological Effects at Limiting Potassium and under Acidic Conditions. *Journal of Fungi*, 7(5), 362. <https://doi.org/10.3390/jof7050362>
- Ruiz-Pérez, F. S., Ruiz-Castilla, F. J., Leal, C., Martínez, J. L., & Ramos, J. (2023). Sodium and lithium exert differential effects on the central carbon metabolism of *Debaryomyces hansenii* through the glyoxylate shunt regulation. *Yeast (Chichester, England)*, 40(7), 265-275. <https://doi.org/10.1002/yea.3856>
- Samokhvalov, V., Ignatov, V., & Kondrashova, M. (2004). Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of

Bibliografía

- Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. *Biochimie*, 86(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.10.019>
- Sánchez, N. S., Arreguán, R., Calahorra, M., & Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1303-1312. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00426.x>
 - Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2006). Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 23(5), 361-374. <https://doi.org/10.1002/yea.1360>
 - Sánchez, N. S., Calahorra, M., Ramírez, J., & Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122(10), 977-990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.002>
 - Santos, M. A. S., Gomes, A. C., Santos, M. C., Carreto, L. C., & Moura, G. R. (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8), 607-611. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2011.05.008>
 - Sanui, H. (1974). Measurement of inorganic orthophosphate in biological materials: Extraction properties of butyl acetate. *Analytical Biochemistry*, 60(2), 489-504. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90259-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90259-0)
 - Secco, D., Wang, C., Shou, H., & Whelan, J. (2012). Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Letters*, 586(4), 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.036>
 - Segal-Kischinevzky, C., Rodarte-Murguía, B., Valdés-López, V., Mendoza-Hernández, G., González, A., & Alba-Lois, L. (2011). The Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii* has Two Catalase Genes Encoding Enzymes with Differential Activity Profile. *Current Microbiology*, 62(3), 933-943. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9806-z>
 - Sherman, D., Durrens, P., Beyne, E., Nikolski, M., Souciet, J.-L., & Génolevures Consortium. (2004). Génolevures: Comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D315-318. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh091>

- Sherman, F. (1991). [1] Getting started with yeast. En *Methods in Enzymology* (Vol. 194, pp. 3-21). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-V)
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. En C. Guthrie & G. R. Fink (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)
- Silverstein, R. M. (1975). The determination of the molar extinction coefficient of reduced DTNB. *Analytical Biochemistry*, 63(1), 281-282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90219-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90219-5)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Spasskaya, D. S., Kotlov, M. I., Lekanov, D. S., Tutyaeva, V. V., Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Karpov, V. L., & Karpov, D. S. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Engineering Reveals the Contribution of the 26S Proteasome to the Extremophilic Nature of the Yeast *Debaryomyces hansenii*. *ACS Synthetic Biology*, 10(2), 297-308. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00426>
- Steels, E. L., Learmonth, R. P., & Watson, K. Y. 1994. (s. f.). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, 140(3), 569-576. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-3-569>
- Strucko, T., Andersen, N. L., Mahler, M. R., Martínez, J. L., & Mortensen, U. H. (2021). A CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in *Debaryomyces hansenii*. *Synthetic Biology (Oxford, England)*, 6(1), ysab031. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysab031>
- Takaç, S., & Sengel, B. (2010). Extracellular lipolytic enzyme activity of a newly isolated *Debaryomyces hansenii*. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 40, 28-37. <https://doi.org/10.1080/10826060903388820>
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>

Bibliografía

- Thomé, P. E. (2004). Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast (Chichester, England)*, 21(2), 119-126. <https://doi.org/10.1002/yea.1070>
- Thomé-Ortiz, P. E., Peña, A., & Ramírez, J. (1998). Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast (Chichester, England)*, 14(15), 1355-1371.
- Thorwall, S., Schwartz, C., Chartron, J. W., & Wheeldon, I. (2020). Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 16(2), 113-121. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0452-x>
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A., & Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 10), 3586-3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 403-433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>
- Ventosa, A., Márquez, M. C., Garabito, M. J., & Arahal, D. R. (1998). Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2(3), 297-304. <https://doi.org/10.1007/s007920050072>
- Wagner, D., Sander, A., Bertz, H., Finke, J., & Kern, W. V. (2005). Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection*, 33(5-6), 397-400. <https://doi.org/10.1007/s15010-005-5082-4>
- Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Guddimalli, R., Parveda, M., Solymosi, K., Suprasanna, P., & Kavi Kishor, P. B. (2020). Engineering salinity tolerance in plants: Progress and prospects. *Planta*, 251(4), 76. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03366-6>

- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), 263-290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
- Yuenyong, W., Sirikantaramas, S., Qu, L.-J., & Buaboocha, T. (2019). Isocitrate lyase plays important roles in plant salt tolerance. *BMC Plant Biology*, 19(1), 472. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2086-2>

Anexos

Sodium and lithium exert differential effects on the central carbon metabolism of *Debaryomyces hansenii* through the glyoxylate shunt regulation

Francisco S. Ruiz-Pérez¹  | Francisco J. Ruiz-Castilla¹ | Carlos Leal¹  | José L. Martínez²  | José Ramos¹

¹Department of Agricultural Chemistry, Edaphology and Microbiology, University of Córdoba, Córdoba, Spain

²Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark (DTU), Lyngby, Denmark

Correspondence

José Ramos, Department of Agricultural Chemistry, Edaphology and Microbiology, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain.

Email: mi1raruj@uco.es

Funding information

COST Action CA-18229 (Yeast4Bio); FEDER 1380653-R and AT21_00157 (Junta de Andalucía, Spain) (JR); Novo Nordisk Foundation within the framework of the AIM-Bio grant (Grant number NNF19SA0057794) (JLM); Plan Propio University of Córdoba 21-22 (JR)

Abstract

Debaryomyces hansenii is a halotolerant/halophilic yeast usually found in salty environments. The yeast accumulated sodium at high concentrations, which improved growth in salty media. In contrast, lithium was toxic even at low concentrations and its presence prevented cell proliferation. To analyse the responses to both cations, metabolite levels, enzymatic activities and gene expression were determined, showing that NaCl and LiCl trigger different cellular responses. At high concentrations of NaCl (0.5 or 1.5 M) cells accumulated higher amounts of the intermediate metabolites glyoxylate and malate and, at the same time, the levels of intracellular oxoglutarate decreased. Additionally, 0.5 M NaCl increased the activity of the enzymes isocitrate lyase and malate synthase involved in the synthesis of glyoxylate and malate respectively and decreased the activity of isocitrate dehydrogenase. Moreover, transcription of the genes coding for isocitrate lyase and malate synthase was activated by NaCl. Also, cells accumulated phosphate upon NaCl exposure. None of these effects was provoked when LiCl (0.1 or 0.3 M) was used instead of NaCl. Lithium induced accumulation of higher amounts of oxoglutarate and decreased the concentrations of glyoxylate and malate to non-detectable levels. Cells incubated with lithium also showed higher activity of the isocitrate dehydrogenase and neither increased isocitrate lyase and malate synthase activities nor the transcription of the corresponding genes. In summary, we show that sodium, but not lithium, up regulates the shunt of the glyoxylic acid in *D. hansenii* and we propose that this is an important metabolic adaptation to thrive in salty environments.

KEYWORDS

glyoxylate shunt, lithium, salt tolerance, sodium, stress, yeast

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Yeast* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

The excess of salt in the environment is one of the main abiotic stresses for most of living organisms. For example, the importance of soil salinity for agricultural yields is enormous and it has been well defined that all salts affect the behaviour of the plant although not all inhibit growth (Tester, 2003). Sodium is the most abundant cation in living environments and sodium salts impose both a sodium-specific and an osmotic stress on living cells (Munns, 2002). Yeast is used as model organisms when studying eukaryotic physiological processes and, in the case of salt-induced stress, the growth of many species, including the well-studied *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited at relatively low amounts of sodium (Calero et al., 2000; Yenush, 2016). However, one of the most fascinating properties of the nonconventional *Debaryomyces hansenii* is its 'salt-loving' character which we are far to fully understand. *D. hansenii* is an ascomycetous yeast that was first defined as a marine occurring yeast (Norkrans, 1966, 1968; Norkrans & Kylin, 1969). It is abundant in salty food, sausages, and dry meat products where it plays an important role during the ripening process (Ramos-Moreno et al., 2019a, 2021).

Research in *D. hansenii* has traditionally been limited by some physiological and molecular characteristics. It is a very heterogeneous species, and it belongs to the CTG-clade yeasts in which the CUG codon can be ambiguously translated to serine or to the standard leucine (Santos et al., 2011). In addition, the lack of robust molecular tools to engineer this yeast has hampered the process until very recently, when two studies reporting the successful adaptation of the CRISPR/Cas9 methodology for *D. hansenii* (Spasskaya et al., 2021; Strucko et al., 2021) have been published.

As aforementioned, the specific mechanisms responsible for the halotolerant/halophilic character of *D. hansenii* remain uncertain. However, some hints of this behaviour that may help to solve this puzzle seem to be related to the existence/activity of ion transporters (González-Hernández et al., 2004; Martínez et al., 2011; Prista et al., 1997, 2005), the structural changes and composition of the plasma membrane in response to salt (Turk et al., 2007) and/or in the activity of some specific enzymes (Aggarwal et al., 2005; Chawla et al., 2017; Garcia-Neto et al., 2017). Additionally, a differential effect triggered by the exposure to either KCl or NaCl salts has been reported in batch cultivations using controlled lab-scale bioreactors (Navarrete et al., 2021a), as well as a positive effect in the cell performance when low environmental pH is combined with a high sodium concentration in the media (Almagro et al., 2000; Navarrete et al., 2021a).

Nevertheless, information about the effects on cell performance and metabolism exerted by the presence of lithium salts is extremely scarce. Lithium is usually considered a toxic sodium analogue and there is only one report describing an inhibitory effect of LiCl on *D. hansenii* (Prista et al., 1997). Concerning the targets of sodium and lithium toxic effects, it has been reported that *HAL2*, which encodes a nucleotidase that dephosphorylates 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate (PAP) and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, is inhibited by Na⁺ and Li⁺ (Albert et al., 2000; Murguía et al., 1996).

Take-away

- Sodium is a beneficial element for *D. hansenii*. By contrast, lithium is toxic.
- Sodium, but not lithium, up regulates the glyoxylic acid shunt in *D. hansenii*.
- Activation of glyoxylic acid cycle may be an important adaptation to salt stress.

In addition, phosphoglucosyltransferase activity is inhibited by lithium in both yeast and humans, making it an important in vivo lithium target (Csutora et al., 2005).

In relation to the effects of high salt concentrations on the metabolism, the group of Prof Peña published a series of works hypothesizing that high salinity affects energy pathways and growth in *D. hansenii*. A first study concluded that in the presence of 1 M NaCl, *D. hansenii* increases its fermentative capacity (Sánchez et al., 2008), while on a follow up study the conclusion was that the presence of salt increased its respiratory metabolism instead (Calahorra et al., 2009). Finally, a third study indicated an activation of the glyoxylate shunt as a consequence of the salt stress. In addition, a microarray-based gene expression analysis of cells incubated under saline conditions and high pH revealed a down-regulation in the expression of genes related to energy-producing pathways and in some genes involved in the cell cycle and DNA transcription (Sánchez et al., 2018).

Very recently, a multiomics study performed in chemostat cultivations, has highlighted the complexity of the subject. Sodium and potassium triggered different responses at both expression and regulation of key enzyme activity, showing that the metabolic response to sodium is highly coordinated and even more regulated than the response to high potassium in the medium. The same work also revealed cellular events never linked to halotolerance before such as protein trafficking, endocytosis, or the stimulation of the biosynthetic pathways of long fatty acids (Navarrete et al., 2021b).

To get further details on the effect of salt on the performance and the energy metabolism of *D. hansenii*, we have accomplished a series of experiments in which growth, intracellular ion content, key metabolic precursors in the TCA cycle, enzymatic activities, and gene expression were determined in cells exposed to different NaCl or LiCl concentrations. Our results confirm a difference among the physiological and metabolic effects of both salts, which can be related to their beneficial or toxic effect in *D. hansenii*'s performance and fitness.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Yeast strain, media, and culture conditions

The wild-type strain *Debaryomyces hansenii* CBS767 (PYCC2968) (Prista et al., 1997) was used in this study. Yeasts were maintained in

solid YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 2% agar) and for selective purposes synthetic complete YNB medium (0.17% YNB, 2% glucose) adjusted at pH 5.8 with NH_4OH was used. Cells were routinely cultured at 26°C, in liquid media, 180 rpm, for 20–48 h.

2.2 | Growth and viability assays

The effect of salts on growth was determined in solid and liquid media. Drop tests were performed with cells resuspended in sterile water and adjusted to the same 1.0 initial A_{600} . Ten-fold serial dilutions were prepared, and 5 μL aliquots of each dilution were spotted on the appropriate plates supplemented with a variety of KCl, NaCl or LiCl amounts. Plates were then incubated during 48 h at 26°C.

Growth curves were performed in flasks with 50 mL of YNB medium supplemented with the indicated concentrations of NaCl or LiCl. Cultures were inoculated at A_{600} 0.06, and growth was followed for 48 h using a Spectronic 20 (Bausch and Lomb) (Ruiz-Castilla et al., 2021).

Cell viability in the presence of salt was determined in liquid YNB supplemented with the indicated NaCl or LiCl amounts. Cultures were inoculated at A_{600} 0.06, and cells were grown overnight. When A_{600} reached values of 0.2 the required concentration of salt was added. At time zero and after 24 h, samples were taken, inoculated on the surface of YNB plates and the number of colony-forming units (cfu) was quantified after 48 h incubation at 26°C.

2.3 | Intracellular cation content

To estimate intracellular sodium or lithium content, cells were inoculated (A_{600} 0.06) in YNB liquid media supplemented with several concentrations of NaCl or LiCl. When the cultures reached early exponential phase (A_{600} 0.2–0.3), samples of cells were withdrawn from growth media, cells were collected on Millipore filters (0.8 μm pore size), then they were rapidly washed with a 20 mM MgCl_2 solution and acid extracted (0.2 M HCl, 10 mM MgCl_2) for 3 h. Finally, they were analysed by atomic emission spectrophotometry as described previously (Ramos et al., 1990). All intracellular cation values are expressed in nmols of cation per mg dry weight of cells (Navarrete et al., 2010).

2.4 | Cell-free extracts preparation

Extracts used for determination of metabolites were obtained from YNB cells grown in the presence of different salt concentrations up to A_{600} 0.5–0.7. On the other hand, extracts used for the study of enzymatic activities and transcriptional regulation were obtained from YNB-grown cells (A_{600} 0.5–0.7) then exposed (0, 2, and 6 h) to salt.

In all cases, cells were harvested by centrifugation (5000g, 4°C, 10 min), and washed once with sterile water. Extracts were then prepared resuspending yeasts in 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and disrupted by vigorous shaking for 1 min with sea sand. The process was repeated with at least a 1-min interval on ice until breakage, which was checked microscopically. Cell extracts were separated from cell debris and glass beads by centrifugation (20,000g, 4°C, 15 min).

2.5 | Determination of metabolites

The concentration of ethanol was measured in cell-free supernatant, while the concentration of metabolites relative to tricarboxylic and glyoxylic acid cycle was measured in cell extracts. As mentioned above, cells were grown at different concentrations of NaCl and LiCl.

The concentration of metabolites was determined by HPLC (model 1100–1200 Series HPLC System, Agilent Technologies). The injection volume was 20 μL , the eluent 5 mM H_2SO_4 and the flow rate was set at 0.6 mL/h. The temperature of a Bio-Rad Aminex HPX-87H column was kept at 60°C (Navarrete et al., 2021a).

To measure phosphate levels, cells were grown in YNB supplemented with the corresponding salt concentration (A_{600} 0.5–0.7). Phosphate was extracted with 10% trichloroacetic acid in cold. After centrifugation, phosphate levels were determined by the method of Fiske and Subbarow (1925) modified by Sanui (1974). This is a colorimetric method consisting in the quantification of phosphomolybdic acid formed by the reaction of phosphate extracted with molybdic acid (A_{310}). Results were expressed in $\mu\text{mol Pi/mg}$ cell protein.

2.6 | Enzymatic activities

These determinations were assayed spectrophotometrically using a DU®650 Spectrophotometer (Beckman Coulter).

Isocitrate dehydrogenase (IDH) activity was measured by the appearance of NADH formed by the reaction of D,L-isocitrate and NAD^+ carried out by IDH. The process was monitored spectrophotometrically at 324 nm. The reaction mixture contained 40 mM MOPS-HCl pH 7.0 buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.7 mM NAD^+ and 10 mM D,L-isocitrate (Bernt & Bergmeyer, 1974).

Isocitrate lyase (IL) activity was followed by the appearance of a glyoxylate-phenylhydrazine coloured compound that can be measured at 324 nm. The reaction mixture contained 30 mM imidazole pH 8.0, 5 mM MgCl_2 , 4 mM phenylhydrazine, 1 mM D,L-isocitrate and 4 mM EDTA (Chell et al., 1978).

Malate synthase (MS) activity was determined by the appearance of a CoA-DTNB coloured compound measured at 412 nm. The reaction mixture contained 30 mM imidazole pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 0.25 mM acetyl-CoA, 1 mM glyoxylate and 0.2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Chell et al., 1978; Silverstein, 1975).

Protein content of the extracts was determined by using Bradford quantification kit reagent (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions and using bovine serum albumin as a standard (Kruger, 1994).

2.7 | RNA isolation and reverse transcription

D. hansenii cells were incubated in liquid YNB plus NaCl or LiCl. At different times (0, 2 and 6 h after addition of salt), cells were collected, washed with sterile cold water and resuspended in 1 mL of TRI-REAGENT (Sigma-Aldrich) plus approximately 200 μ L of sea sand (Washed, thin grain QP, Panreac). For disruption, yeasts were vortexed 10 times for 1 min with intervals of at least 1 min on ice, incubated 5 min at 70°C, and followed by other 10 times 1 min vortexing with cooling intervals. Afterwards, the standard TRI-REAGENT protocol for RNA isolation was followed. Isolated RNA samples were treated using DNase I (New England Biolabs) to remove contaminating DNA until no polymerase chain reaction (PCR) amplification was observed without prior complementary DNA (cDNA) synthesis. RNA sample quality and quantification were performed spectrophotometrically (NanoDrop 2000). At least two RNA preparations were isolated for each experimental condition. One microgram from each RNA sample was retrotranscribed with Kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) on three separate reactions that were pooled together before PCR amplification.

2.8 | Real-time PCR

D. hansenii gene sequences for primer design were obtained from the National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Primers were designed with OLIGO 7.60 (Molecular Biology Insights) (Supporting Information: Table S1). All primer pairs specifically amplified the desired target sequence, no primer dimers were detected. All amplification efficiencies were close to 100%.

The PCR amplification was carried out in a mixture (20 μ L final volume) with IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1 μ L of cDNA, plus 0.1 μ M of the specific primers. PCR reactions were performed at least in triplicate (three biological replicates and three technical replicates each). Real-time PCR conditions were an initial denaturation step, 95°C 3 min, followed by 40 PCR cycles consisting of 15 s of denaturation at 95°C, and 30 s of annealing plus elongation at 70°C. Finally, melting curves were determined.

2.9 | Statistics

At least, three biological replicates for each experiment were performed. Data were analysed in Microsoft Excel software 2019. Statistical significance was evaluated using analysis of variance, followed by post hoc multiple comparison according to Dunnett for parametric analysis

using GraphPad Prism 9 (Dotmatics). Significant differences are indicated with asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3 | RESULTS

3.1 | LiCl has a toxic effect for *D. hansenii*

While yeast cells require potassium for growth, sodium and lithium usually behave as toxic elements when accumulated at certain amounts (Gómez, 1996; Marquina et al., 2012). However, it has been reported that, in *D. hansenii*, the presence of relatively high concentrations of sodium improves the performance of the cells not only under control conditions but also in the presence of some additional stress factors such as extreme pH or temperatures (Almagro et al., 2000; Navarrete et al., 2021a). We first wondered whether lithium may have a similar effect in this yeast. Figure 1a shows the proliferation of cells spotted on YNB plates supplemented with either KCl, NaCl or LiCl. While potassium or sodium at medium-high concentrations had a beneficial effect, LiCl hampered cell proliferation at very low concentrations and after 48 h cultivation. To get further insights we used liquid media supplemented with the same concentrations of NaCl or LiCl and followed growth (Figure 1b). In the case of sodium, the presence of 0.5 M increased the growth rate compared to the control, and only 1.5 M importantly affected growth by increasing the lag phase. However, the addition of lithium, even at much lower concentrations than those used in the case of sodium, had a detrimental effect in the growth rate and even at relatively low LiCl (0.1 M) growth was already significantly slowed in comparison. On the other hand, the results on cell viability showed that the number of cfu was, after 24 h, much higher in cells growing in 0.5 M NaCl than in the control and that the toxic cation lithium did not immediately kill the cells. For example, even after 24 h in the presence of 0.5 M LiCl, although cells did not proliferate, a number of cfu similar to the one obtained immediately after inoculation (time 0) was observed (Figure 2). The noxious effect of internal lithium was also evident when intracellular amounts of lithium and sodium were determined since the cell population was already intoxicated when lithium reached values around 30 nmol/mg cell (Table 1). Altogether, results in Figure 1 and Table 1 show that intracellular lithium was at least one order of magnitude lower than sodium under any condition studied and that these low intracellular amounts were already producing a detrimental effect on cell growth. In summary, these results show that, on contrary to the situation with sodium, lithium triggers a toxic effect in *D. hansenii* significantly affecting its cell performance.

3.2 | Effect of NaCl and LiCl on ethanol production and phosphate accumulation

We also measured the presence of two important compounds previously reported to increase in the presence of salt: ethanol extrusion and phosphate accumulation (Calahorra et al., 2009; Sánchez et al., 2008). It has been demonstrated that *D. hansenii* has a high respiratory activity at

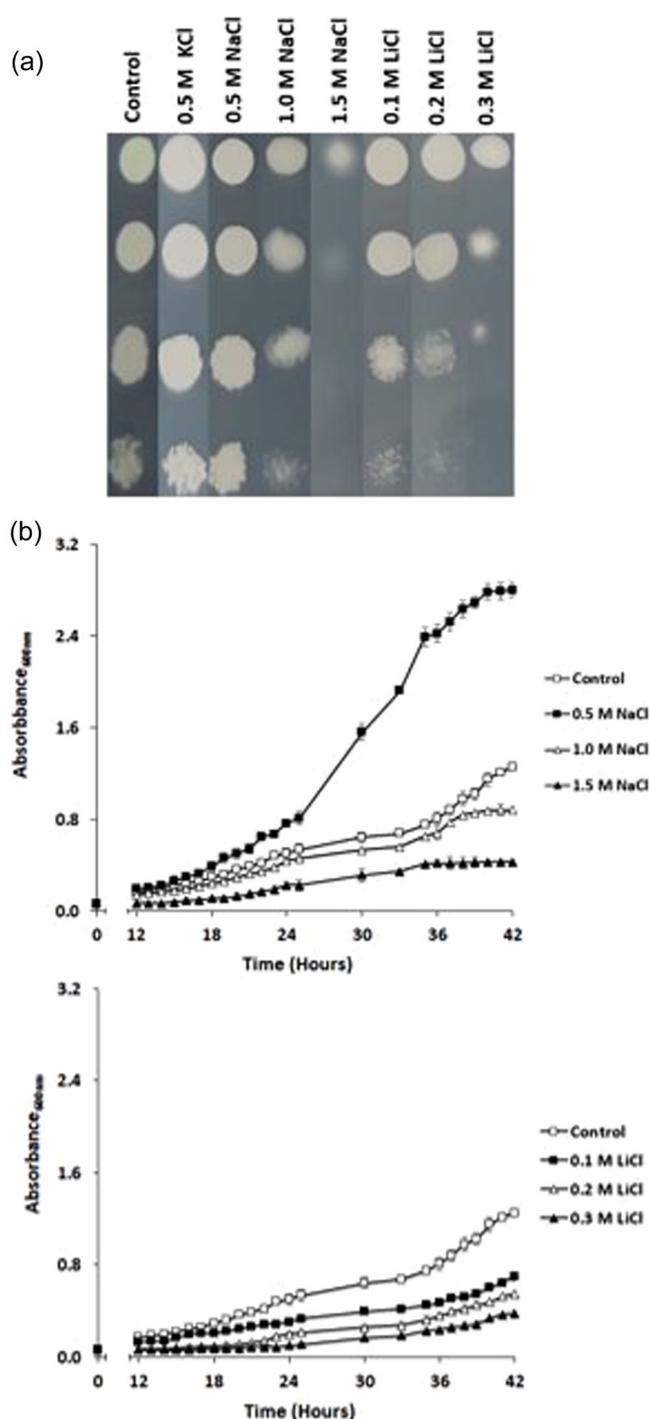


FIGURE 1 Effect of different salts on growth of *D. Hansenii*. (a) Tenfold serial dilutions of cells were spotted on YNB plates supplemented with KCl, NaCl or LiCl. Plates were incubated at 26°C, and images were taken after 48 h. (b) Growth at several concentrations of NaCl or LiCl in liquid media. Cultures were inoculated at A_{600} 0.06, and growth was monitored for 42 h. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments are plotted.

moderate to high concentration of sodium, however, the fermentative capacity of this yeast has been controversial, and it may depend on strains or conditions. On the one hand, it has been reported that cells grown with salt increased fermentation capacity and ethanol production

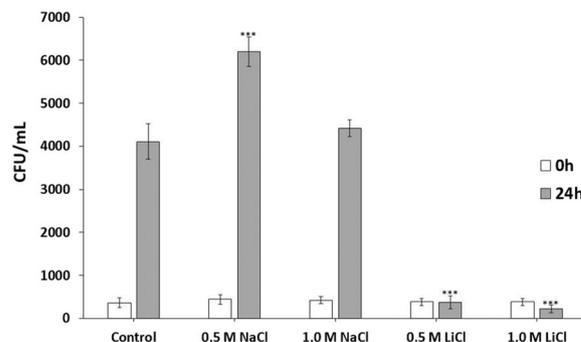


FIGURE 2 Effect of NaCl and LiCl on the viability of *D. Hansenii*. Cells were incubated up to 24 h in liquid media supplemented with the required salt. Samples were taken and colony-forming-units were counted and compared with the control in the absence of added salt. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data respect to control were expressed: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

TABLE 1 Intracellular sodium and lithium content.

	External cation			
	NaCl 0.5 M	1.5 M	LiCl 0.1 M	0.3 M
Internal cation (nmol/mg cell)	400 \pm 12**	413 \pm 32*	27 \pm 1***	30 \pm 3***

Note: Cells were grown in YNB supplemented with NaCl or LiCl. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data were expressed: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

using glucose as single carbon source (Calahorra et al., 2009), however, several other authors did not observe any ethanol production even in the presence of high salt and the amounts of this compound were negligible under all conditions reported (García-Neto et al., 2017; Navarrete et al., 2021a). These results prompted us to measure the possible effect of LiCl or NaCl on ethanol production. In our experimental conditions, *D. Hansenii* cells did not produce ethanol (neither in control nor in treated cells), therefore confirming a fully respiratory metabolism on glucose in the presence of either salt.

Another reported effect on the presence of high salt in the medium is the increase in phosphate levels of *D. Hansenii* (Sánchez et al., 2008). Results in Figure 3 show that cells grown in 0.5 M NaCl increased intracellular phosphate but that neither supraoptimal concentrations of sodium (1.5 M) nor lithium produced that effect. In fact, accumulated phosphate levels were lower under exposure to either 1.5 M NaCl or LiCl (0.1 or 0.3 M) than those measured under control conditions.

3.3 | Changes in TCA intermediate's levels and enzymatic activities

It has been proposed that *D. Hansenii* cells grown in either 1 M NaCl or KCl activate the glyoxylate shunt (Sánchez et al., 2008). To get

further insight about that hypothesis and extend the study to the case of lithium salts, we grew yeast in liquid cultures with several concentrations of either NaCl (0.5 or 1.5 M) or LiCl (0.1 or 0.3 M) and measured the concentration of several key TCA intermediates against control conditions (no salt added). We observed important differences in response to the presence of lithium or sodium. Table 2 shows the levels of the intermediates measured in cells grown in NaCl (0.5 or 1.5 M) or in LiCl (0.1 or 0.3 M). The first important finding was that the oxoglutarate levels strongly decrease in sodium-grown cells while significantly increased in lithium. Moreover, the levels of glyoxylate and malate followed a similar pattern, increasing when cells were cultured in sodium (especially in the case of 0.5 M NaCl) and decreasing in lithium-grown cells until nondetectable levels. The presence of other intermediaries such as succinate or fumarate was never detected in our conditions.

Due to the important quantitative differences in the level of these intermediates of the TCA cycle induced by sodium or lithium, we decided to measure the activity of three key enzymes that would confirm the hypothesis that sodium but not lithium activates the glyoxylate shunt in *D. hansenii*. Cells were grown in the absence of salt and then resuspended in NaCl (0.5 and 1.5 M) or LiCl (0.1 and

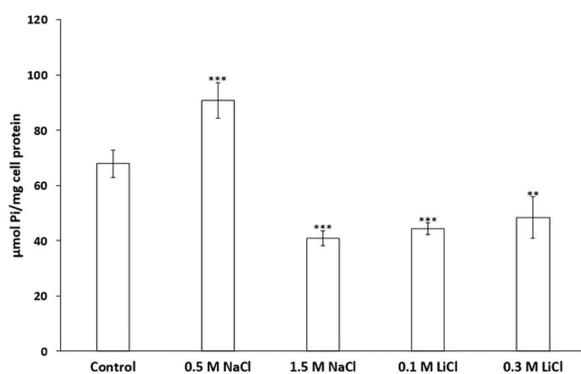


FIGURE 3 Levels of phosphate in cells grown in YNB supplemented with NaCl or LiCl. Values are expressed in $\mu\text{mol Pi/mg}$ of cell protein. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data respect to control were expressed: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

TABLE 2 The concentration of different metabolites relative to tricarboxylic and glyoxylic acid cycles.

Metabolites	External cation				
	Control	NaCl 0.5 M	1.5 M	LiCl 0.1 M	0.3 M
Oxoglutarate	190.62 \pm 5.75	90.00 \pm 7.12**	78.00 \pm 5.23**	369.09 \pm 10.03**	277.65 \pm 16.52**
Glyoxylate	0.85 \pm 0.15	4.48 \pm 0.29***	1.48 \pm 0.11**	N.D.	N.D.
Malate	2.10 \pm 0.07	9.00 \pm 0.15**	5.12 \pm 0.12*	N.D.	N.D.

Note: Cells were grown in YNB supplemented with different concentrations of NaCl or LiCl. When A_{600} reached values of 0.5–0.7, metabolites were extracted and measured by high-performance liquid chromatography. Results are expressed in $\mu\text{g/mg}$ of cell protein. N.D.: Nondetectable. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data were expressed:

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

0.3 M). After 2- and 6-h of incubation, samples were taken and the activity of the enzymes isocitrate dehydrogenase (IDH), isocitrate lyase (ICL) and malate synthase (MS) was determined. Results in Figure 4a,b show that when NaCl was present, the activity of IDH clearly decreased (0.5 M NaCl) or it was close (1.5 M NaCl) to the control cells incubated in the absence of added salt. On the contrary, the addition of LiCl significantly activated IDH under any of the conditions analysed (Figure 4c,d). Moreover, the activities of ICL and MS, the two key enzymes responsible for the glyoxylate shunt, followed the same pattern and their activities increased during incubation in 0.5 M NaCl (Figure 4a), a concentration of sodium that is not only nontoxic but, as we have shown in Figure 1, improves cell performance. Additionally, 1.5 M NaCl did not significantly affect the activity of both enzymes neither after 2 h nor after a longer period of exposure (6 h) (Figure 4b). Once again, the effect of LiCl was very different from that produced by NaCl, since activation of these enzymes was never observed and, in fact, enzymatic activity inhibition was measured under most of our working conditions (Figure 4c,d). It is relevant that after 6 h incubation in lithium, the activity of both, ICL or MS was significantly decreased by either 0.1 or 0.3 M LiCl.

Taken together these results clearly point to very different metabolic responses induced by sodium or lithium.

3.4 | Transcriptional regulation of IDH, ICL and MS genes

The results shown above point to the fact that sodium, but not lithium, activates the glyoxylate shunt in *D. hansenii*. To try to gain additional support to our hypothesis, the expression levels of the genes coding for IDH (*DEHA2C10758g* and *DEHA2G05786g* coding for the two known IDH subunits required for the functioning of the enzyme), ICL (*DEHA2D12936g*) and MS (*DEHA2E13530g*) were studied by real-time PCR (Figure 5). The conditions of the experiment were the same than those used to measure enzymatic activities, that is, cells incubated in NaCl (0.5 M or 1.5 M) or LiCl (0.1 M or 0.3 M) during 2 or 6 h. The presence of NaCl did not induce changes in the transcription of the genes coding for IDH. Moreover, NaCl increased ICL and MS transcription levels, which resulted especially relevant

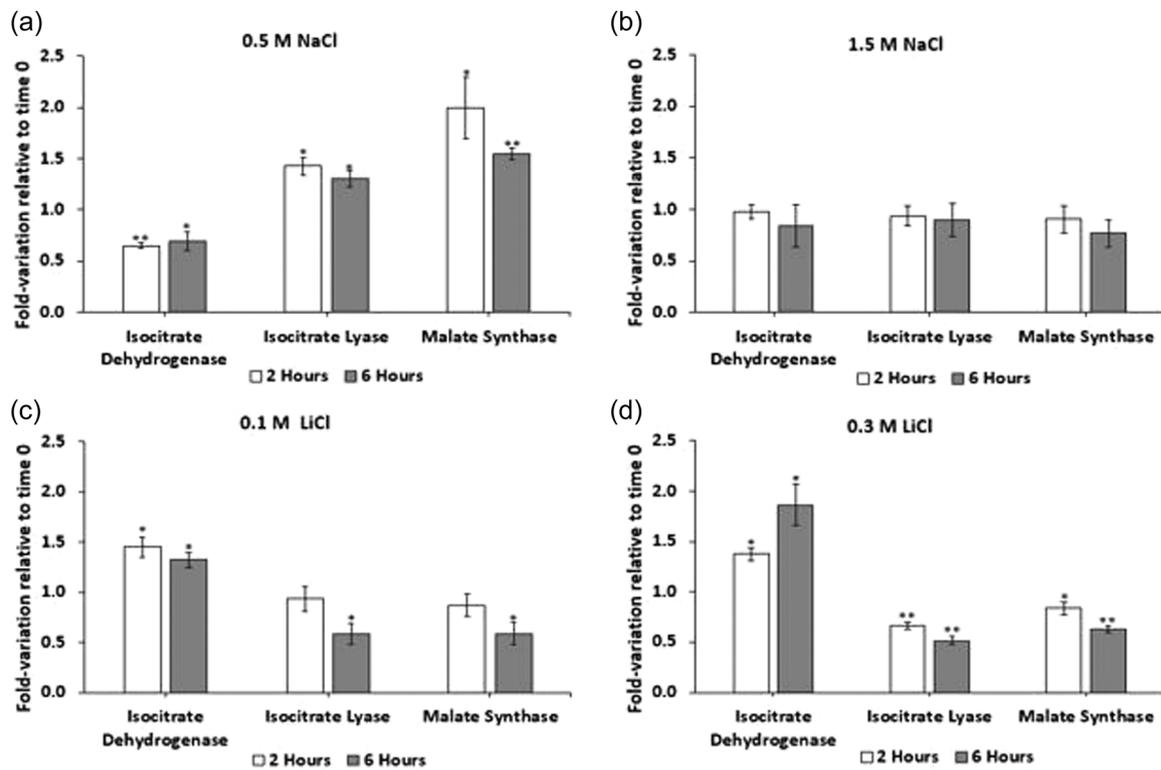


FIGURE 4 Enzymatic activities of isocitrate dehydrogenase, isocitrate lyase and malate synthase at different times after exposure to (a, b) NaCl or (c, d) LiCl. Values (U/mg) were expressed as Fold-variation relative to time 0 ratio. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data were expressed: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

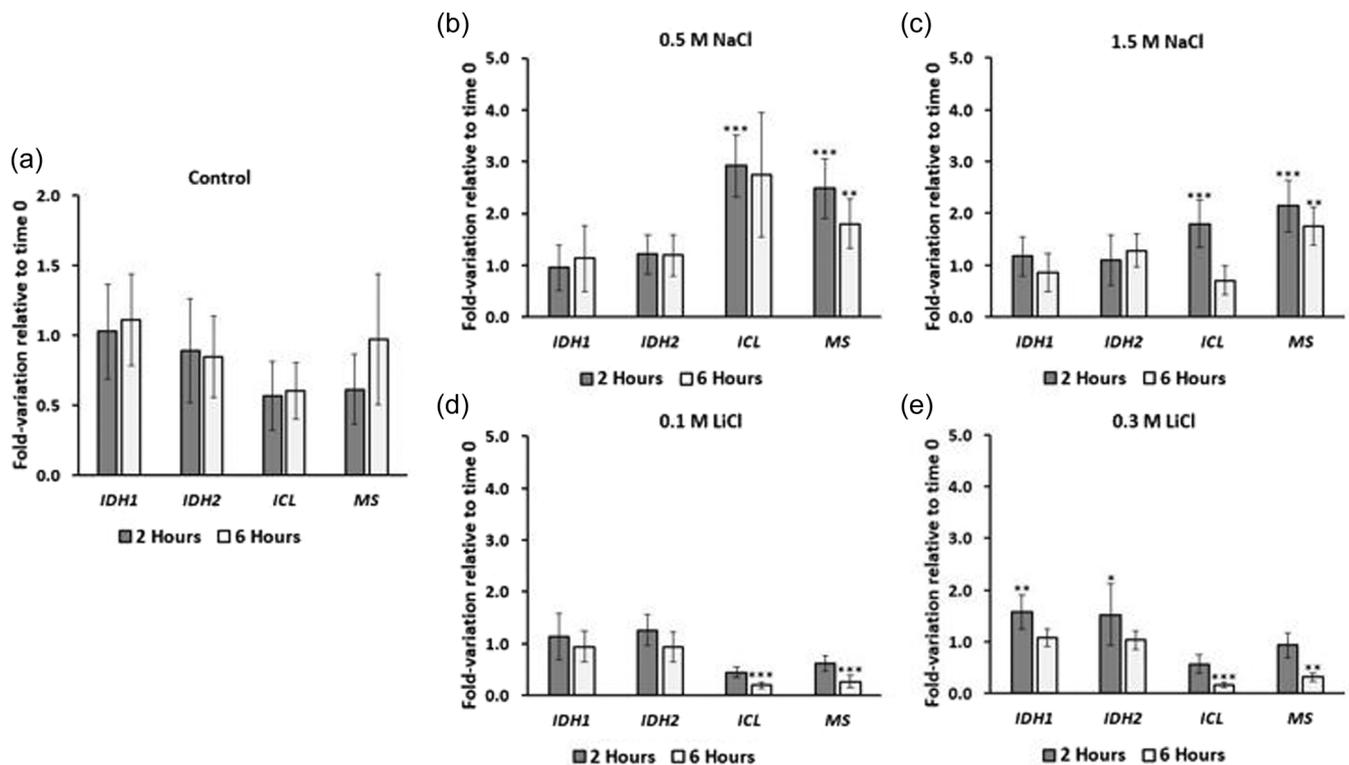


FIGURE 5 Changes in expression levels of DEHA2D12936g (ICL), DEHA2E13530g (MS), DEHA2C10758 (IDH₁) and DEHA2G05784g (IDH₂). (a) Control cells were incubated in the absence of added salt and treated cells were exposed to different concentrations of (b,c) NaCl or (d,e) LiCl. Samples were taken at different times. All transcript levels are referred to those for time 0, 2, or 6 h incubation in the absence of added salt. Mean values \pm standard deviation obtained in three independent experiments. Statistically significant data respect to control were expressed: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

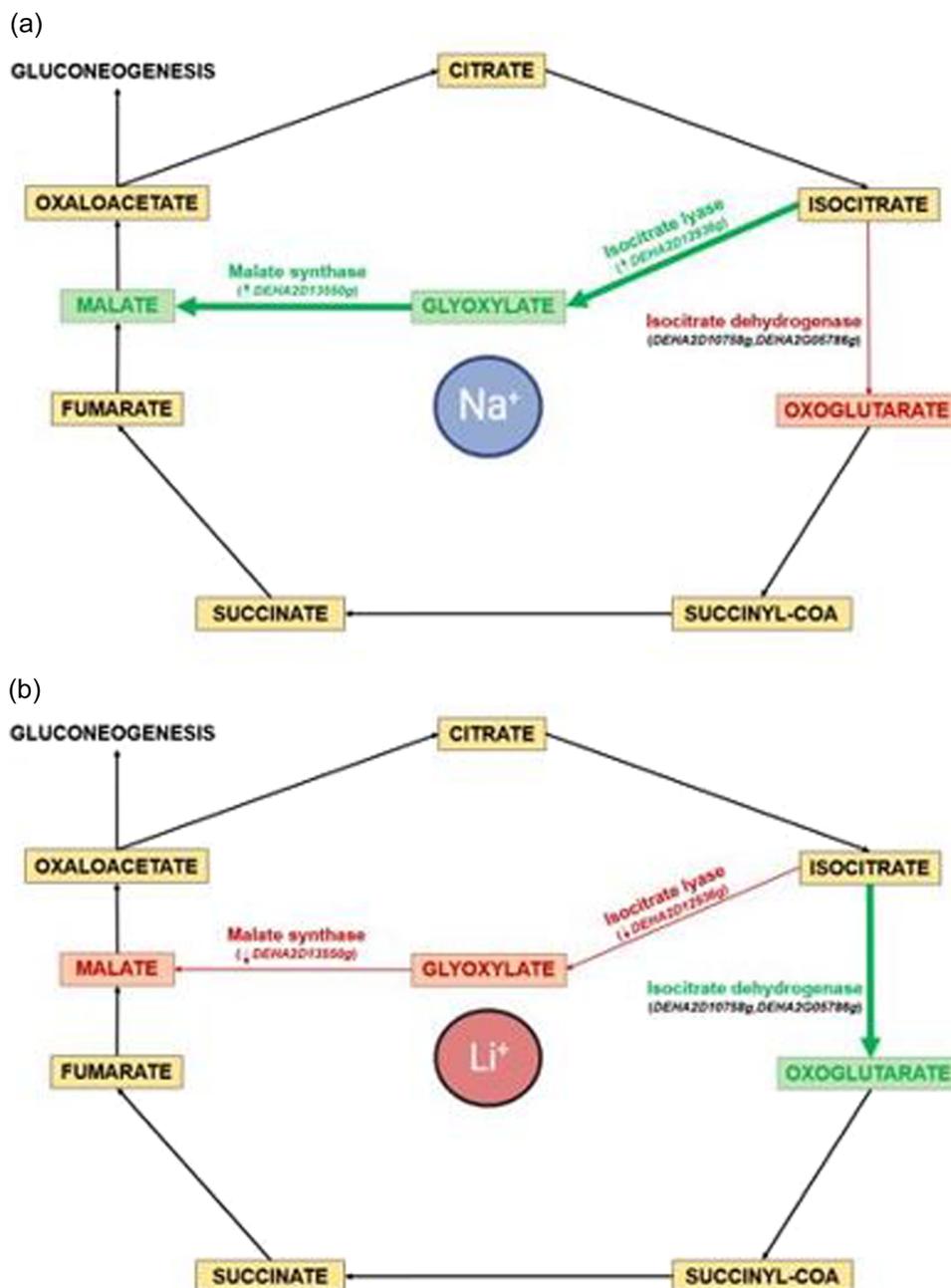


FIGURE 6 Schematic drawing of the proposed effects of (a) NaCl or (b) LiCl on the glyoxylic and tricarboxylic acid cycles. Globally, sodium increases the amounts of glyoxylate and malate, the activity of isocitrate lyase and malate synthase enzymes and the transcription of the genes coding for those enzymes. On the contrary, lithium causes an increase in oxoglutarate, in the activity of isocitrate dehydrogenase and in the transcription of the two genes coding for the subunits of the enzyme.

after 2 h incubation in 0.5 M NaCl (Figure 5b,c). On the other hand, when the effect of lithium was studied, we observed that IDH expression changed after 2 h incubation at 0.3 M LiCl. Under this condition, the two genes coding for IDH subunits were slightly activated. More relevant, and in contrast to our observation with sodium, lithium negatively affected the transcription level of the genes coding for ICL and MS in most of the conditions studied and, in any case, it never increased the transcription in comparison with the control conditions (Figure 5d,e).

4 | DISCUSSION

During decades, many different salt tolerance determinants have been identified in *D. hansenii*, including ion transporters, changes in plasma membrane composition or intracellular cation distribution (Prista et al., 2016).

We show in this work that while sodium is not harmful for *D. hansenii* cells, lithium is toxic even at low intracellular concentrations and this is accompanied with very different physiological and

metabolic responses to the presence of these cations in the external milieu.

It has been previously reported that salts activate fermentation, and consequently ethanol production, in *D. hansenii* (Calahorra et al., 2009). However, these results were not confirmed by other authors (Navarrete et al., 2021a, 2021b). In the present work, the levels of ethanol were undetectable under any of the different conditions used, confirming *D. hansenii* as a crabtree-negative yeast.

Phosphate is accumulated in *D. hansenii* in response to high salt (Sánchez et al., 2008) and this seems to agree with the fact that expression of the phosphate transporters coded by *PHO84* and *PHO89* is stimulated under these conditions (Navarrete et al., 2021a). At this respect, it is worth to mention that, similarly to the situation in *S. cerevisiae*, in *D. hansenii*, *PHO84* and *PHO89* work as phosphate/H⁺ and phosphate/Na⁺ symporters, respectively (Navarrete et al., 2021a). We confirmed that under optimal sodium concentrations (0.5 M NaCl) phosphate accumulation occurs and under any other stressful condition (excess of sodium or the presence of lithium) there is a decrease in the intracellular phosphate content.

In 2008 it was proposed that 1.0 M KCl or NaCl induce a change in the metabolic pattern of *D. hansenii* in favour of the glyoxylate cycle although important differences between the effects triggered by sodium or potassium were detected (Sánchez et al., 2008). Since then, no further information has been provided. In addition to allow the utilization of two carbon compounds (C2) to regenerate glucose (C6) via replenishment of the oxaloacetate pool to undergo gluconeogenesis instead of following the TCA path, the glyoxylate shunt has also been implicated in a variety of processes related to stress responses. For example, it is required for fungal virulence (Lorenz & Fink, 2001), and it is upregulated under conditions of oxidative stress (Ahn et al., 2016). An increase in the respiratory metabolism of *D. hansenii* has been observed in the presence of high salt using different approaches (Navarrete et al., 2021a; Sánchez et al., 2008), overlapping responses between salt and oxidative stress in *D. hansenii* have been reported (Ramos-Moreno et al., 2019b) and, additionally, proteins related to the cellular responses to oxidative stress have been found to be more abundant in the presence of salt (Navarrete et al., 2021b). Therefore, our results suggest the existence of a link in *D. hansenii* between the glyoxylate shunt, oxidative stress responses and the presence of NaCl.

Figure 6 is a schematic drawing summarizing our main findings. The metabolite analysis, enzyme activities and gene expression experiments show that under optimal cultivation conditions (0.5 M NaCl) the glyoxylate cycle is activated in *D. hansenii*. The decrease in oxoglutarate, the increase in glyoxylate and malate pools together with the decrease in the activity of IDH and the activation of ICL and MS support that hypothesis, which is reinforced by the increased expression of the genes coding for these two enzymes. The situation in the presence of 1.5 M NaCl is more complex and difficult to discuss since cells are dealing with an excessive amount of salt (hence additional osmotic stress) as shown in our growth experiments (Figure 1). However, our results also point to an activation of the

cycle under those conditions as indicated by the changes in ketoglutarate, glyoxylate and malate as well as the activated transcription of the genes coding for ICL and MS. On the other hand, lithium which behaved as a toxic cation under all conditions tested, did not activate the bypass.

The glyoxylate shunt is an alternative to the TCA cycle and it is essential for the utilization of acetate and short chain organic acids as carbon sources (C2 and C3). It still remains uncertain to us the ultimate reason to explain the activation of the bypass by sodium, but it is reasonable to think that the utilization of alternative carbon sources in the presence of salt can be an advantage to thrive under increasing salt concentrations in natural environments against other microbial competitors. In fact, it has been recently proposed that in *D. hansenii*, rapid metabolization of available carbon sources when salt increases and other nutrients and pH decrease is a successful survival strategy for growing in extreme environments (Navarrete et al., 2021a, 2022).

Living in salty environments is a complex and multifactorial process. Metabolic adaptations of *D. hansenii* to salt have been poorly explored. In this sense, the activation of the glyoxylate shunt by NaCl deserves to be studied in more detail. It would be important to define the situation in salt-sensitive yeasts. At this respect, future research should establish the relevance of that variant of the tricarboxylic acid cycle on the whole adjustment to halotolerance/halophilism.

ACKNOWLEDGEMENTS

Prof. Carmen Michán and Dr. Carlos Lucena, are acknowledged for their help in Real-Time PCR experiments. We thank Marcos Gómez and Daniel Salas for their collaboration in cell viability and the phosphate measurement tests, respectively. This work was supported by Grant Nos. Plan Propio Investigación, University of Córdoba 2021 and 2022, FEDER 1380653-R and AT21_00157 (Junta de Andalucía, Spain) (JR) and the Novo Nordisk Foundation within the framework of the AIM-Bio grant (Grant number NNF19SA0057794) (JLM). The authors would also like to acknowledge the support from the COST Action CA-18229 (Yeast4Bio).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Francisco S. Ruiz-Pérez  <http://orcid.org/0000-0003-2980-5657>

Carlos Leal  <http://orcid.org/0000-0002-2221-8620>

José L. Martínez  <http://orcid.org/0000-0002-4490-8534>

REFERENCES

- Aggarwal, M., Bansal, P. K., & Mondal, A. K. (2005). Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 22(6), 457–470. <https://doi.org/10.1002/yea.1223>
- Ahn, S., Jung, J., Jang, I.-A., Madsen, E. L., & Park, W. (2016). Role of glyoxylate shunt in oxidative stress response. *Journal of Biological*

- Chemistry, 291(22), 11928–11938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708149>
- Albert, A., Yenush, L., Gil-Mascarell, M. R., Rodriguez, P. L., Patel, S., Martínez-Ripoll, M., Blundell, T. L., & Serrano, R. (2000). X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *Journal of Molecular Biology*, 295(4), 927–938. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3408>
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2–3), 191–197. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00220-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00220-8)
- Bernt, E., & Bergmeyer, H. U. (1974). UV-assay. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 624–627). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50023-2>
- Calahorra, M., Sánchez, N. S., & Pena, A. (2009). Activation of fermentation by salts in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1293–1301. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00556.x>
- Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., & Ramos, J. (2000). Trk1 and Trk2 define the major K⁺ transport system in fission yeast. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 394–399.
- Chawla, S., Kundu, D., Randhawa, A., & Mondal, A. K. (2017). The serine/threonine phosphatase DhSIT4 modulates cell cycle, salt tolerance and cell wall integrity in halo tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Gene*, 606, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.022>
- Chell, R. M., Sundaram, T. K., & Wilkinson, A. E. (1978). Isolation and characterization of isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Biochemical Journal*, 173(1), 165–177. <https://doi.org/10.1042/bj1730165>
- Csutora, P., Strasz, A., Boldizsár, F., Németh, P., Sipos, K., Aiello, D. P., Bedwell, D. M., & Miseta, A. (2005). Inhibition of phosphoglucosyltransferase activity by lithium alters cellular calcium homeostasis and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 289(1), C58–C67. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00464.2004>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375–400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1)
- García-Neto, W., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Kowaltowski, A. J., & Alberto Luévano-Martínez, L. (2017). High osmolarity environments activate the mitochondrial alternative oxidase in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One*, 12(1), e0169621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169621>
- Gómez, M. (1996). The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 135(2–3), 157–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb07982.x>
- González-Hernández, J. C., Cárdenas-Monroy, C. A., & Peña, A. (2004). Sodium and potassium transport in the halophilic. *Yeast*, 21(5), 403–412. <https://doi.org/10.1002/yea.1108>
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 32, 9–15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412(6842), 83–86. <https://doi.org/10.1038/35083594>
- Marquina, M., González, A., Barreto, L., Gelis, S., Muñoz, I., Ruiz, A., Álvarez, M. C., Ramos, J., & Ariño, J. (2012). Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics*, 190(4), 1355–1364. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.138370>
- Martínez, J. L., Sychrova, H., & Ramos, J. (2011). Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.013>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Murguía, J. R., Bellés, J. M., & Serrano, R. (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29029–29033. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29029>
- Navarrete, C., Estrada, M., & Martínez, J. L. (2022). *Debaryomyces hansenii*: An old acquaintance for a fresh start in the era of the green biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 99. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03280-x>
- Navarrete, C., Frost, A. T., Ramos-Moreno, L., Krum, M. R., & Martínez, J. L. (2021a). A physiological characterization in controlled bioreactors reveals a novel survival strategy for *Debaryomyces hansenii* at high salinity. *Yeast*, 38(5), 302–315. <https://doi.org/10.1002/yea.3544>
- Navarrete, C., Petrežsélyová, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahrádka, J., Ariño, J., Sychrová, H., & Ramos, J. (2010). Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions: Potassium transport and yeast physiology. *FEMS Yeast Research*, 10(5), 508–517. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00630.x>
- Navarrete, C., Sánchez, B. J., Savickas, S., & Martínez, J. L. (2021b). DebaryOmicS: An integrative-omics study to understand the halophilic behaviour of *Debaryomyces hansenii*. *Microbial Biotechnology*, 15(4), 1133–1151. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13954>
- Norkrans, B. (1966). Studies on marine occurring yeasts: Growth related to pH, NaCl concentration and temperature. *Archiv Für Mikrobiologie*, 54(4), 374–392. <https://doi.org/10.1007/BF00406719>
- Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Archiv Für Mikrobiologie*, 62(4), 358–372. <https://doi.org/10.1007/BF00425641>
- Norkrans, B., & Kylin, A. (1969). Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 836–845. <https://doi.org/10.1128/jb.100.2.836-845.1969>
- Prista, C., Almagro, A., Loureiro-Dias, M. C., & Ramos, J. (1997). Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 4005–4009. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.4005-4009.1997>
- Prista, C., Loureiro-Dias, M., Montiel, V., & Ramos, J. (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of. *FEMS Yeast Research*, 5(8), 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.12.009>
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33(10), 523–533. <https://doi.org/10.1002/yea.3177>
- Ramos, J., Haro, R., & Rodríguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, 1029(2), 211–217. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90156-i](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90156-i)
- Ramos-Moreno, L., Ramos, J., & Michán, C. (2019b). Overlapping responses between salt and oxidative stress in *Debaryomyces hansenii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2753-3>
- Ramos-Moreno, L., Ruiz Castilla, F. J., Bravo, C., Martínez, E., Menéndez, M., Dios-Palomares, R., & Ramos, J. (2019a). Inoculation with a terroir selected *Debaryomyces hansenii* strain changes physico-chemical characteristics of Iberian cured pork loin. *Meat Science*, 157, 107875. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107875>

- Ramos-Moreno, L., Ruiz-Pérez, F., Rodríguez-Castro, E., & Ramos, J. (2021). *Debaryomyces hansenii* Is a real tool to improve a diversity of characteristics in sausages and dry-meat products. *Microorganisms*, 9, 1512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071512>
- Ruiz-Castilla, F. J., Bieber, J., Caro, G., Michán, C., Sychrova, H., & Ramos, J. (2021). Regulation and activity of CaTrk1, CaAcu1 and CaHak1, the three plasma membrane potassium transporters in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, 1863(1), 183486. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183486>
- Sánchez, N. S., Arreguín, R., Calahorra, M., & Peña, A. (2008). Effects of salts on aerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1303–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00426.x>
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., Ramírez, J., & Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122(10), 977–990. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.002>
- Santos, M. A. S., Gomes, A. C., Santos, M. C., Carreto, L. C., & Moura, G. R. (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *Comptes Rendus Biologies*, 334(8), 607–611. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.008>
- Sanui, H. (1974). Measurement of inorganic orthophosphate in biological materials: Extraction properties of butyl acetate. *Analytical Biochemistry*, 60(2), 489–504. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90259-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90259-0)
- Silverstein, R. M. (1975). The determination of the molar extinction coefficient of reduced DTNB. *Analytical Biochemistry*, 63(1), 281–282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90219-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90219-5)
- Spasskaya, D. S., Kotlov, M. I., Lekanov, D. S., Tutyaeva, V. V., Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Karpov, V. L., & Karpov, D. S. (2021). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering reveals the contribution of the 26S proteasome to the extremophilic nature of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *ACS Synthetic Biology*, 10(2), 297–308. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00426>
- Strucko, T., Andersen, N. L., Mahler, M. R., Martínez, J. L., & Mortensen, U. H. (2021). A CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in *Debaryomyces hansenii*. *Synthetic Biology*, 6(1), ysab031. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysab031>
- Tester, M. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Turk, M., Montiel, V., Žigon, D., Plemenitaš, A., & Ramos, J. (2007). Plasma membrane composition of *Debaryomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiology*, 153(Pt 10), 3586–3592. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/009563-0>
- Yenush, L. (2016). Potassium and sodium transport in yeast. In J. Ramos, H. Sychrová, & M. Kschischo (Eds.), *Yeast membrane transport* (pp. 187–228). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_8

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Ruiz-Pérez, F. S., Ruiz-Castilla, F. J., Leal, C., Martínez, J. L., & Ramos, J. (2023). Sodium and lithium exert differential effects on the central carbon metabolism of *Debaryomyces hansenii* through the glyoxylate shunt regulation. *Yeast*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/yea.3856>

