

Trabajo de Fin de Grado

Producción de halocina L8 y estudio de sus posibles aplicaciones biomédicas

Autor: **Héctor J. Botella Valle**

Tutores: **Marina Torreblanca Calvo** y **Manuel Sánchez Angulo**

Curso académico **2015-2016**

Facultad de
**Ciencias
Experimentales**

Departamento de
**Producción Vegetal y
Microbiología**

Grado en
Biotechnología

Área de conocimiento:
Microbiología



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen, Abstract y Palabras Clave	3
2. Introducción.....	4
2.1. Dominio <i>Archaea</i> y filogenia	4
2.2. Arqueas halófilas extremas.....	7
2.3. Halocinas	8
3. Antecedentes y Objetivos	11
4. Materiales y Métodos	12
4.1. Microorganismos	12
4.1.1. Arqueas halófilas extremas.....	12
4.1.2. Bacterias.....	12
4.2. Medios de cultivo y esterilización.....	12
4.2.1. Medios de cultivo para halófilos extremos.....	12
4.2.2. Medios de cultivo para bacterias	13
4.3. Recuperación y aislamiento de las cepas de halófilos extremos.....	13
4.4. Microscopía óptica	13
4.5. Técnicas de cultivo en doble capa.....	13
4.6. Detección de la actividad inhibitoria de las muestras	15
4.6.1.a) Método de las diluciones dobles: cálculo de las UA/mL.....	15
4.6.1.b) Medición de los halos de inhibición.....	16
4.7. Detección de fagos.....	17
4.8. Estudios realizados con la cepa productora.....	17
4.8.1. Detección de actividad halocina intracelular.....	17
4.8.2. Producción de halocina L8 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales.....	17
4.9. Producción y obtención de halocina L8 a gran escala	18
4.10. Estabilidad de la halocina L8 frente a la proteinasa K.....	19
4.11. Estudio del efecto de la halocina L8 en cultivos bacterianos.....	20
5. Resultados y Discusión	21
5.1. Selección de la cepa sensible.....	21
5.2. Ausencia de fagos en los extractos de halocina L8.....	21
5.3. La halocina L8 no es intracelular	22
5.4. Producción de halocina L8 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales	22
5.5. Obtención de halocina L8 a gran escala.....	26
5.6. La halocina L8 es sensible frente a la proteinasa K	29
5.7. Estudio de la halocina L8 como sustancia antibacteriana	30
5.7.1. Efecto sobre <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
5.7.2. Efecto sobre <i>Bacillus</i> sp.....	33
6. Conclusiones y Proyección Futura.....	35
7. Bibliografía.....	37

1.- RESUMEN, ABSTRACT Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

La producción de halocinas por arqueas halófilas extremas es un hecho ampliamente distribuido en la Familia *Halobacteriaceae* (Meseguer et al. 1986; Torreblanca et al., 1994). Una de ellas, la halocina L8 producida por la cepa L8 del género *Haloferax*, es una halocina no sal dependiente, que ha mostrado un efecto sobre el crecimiento de *Bacillus* sp en medio sólido (Pastor, A., 2014).

Dados estos antecedentes, en este trabajo fin de grado se ha procedido en primer lugar a optimizar la producción de la halocina L8, para posteriormente concentrarla y purificarla parcialmente. A continuación, esta halocina semipurificada, ha sido probada como antimicrobiano frente a bacterias, concretamente *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus* sp, para observar el efecto sobre el crecimiento y la morfología en ambas especies. Finalmente también ha sido ensayada como antitumoral en líneas celulares de cáncer de colon.

ABSTRACT

Halocin production by extreme halophilic archaea is a widely distributed feature within the *Halobacteriaceae* Family (Meseguer et al. 1986; Torreblanca et al., 1994). Among these, the L8 halocin produced by the *Haloferax* genus L8 strain, is a nondependent halocin which has showed an effect on the growth of *Bacillus* sp in solid medium (Pastor, A., 2014).

Given these records, in this final project we have proceeded to optimize the L8 halocin production in the first place, to later concentrate and partially purify it. Afterwards, this semipurified halocin was tested as an antibacterial agent, specifically against the *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus* sp bacteria, to observe the effects on the growth and morphology of both species. Finally, it was also tested as an antitumoural agent against colon cancer cell lines.

PALABRAS CLAVE: Halocinas, haloarqueas, halófilos extremos, antibacterianos, antitumorales

2.- INTRODUCCIÓN

2.1. Dominio *Archaea* y filogenia

Carl Woese y colaboradores propusieron en 1990 una nueva clasificación de los seres vivos basada en tres dominios que se dividen a su vez, en distintos reinos o filos. A los dominios ya descritos *Bacteria* y *Eukarya* se añade un tercero, *Archaea*, al analizar las secuencias del 16SrRNA de un amplio grupo de procariotas. El 16SrRNA es un fiable marcador filogenético ya que está ampliamente distribuido y su función (y por tanto su secuencia) está muy conservada, presentando cambios de manera muy lenta en el tiempo.

Dentro de este análisis de secuencias, Woese y Fox encontraron diferencias significativas entre un grupo de bacterias metanógenas y el resto de procariotas analizados. Este grupo fue denominado “*archaebacteria*” (Woese, Carl R., Fox, George E., 1977). Es de destacar que los ambientes extremos donde se encuentran estos microorganismos se asemejan a los que pudieron tener lugar en nuestro planeta hace tres o cuatro millones de años: atmósfera reductora, exposición a radiaciones solares y descargas eléctricas, elevada temperatura y atmósfera rica en anhídrido carbónico.

Los estudios mencionados de análisis de secuencias y estudios posteriores determinaron que el dominio *Archaea* estaba constituido por las consideradas hasta el momento "bacterias metanógenas" (Woese, Carl R., Fox, George E., 1977), los halófilos extremos (Magrum, L.J. et al., 1978) y los termoacidófilos (Woese, Carl R. et al., 1978). En las décadas posteriores se descubrieron más fenotipos como metanógenos hipertermófilos o psicrófilos, metanógenos alcalófilos y/o halófilos, e hipertermófilos anaeróbicos, alcalófilos y neutrófilos. Se han encontrado, además, arqueas mesofílicas en diferentes ambientes como mares y suelos (Forterre, P. et al., 2002).

De lo anterior se establece, por tanto, que las arqueas forman un grupo filogenético independiente y de categoría taxonómica equiparable a los otros dos dominios descritos (*Bacteria* y *Eukarya*). En la figura 1 se observa el denominado “árbol de la vida” o “árbol universal”, en el cual se representan los tres grandes dominios caracterizados hasta el momento, *Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea*.

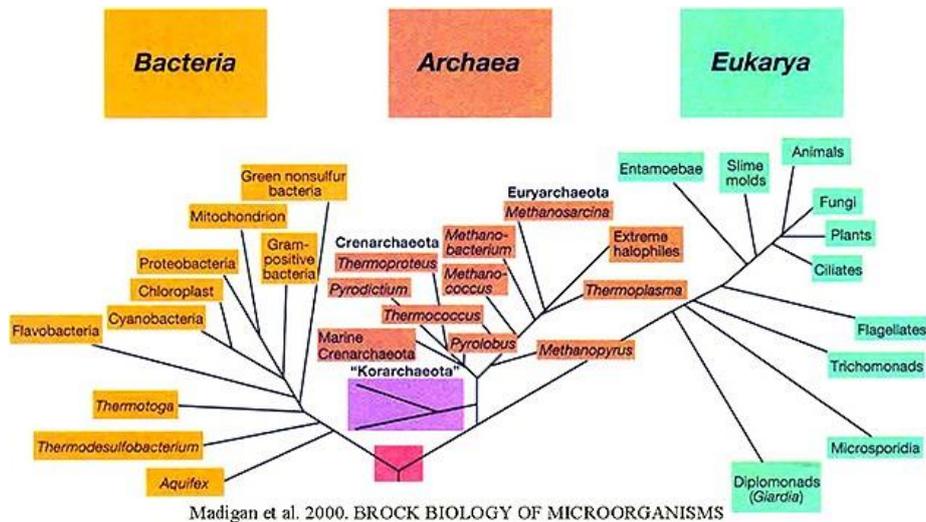


Figura 1: Árbol filogenético de los tres Dominios actuales que constituyen la vida.

Estudios recientes (*Williams et al., 2013*) sugieren que este árbol podría ser incorrecto, proponiendo en lugar de tres dominios la existencia únicamente de dos. Mediante análisis genómicos se han detectado genes homólogos entre arqueas y eucariotas cuyas similitudes son suficientemente relevantes para llegar a considerar un ancestro común entre estos dos, hasta ahora, dominios, excluyendo de este grupo a las bacterias. Este estudio de 2013 propone considerar los dominios *Archaea* y *Bacteria* únicamente, considerando que el actual dominio *Eukarya* ha surgido a través de una asociación entre ambos. La hipótesis que se sigue para justificar esta asociación es que un *archaeon* participó en los orígenes de los eucariotas fundando el linaje del hospedador para la endosimbiosis mitocondrial.

Hasta 1996, el dominio *Archaea* se componía de dos *Phyla* de acuerdo con los estudios de comparaciones de 16S rRNA (*Woese et al., 1990*). El primero de ellos el *Phylum Crenarchaeota* el cual engloba a los microorganismos termoacidófilos, hipertermófilos, varios grupos de microorganismos mesófilos y probablemente microorganismos psicrófilos que han sido detectados por PCR aunque no se ha logrado aún cultivarlos (*Forterre et al., 2002*). Dentro del segundo, el *Phylum Euryarchaeota* se encuentran microorganismos hipertermófilos, metanógenos, halófilos y metanógenos termofílicos (*Brown et al., 1997*).

Sin embargo se fueron descubriendo especies de arqueas que no se correspondían con las características de los dos *Phyla* descritos anteriormente. Estas especies se situaron de momento en un nuevo *Phylum*, el llamado *Korarchaeota* (*Bams et al., 1996*). Posteriormente en el año 2002 (*Huber et al., 2002*) propusieron un cuarto *Phylum*, denominado *Nanoarchaeota*, aunque tampoco se ha conseguido obtener ningún cultivo puro del mismo.

En 2008 un quinto *Phylum* fue propuesto por *Brochier-Armanet et al.* al que llamaron *Thaumarchaeota* y que distingue los linajes de arqueas mesófilas oxidantes de amonio (AOA)

de los linajes de *Crenarchaeota* hipertermófilos. Este *Phylum* se propuso tras el análisis de secuencias de rRNA y de proteínas ribosómicas, y posteriormente fueron secundados por otros autores (*Spang et al.*, 2010, *Jin-Kyung Hong et al.*, 2014) mediante análisis de los genomas y análisis comparativo de secuencias génicas de rRNA 16S.

Más tarde, en el año 2011 se propuso la existencia de un sexto *Phylum*, *Aigarchaeota* (*Nunoura et al.*, 2011), sugerido de nuevo por una cepa no cultivada (*Caldiarchaeum subterraneum*), pero que sus características genómicas eran lo suficientemente distintas de las descritas hasta ese momento, como para proponer su pertenencia a un *Phylum* distinto.

En el año 2013 a partir del análisis detallado de genes ribosómicos conservados y genes informativos fueron propuestos cuatro *Phyla* más, *Geoarchaeota* (*Kozubal et al.*, 2013), y *Aenigmarchaeota*, *Diapherotrites* y *Parvarchaeota* (*Rinke et al.*, 2013).

Por último, en el año 2015, mediante un estudio metagenómico de una muestra de sedimentos del Océano Ártico tomada cerca de un respiradero hidrotermal, se ha propuesto un nuevo *Phylum*, *Lokiarchaeota* (*Spang et al.*, 2015).

Vemos pues, que la clasificación de las arqueas, y de los procariotas en general, es un tema que está en constante revisión, y todo ello debido a los nuevos métodos de identificación microbiana, basados principalmente en secuencias de genes ribosómicos, y que están permitiendo detectar muchos de los microorganismos no cultivables presentes en el ambiente. En la figura 2 podemos ver uno de los últimos árboles filogenéticos que han sido publicados, pero en el que no están incluidos aún algunos de los *Phyla* que se han descrito más recientemente.

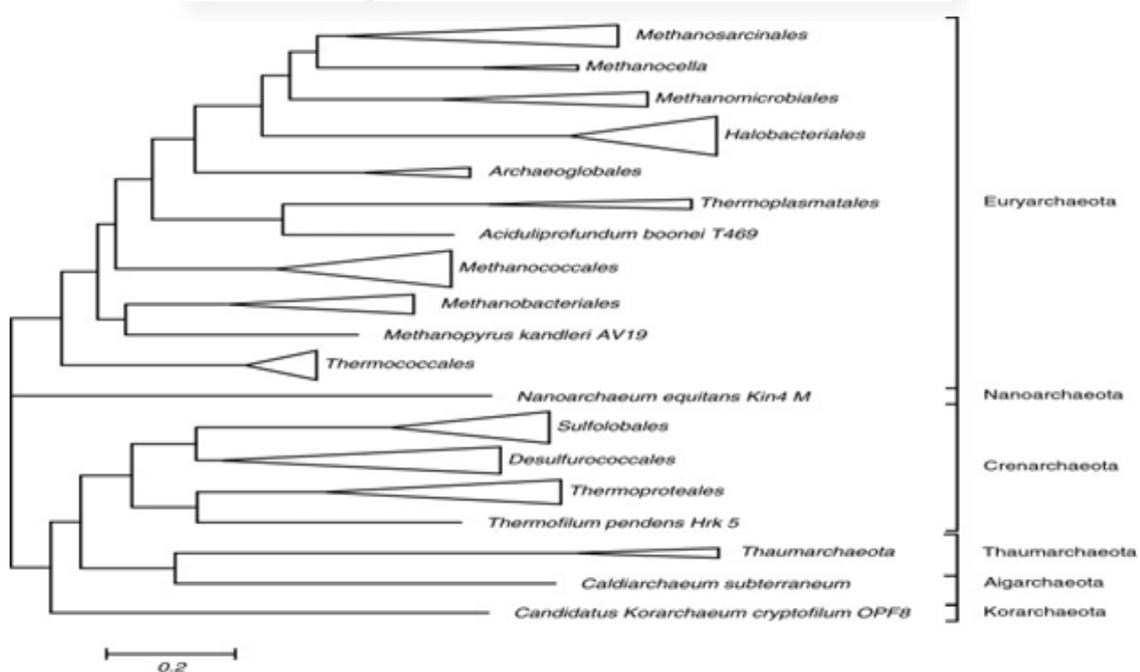


Figura 2: Filogenia del Dominio *Archaea* basado en la comparación de la secuencia de proteínas ribosómicas. Modificado por Wolf et al. 2012.

2.2. Arqueas halófilas extremas

Las arqueas halófilas están clasificadas dentro del *Phylum Euryarchaeota* (Woese et al., 1990; Bams et al., 1996). De momento solamente hay una familia dentro del orden *Halobacteriales*, la familia *Halobacteriaceae*. Sus miembros son halófilos extremos ya que muestran una estricta dependencia por altas concentraciones de sal tanto para su crecimiento como para su estabilidad estructural. Esta familia está dividida en 18 géneros (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, 2004*).

Las haloarqueas abundan en salinas y lagos hipersalinos, como el Mar Muerto, o las salinas de Santa Pola. Suelen crecer a una concentración de NaCl de aproximadamente 4,5 M (unas diez veces más que la salinidad del agua del mar). Las arqueas halófilas han desarrollado dos estrategias para poder soportar el estrés osmótico al que se encuentran expuestas. La primera consiste en la acumulación de solutos compatibles de bajo peso molecular (glicerol o sacarosa por ejemplo) en el citoplasma. La segunda estrategia es característica de la familia *Halobacteriaceae* principalmente, y consiste en la acumulación de sales inorgánicas en el citoplasma.

Además de las altas concentraciones de sales de estos ambientes, también se suelen alcanzar temperaturas elevadas de hasta 60°C y el contenido en O₂ suele ser bajo debido a la prácticamente nula solubilidad de este gas en estos medios tan saturados, a pesar de estas condiciones tan extremas, se han descrito casos de arqueas que son capaces de crecer en estos ambientes (*Montalvo-Rodríguez et al., 2000*).

Muchas especies de arqueas halófilas extremas son capaces de crecer en medio mínimo en presencia de glucosa (*Rodríguez-Valera et al., 1980*). Son organismos quimioheterótrofos aerobios, los cuales degradan los compuestos carbonados para utilizarlos como fuente de carbono y energía mediante el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) y la cadena transportadora de electrones, siendo el O₂ el aceptor final de electrones; además utilizan el ciclo del glioxilato y reacciones de la vía Embden-Meterhof y de la vía modificada de Etner-Doudoroff (*Oren and Mana, 2002*). Algunas haloarqueas no son aerobias estrictas, pudiendo fermentar aminoácidos (*Hartmann et al., 1980*) o realizar respiración anaerobia utilizando como aceptor final de electrones el nitrato (*Mancinelli and Hochstein, 1986*).

Las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen a los géneros *Halobacterium*, *Haloferax* y *Haloarcula*. El género *Halobacterium* fue el primer género descrito aislado de salazones de pescado (*Kamekura, 1998*). Crecen entre 3,5 y 5,2 M de NaCl y además requieren aminoácidos para su crecimiento. El género *Haloferax* posee el menor requerimiento salino, encontrándose su óptimo alrededor de 2 M de NaCl. Además, necesitan elevadas concentraciones de Mg⁺². En

cuanto al género *Haloarcula* requieren concentraciones elevadas de NaCl y Mg^{+2} para su crecimiento.

2.3. Halocinas

El estudio de antagonismos bacterianos ha puesto de manifiesto la existencia de péptidos o proteínas con actividad bactericida a los que se denominó bacteriocinas. Estos antagonismos son muy comunes entre bacterias aunque sus tipos y mecanismos de acción varían enormemente (Reeves, 1965; Tagg *et al.*, 1976; Konisky, 1982).

Así como existen antagonismos entre bacterias, también han sido encontrados en arqueas halófilas extremas. Los péptidos o proteínas producidos por haloarqueas con actividad antibiótica se denominan halocinas. Los estudios de antagonismo entre diferentes cepas de haloarqueas se han extendido casi a 200 cepas diferentes, concluyendo que la producción de halocinas es una característica prácticamente universal de las arqueas halófilas extremas (Meseguer *et al.*, 1986; Torreblanca *et al.*, 1994).

La acción de las halocinas parece limitada a cierto número de microorganismos relacionados con la cepa productora. Sin embargo, se han encontrado halocinas producidas por arqueas del *Phylum Euryarchaeota* que son capaces de inhibir el crecimiento de especies del *Phylum Crenarchaeota* (Haseltine *et al.*, 2001).

Las halocinas generalmente matan a los organismos sensibles provocando un desequilibrio osmótico que produce hinchazón celular seguido de la lisis (O'Connor y Shand, 2002; Sun *et al.*, 2005; Pāsi *et al.*, 2008). Hasta el momento se han estudiado 15 halocinas (tabla 1).

De todas las halocinas que se menciona en la tabla, sólo se conoce el mecanismo de acción de la halocina H6. Se trata de una proteína con un peso molecular de 32 KDa, termorresistente y no sal dependiente. Se ha comprobado que inhibe específicamente el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) presente en la membrana de las arqueas halófilas extremas (Meseguer *et al.*, 1995).

Tabla 1: Halocinas caracterizadas (a fecha noviembre de 2015), y sus productores en orden cronológico (adaptado y modificado de O'Connor y Shand, 2002; Shand y Leyva, 2007).

Halocina	Productor	Referencia	Halocina	Productor	Referencia
H2	<i>Haloarchaeon</i> sp cepa GLA22	Rodríguez-Valera et al., 1982	H1	<i>Haloferax mediterranei</i> M2a	Platas et al., 1996
H3	<i>Haloarchaeon</i> sp cepa Gaa12	Rodríguez-Valera et al., 1982	S8	<i>Halarchaeon</i> sp cepa S8a	Price y Shand, 2000
H5	<i>Haloarchaeon</i> sp cepa Ma2.20	Rodríguez et al., 1982	U1	Cepa no caracterizada	Haseltine et al., 2001
H4	<i>Haloferax mediterranei</i> R4 ATCC 33500	Meseguer y Rodríguez-Valera, 1985, 1986	C8	<i>Halobacterium</i> sp cepa AS7092	Li et al., 2003
R1	<i>Halobacterium salinarum</i> cepa GN101	Rdesty Sturm, 1987	Sech7a	<i>Haloferax mediterranei</i> SechA	Päsi et al., 2008
A4	<i>Halobacterium</i> sp cepa TuA4	Rdesty Sturm, 1987	KPS1	<i>Haloferax volcanii</i> KPS1	Kavitha et al., 2011
H6/H7	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39	Torreblanca et al., 1989, 1990, Meseguer et al., 1995	SH10	<i>Natrinema</i> sp cepa BTSH10	Karthikeyan et al., 2013
G1	<i>Halobacterium</i> sp cepa GRB	Soppa y Oesterhelt, 1989			

En 1995, Meseguer y colaboradores obtuvieron una cepa superproductora de halocina, *Haloferax gibbonsii* CECT 4547, denominando a esta halocina H7, pero con las mismas características y modo de acción que la H6. Esta halocina fue probada en ratas y ratones mostrando un efecto diurético y natriurético (datos no publicados). A partir de estos resultados, se planteó la aplicación de esta halocina en patologías en las que se generan isquemias, donde una inhibición del intercambiador Na^+/H^+ podría mejorar el cuadro clínico de muchas enfermedades. Se realizaron entonces, estudios en perros (Alberola et al., 1999; Such et al., 1999), observándose la reducción del tamaño del infarto de miocardio provocado y las extrasístoles ventriculares que se producen durante el mismo, lo que llevó a plantear a los autores la posible aplicación en medicina humana.

Resultados publicados recientemente han demostrado que algunas halocinas tienen también un efecto antimicrobiano contra patógenos humanos Gram positivos y Gram negativos (Kavitha et al., 2011).

Finalmente, un estudio reciente sobre la halocina L8 (Pastor, A. 2014) demostró que en placas sembradas con *Bacillus* y tratadas con halocina, esta afectaba al crecimiento de la bacteria en medio sólido, y más concretamente al comportamiento de enjambrazón (*swarming*) de la misma. Los enjambres bacterianos se forman debido a una migración rápida y coordinada de bacterias a través de las superficies (Harshey, 2003; Kearns, 2010). Los enjambres generalmente contienen células con movimiento coordinado que fluyen en direcciones

múltiples, debido a los flagelos que poseen y a las secreciones de surfactantes, formando los clásicos patrones de “remolinos” y “chorros” (Darnton *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). En ausencia de halocina las colonias de *Bacillus* mostraron la presencia de prolongaciones en sus bordes debido al movimiento en grupo de las bacterias que forman la colonia. Cuando la halocina estaba presente, los bordes de las colonias afectadas no tenían dichas prolongaciones (figura 3) por lo que a nivel macroscópico el espacio entre las colonias era transparente. Este resultado podría indicar que la halocina está afectando o bien al movimiento flagelar o bien a la capacidad de agrupamiento de estas bacterias al afectar a la comunicación intercelular.

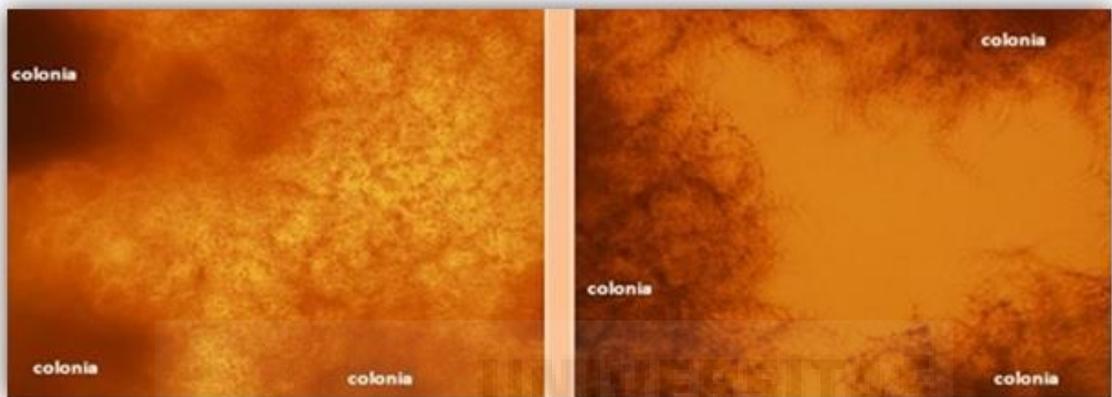


Figura 3: Observación al microscopio óptico de colonias de *Bacillus sp* crecidas en doble capa. Izquierda: crecimiento sin halocina, puede observarse que el espacio entre colonias está ocupado por los enjambres bacterianos producidos a partir de las distintas colonias. Derecha: crecimiento con halocina L8 donde se observa que los enjambres no ocupan los espacios entre las colonias.

3.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES

Hasta el momento, sólo dos halocinas han mostrado tener efecto sobre células de otro Dominio diferente. Como se ha mencionado en la Introducción, la halocina H7 mostró ser efectiva en células eucariotas (*Alberola et al.*, 1999; *Such et al.*, 1999; *Lequerica et al.*, 2006), mientras que la halocina L8 ha mostrado su efecto sobre el crecimiento de *Bacillus* en medio sólido (*Pastor, A.*, 2014).

Por otro lado, la no sal-dependencia es un requisito indispensable para que las halocinas puedan tener interés biotecnológico como agentes terapéuticos (ej.: bien como antibacterianos o como antitumorales. Es decir, que no se inactiven irreversiblemente en ausencia de sales, y mantengan su estructura y función intactas. En este sentido la halocina L8 cumple con dicha característica (*Pastor, A.*, 2014), lo que la hace ideal para ser empleada en cualquier medio con el fin de observar sus efectos frente a otros microorganismos con los que no entra en contacto en su entorno natural, como bacterias.

OBJETIVOS

En este punto, es importante aclarar que no se ha realizado una caracterización completa de la halocina L8, sino una semipurificación de la misma. Por tanto cuando hablamos de halocina L8 nos estamos refiriendo siempre a un extracto procedente del sobrenadante de la cepa productora, con actividad inhibitoria y de naturaleza proteica.

1. Optimizar la producción de halocina L8 en función del tiempo y del crecimiento a diferentes concentraciones de sales.
2. Comprobar la existencia o no de actividad inhibitoria intracelular.
3. Determinar que la actividad inhibitoria no es debida a la presencia de fagos.
4. Comprobar la naturaleza proteica de la halocina L8.
5. Producir halocina L8 a gran escala y llevar a cabo procesos de semipurificación mediante filtración tangencial.
6. Confirmar la no sal dependencia de la halocina L8.
7. Estudiar su posible efecto inhibitorio frente a microorganismos del Dominio *Bacteria*.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos

4.1.1. Arqueas halófilas extremas

Haloferax sp cepa L8 fue la cepa seleccionada como productora de halocina.

Halobacterium salinarum NRC 817 y *Haloarcula californiae* ATCC 33799 fueron seleccionadas como posibles cepas sensibles.

4.1.2. Bacterias

Para probar el efecto de la halocina L8 como antibacteriano se utilizaron 2 especies de bacterias: *Streptococcus pneumoniae* cepa R6 (coco Gram positivo, acapsulado y no patógeno) y *Bacillus sp* CECT 40 (bacilo Gram positivo esporulado y no patógeno).

4.2. Medios de cultivo y esterilización

4.2.1. Medios de cultivo para halófilos extremos

Dos tipos de medio de cultivo, líquido y sólido, fueron utilizados para crecer las arqueas halófilas extremas. Previamente, ambos medios se prepararon con la misma base: una solución de agua de sales (*salt water*, o SW) que conserva las proporciones relativas del agua de mar presentes en las salinas, el lugar de procedencia de estos microorganismos. A estas proporciones salinas se les aplica una reducción de las concentraciones de CaCl_2 y NaHCO_3 para evitar la precipitación de las mismas a concentraciones más elevadas (Rodríguez Valera *et al.*, 1980).

Se utilizó una concentración predeterminada SW 25% con la siguiente composición de sales por litro: 0,167 gramos de HNaCO_3 , 0,65 gramos de NaBr, 0,958 gramos de CaCl_2 , 5 gramos de KCl, 34,6 gr de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 49,5 gramos de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 195 gramos de NaCl y agua destilada. Una vez disueltas las sales completamente se utilizó papel de filtro para eliminar impurezas.

Posteriormente, un 0,5% de extracto de levadura (Panreac) fue adicionado a esta base de SW 25% para preparar tanto los medios líquidos como sólidos. El pH de ambos fue siempre ajustado a 7,2. A los medios sólidos se les adicionó un 2% de agar-agar (Panreac). Todos los medios fueron esterilizados en un autoclave vertical (JP Selecta) a 121°C durante 20 minutos. Finalmente el medio sólido fue distribuido en placas de Petri o en tubos inclinados.

Las cepas de arqueas que se utilizaron para la realización de este trabajo se conservaron tanto en tubos con medio sólido en agar inclinado, como en placas Petri, a temperatura ambiente y en oscuridad.

4.2.2. Medios de cultivo para bacterias

Se utilizaron tres medios de cultivo: caldo ordinario, agar nutritivo y medio THY; los dos primeros para *Bacillus* sp y el último para *S. pneumoniae*. El caldo ordinario (Scharlab S.L.) se preparó según las indicaciones descritas por el fabricante. El medio contiene (g/L): 1 g de extracto de carne, 2 g de extracto de levadura, 5 g de peptona y 5 g de cloruro sódico. El agar nutritivo contiene los mismos componentes que el anterior más un 1,5% de agar-agar. El medio THY contiene (g/L): 30 g de caldo Todd-Hewitt (BD) y 5 g de extracto de levadura, y es un medio específico para el crecimiento rápido de *S. pneumoniae*. Todos estos medios fueron esterilizados en autoclave antes de su uso.

4.3. Recuperación y aislamiento de las cepas de halófilos extremos

La recuperación de las distintas cepas utilizadas para realizar este trabajo se llevó a cabo, en primer lugar, realizando siembras de las mismas (conservadas en tubos de agar inclinado) sobre placas Petri con medio sólido y se incubaron a 37°C de 5 a 7 días. Una vez comprobados el crecimiento y la pureza de los cultivos, se seleccionaron colonias aisladas que se inocularon de nuevo en tubos de agar inclinado.

4.4. Microscopía óptica

Para la observación de bacterias se empleó un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX50). Las bacterias fueron fijadas en su mismo medio añadiendo formaldehído (1% concentración final) a cada muestra, y posteriormente observadas al microscopio. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Olympus DP-10.

4.5. Técnicas de cultivo en doble capa

Para la obtención de dobles capas se prepararon previamente: I) una placa de Petri conteniendo 15 mL de medio de cultivo sólido (SW 25%, 0,5% de extracto de levadura y 2% de agar-agar), II) tubos de vidrio de 5 mL conteniendo el mismo medio sólido, y III) tubos de vidrio con 100 µL de SW25%. Los tubos de vidrio (II y III) se esterilizan en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Por otro lado, fue necesario obtener los cultivos en fase exponencial de las cepas utilizadas como sensibles. Para ello se parte de cultivos con una Densidad Óptica (DO) de 1-1,2 a 540 nm (medida en un espectrofotómetro ZUZI 4201-50) y se diluyen con medio líquido hasta

obtener una densidad óptica de 0,5 a 540 nm, que se corresponde aproximadamente con 10^7 UFC/mL (Meseguer *et al.*, 1985, 1986). De esta dilución se transfieren 100 μ L a los tubos III) con SW25%. Las dobles capas contendrán, por tanto, 10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro).

Las placas Petri con 15 mL de medio de cultivo SW25% se mantienen a 55°C en una estufa para que en la superficie se condense el vapor de agua que permita una fácil extensión. A su vez, los tubos II) con medio fundido SW25%, se mantienen en un baño a 55°C para evitar su solidificación, dado que la temperatura de gelificación del agar es de 45°C . El medio fundido se añade a los 100 μ L que contiene el inóculo de cada cepa sensible, se agita vigorosamente y el conjunto se vierte rápidamente sobre las placas Petri precalentadas, extendiéndolo uniformemente antes de que solidifique. De esta forma se obtienen las dobles capas conteniendo las cepas sensibles sembradas en la capa superior de manera uniforme (*top agar*) (figura 4). Por último, las dobles capas se guardan a 4°C hasta el momento de su uso.

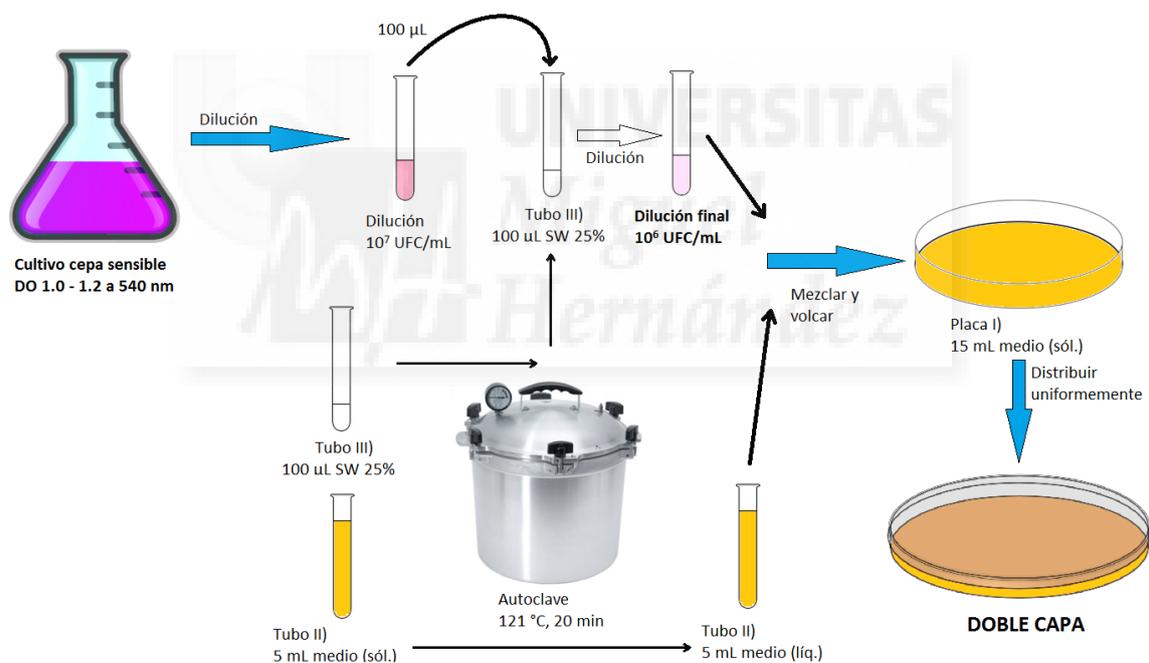


Figura 4: Esquema de la preparación de las dobles capas.

4.6. Detección de la actividad inhibitoria de las muestras

Para medir la actividad de las diferentes muestras conteniendo halocina L8 se utilizaron dos métodos basados en la técnica de doble capa.

4.6.1.a) Método de las diluciones dobles: cálculo de las UA/mL

Este procedimiento es el método estándar utilizado para calcular las Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL) de halocina presente en una disolución (Meseguer y R.Valera, 1985, Torreblanca et al., 1989; Platas et al., 2002), una unidad de medida de inhibición de crecimiento por halocinas.

A partir de las muestras conteniendo halocina se realizaron diluciones dobles seriadas, tal y como se indica en el esquema (figura 5). Como diluyente se utilizó SW 25% para aquellas muestras conservadas en sales, y agua destilada para las muestras dializadas frente a este diluyente. Seguidamente se utilizaron dobles capas con *H. salinarum* NRC 817 como cepa sensible, y se depositaron 50 μ L de cada una de las diluciones directamente sobre el agar. Estas placas se dejaron a temperatura ambiente (20-23 $^{\circ}$ C) y oscuridad durante 24 horas, para que la halocina difundiera completamente en el medio antes del crecimiento del microorganismo sensible. Posteriormente se incubaron a 37 $^{\circ}$ C durante 6-7 días, al cabo de los cuales se pudo observar la presencia o ausencia de halos de inhibición.

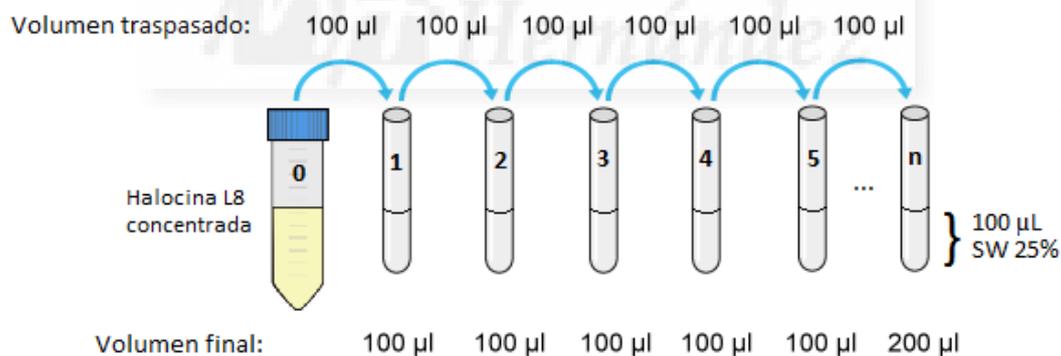


Figura 5: Dilución doble seriada.

La actividad inhibitoria se mide mediante Unidades Arbitrarias (UA), y se considera que posee 1 UA la menor dilución que dé lugar a una inhibición apreciable (Sahl y Brandis, 1981). Como de cada dilución se colocan 50 μ L de muestra, la menor dilución tendrá 20 UA/mL. Puesto que son diluciones dobles la anterior tendrá 40 UA/mL y así sucesivamente (figura 6).

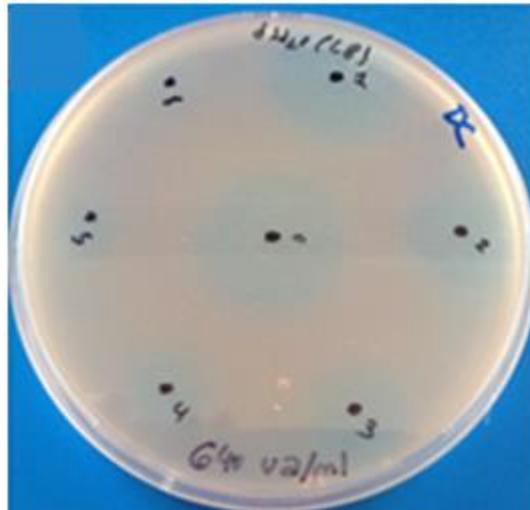


Figura 6: Doble capa con *H. salinarum* NRC 817 en la que se midió la actividad de una muestra conteniendo halocina L8 (640 UA/ml) mediante el método de las diluciones dobles.

4.6.1.b) Medición de los halos de inhibición

Se depositaron 50 μ L de cada una de las muestras de halocina directamente sobre dobles capas inoculadas con la cepa sensible *H. salinarum*, se dejaron secar a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C durante 6-7 días. Tras dicha incubación se midieron los halos de inhibición producidos.

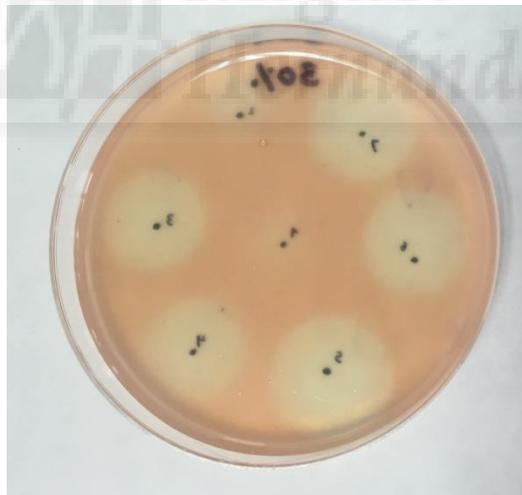


Figura 7: Doble capa de *H. salinarum* NRC 817 en la que se comprobó la actividad de halocina L8 en diferentes muestras midiendo los halos de inhibición.

4.7. Detección de fagos

Para comprobar que la inhibición del crecimiento se debía a la actividad de la halocina, y no a la presencia de virus de arqueas que formaran calvas de lisis, se diseñó un experimento para tal fin.

A partir de una doble capa en la que se habían observado los halos de inhibición, se recortó con un bisturí un pequeño cubo de agar de alrededor de 3mm³ de uno de los halos y se colocó directamente sobre una nueva doble capa de la cepa sensible, incubándose a 37°C durante 5-7 días.

Si el efecto inhibidor fuese debido a la presencia de arqueófagos, volveríamos a detectar inhibición del crecimiento alrededor de la zona donde se colocó el agar.

4.8. Estudios realizados con la cepa productora

4.8.1. Detección de actividad halocina intracelular

Para detectar la posible presencia de actividad halocina intracelular, se tomó 1 mL de un cultivo de la cepa productora, al final de la fase exponencial de crecimiento, y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y las células se lisaron resuspendiendo el pellet en 1.5 mL de agua destilada estéril. Finalmente se volvieron a centrifugar y el sobrenadante se filtró con filtros de 0.20 µm (CHMLAB) de tamaño de poro con el fin de eliminar posibles restos celulares. Una vez filtrado, se observó la actividad colocando 50 µL sobre dobles capas inoculadas con la cepa sensible de *H. salinarum* NRC 817.

4.8.2 Producción de halocina L8 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales.

Se utilizaron 4 medios de cultivo líquidos (100 mL) con diferente proporción de la base de SW (15%, 20%, 25% y 30%), adicionando extracto de levadura al 0,5%, y ajustando el pH final a 7.2.

Estos medios se inocularon con 1 mL de cultivo de L8 en fase exponencial y se llevaron a incubar a 37°C con agitación orbital (115 rpm). Se tomaron muestras de 1 mL dos veces al día durante 5 días. Cada una de las muestras se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, separando el sobrenadante del precipitado celular. El sobrenadante fue esterilizado por filtración mediante filtros de 0,20 µm de tamaño de poro. Hasta el momento de su uso, fueron conservadas en congelación a -20°C.

Al final del ensayo, 50 μL de cada una de las muestras obtenidas se añadieron sobre dobles capas de la cepa sensible y se incubaron a 37°C durante 5-7 días, tras los cuales se midieron los halos de inhibición.

4.9. Producción y obtención de halocina L8 a gran escala

Con el fin de obtener una producción a mayor escala de la halocina L8, se prepararon 3 litros de medio de cultivo conteniendo una base de SW 20% y 0,5% de extracto de levadura a pH 7.2. El medio se esterilizó en el autoclave y se inoculó con 100 mL de un cultivo en fase exponencial de la cepa productora. Tras una incubación a 37°C con agitación y aireación durante 5-6 días, el cultivo alcanzó una Densidad Óptica de 3 a 540 nm.

Una vez crecido, el cultivo se hizo pasar a través de un sistema de ultrafiltración tangencial Pellicon de Millipore (figura 8) utilizando diferentes filtros con distinto tamaño de poro.



Figura 8: Ultrafiltrador tangencial con su montaje, utilizado en los experimentos de filtración de grandes volúmenes de cultivo.

En primer lugar utilizamos filtros de 0,45 μm de tamaño de poro con el fin de eliminar las células. De los tres litros de cultivo iniciales, se obtuvieron aproximadamente 0,2 L de un precipitado celular correspondiente a la biomasa celular de arqueas, y 2.8 litros de sobrenadante.

El sobrenadante obtenido se filtró a través de ultrafiltros de 100 KDa, para eliminar moléculas de gran tamaño, como exopolisacáridos que producen en gran cantidad la arqueas halófilas extremas.

El filtrado obtenido se hizo pasar a través de nuevos ultrafiltros, ahora con un tamaño de poro de 10 KDa, hasta obtener un volumen final de concentrado de 100 mL. A continuación, y utilizando los mismos filtros, estos 100 mL fueron dializados frente a agua destilada con el fin

de eliminar todas las sales presentes en el medio. Posteriormente el dializado se esterilizó con filtros de membrana de 0,20 μm para eliminar posibles contaminantes.

Debido a la imposibilidad de seguir concentrando con el sistema Pellicon hasta volúmenes menores, se procedió entonces a liofilizar la muestra. Esta se conservó en tubos Falcon a -80°C durante 24 horas para asegurar su total congelación. Posteriormente se llevó a un liofilizador (Telstar Cryodos-80), y una vez finalizado el proceso se resuspendió el producto seco en 1.5 mL de agua destilada estéril.

En cada uno de los pasos descritos se comprobó la presencia o ausencia de halocina L8 mediante los métodos descritos en el apartado 4.6.1.

En todos los casos, los sobrenadantes con las halocinas se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.10. Estabilidad de la halocina L8 frente a la proteinasa K

Para confirmar la naturaleza proteica de la halocina L8, un extracto con actividad inhibitoria conteniendo 320 UA/mL, fue sometido a la acción de una proteasa, la proteinasa K (EC 3.4.21.64).

Para ello se preparó una solución stock que contenía 20 mg/mL de proteinasa K en un tampón Tris HCl 10 mM a pH 8, con 5 mM de EDTA y 50 mM de NaCl.

Se utilizó una muestra de halocina semipurificada con 320 UA/mL y se realizaron cuatro ensayos diferentes:

- a) 200 μL Halocina L8 + 0,5 μL de la solución stock de proteinasa K (concentración final del enzima 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- b) 200 μL Halocina L8 + 0,5 μL de agua destilada, como control negativo.
- c) 200 μL Halocina L8 + 0,5 μL del tampón sin el enzima, para descartar un posible efecto inhibitorio que dicho tampón pudiera tener sobre las células sensibles.
- d) 200 μL agua destilada + 0,5 μL de la solución stock de Proteinasa K, para comprobar el efecto que el enzima por sí solo puede tener sobre las células sensibles.

Tras 1 hora de incubación a 37°C , se midió la actividad inhibitoria de cada uno de los ensayos mediante el método de las diluciones dobles (apartado 4.6.1.a).

4.11. Estudio del efecto de la halocina L8 en cultivos bacterianos

Para estudiar las posibles aplicaciones biomédicas de la halocina L8 se realizaron experimentos de actividad de esta proteína sobre el crecimiento de bacterias. Como modelo de estudio se usaron la cepas no patógenas: *Streptococcus pneumoniae* R6 y *Bacillus* sp CECT40. Se dispusieron cultivos líquidos en crecimiento exponencial a 37°C y se realizó un seguimiento del mismo hasta el comienzo de la fase de muerte, tomando muestras cada 10 minutos en el caso del estreptococo y cada 15 minutos en el caso de *Bacillus*. De cada muestra se midió la absorbancia (Densidad Óptica) a 550 nm. En paralelo se tomaron muestras para microscopía como se describe en el apartado 4.4. A los cultivos control sin halocina se les añadió el mismo volumen de agua destilada que de L8 y los experimentos fueron realizados por duplicado.



5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Selección de la cepa sensible

En un principio se seleccionaron dos cepas de arqueas halófilas como candidatas para ser utilizadas como indicadoras de la actividad de la halocina L8, *Halobacterium salinarum* NRC 817 y *Haloarcula californiae* ATCC 33799. La primera, por ser la cepa más ampliamente utilizada como sensible en varios trabajos previos con otras halocinas (*Torreblanca et al.*, 1989, *Platas et al.*, 1996), y la segunda, *Haloarcula californiae* ATCC 33799, porque resultó ser una de las más sensibles a la halocina L8 (*Pastor, A.*, 2014).

Tras varios ensayos realizados con ambas cepas, se optó por la utilización de *Halobacterium salinarum* NRC 817, debido básicamente a dos motivos. En primer lugar, y a pesar de observarse inhibición de crecimiento en las dobles capas de *Haloarcula californiae*, este crecimiento era mucho más lento, pudiendo tardar hasta dos semanas para observar algún resultado, frente a los 5-6 días observados con *H. salinarum*. Una posible explicación a este hecho podría deberse a que, como publicaron *Tanaka* y colaboradores en 2014, la preparación de los medios de cultivo con agar puede inhibir o retardar el crecimiento de muchos microorganismos. Esto es debido a que cuando se autoclavan juntos el fosfato y el agar para preparar un medio sólido generan compuestos tóxicos, entre ellos el peróxido de hidrógeno, que pueden llegar a inhibir el crecimiento microbiano.

En segundo lugar, los halos de inhibición que aparecían en las dobles capas preparadas con la cepa *H. californiae* 799 eran mucho menos nítidos que los observados con la cepa *H. salinarum* NRC 817.

5.2. Ausencia de fagos en los extractos de halocina L8

La actividad inhibitoria que no está relacionada con bacteriófagos no puede ser transferida de un halo de inhibición presente en una doble capa de la cepa sensible a otra doble capa indicadora (*Gratia*, 1925).

Por ello era necesario confirmar que la inhibición observada con extractos de halocina L8 no era debida a la presencia de arqueófagos. Después de transferir un trozo de agar procedente de un halo de inhibición a otra doble capa con la misma cepa sensible, no se observó inhibición del crecimiento alrededor del mismo.

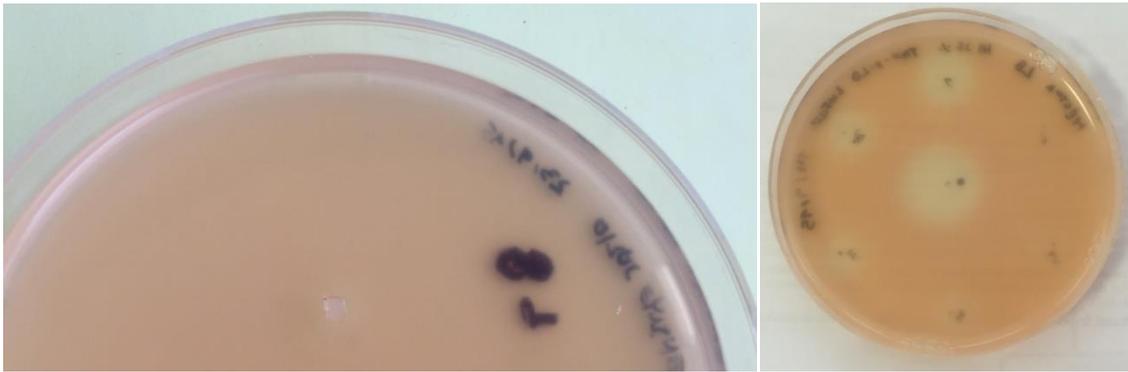


Figura 9: (izquierda) Cubo de agar con halocina adsorbida, colocado sobre una doble capa inoculada con *H. salinarum*. El crecimiento alrededor del cubo tras 7 días indica la ausencia de fagos de arqueas. (derecha) Comparación con una inhibición convencional en forma de halos, debida a la halocina L8.

5.3. La halocina L8 no es intracelular

La mayoría de las bacteriocinas son liberadas al exterior celular y obtenidas del sobrenadante de los cultivos de las cepas productoras. Sin embargo algunas son retenidas total o parcialmente en el interior de las células y es necesario romperlas para extraer dichas bacteriocinas (Nomura, 1967).

En nuestro caso, no se detectó actividad inhibitoria alguna en extractos obtenidos a partir de células lisadas de cultivos de la cepa productora, cuando eran aplicados sobre dobles capas de la célula sensible.

5.4. Producción de halocina L8 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales

Dado que las haloarqueas crecen a elevadas concentraciones de sal, es importante estudiar la influencia que esta variable posee en la síntesis de la actividad antimicrobiana. Estudios previos con otras halocinas han demostrado que al crecer la cepa productora en las condiciones óptimas de salinidad, se potencia igualmente la producción de halocina.

Con esta finalidad, se utilizaron medios con diferentes concentraciones de sales (15%, 20%, 25% y 30%) con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de crecimiento y disponer de la mayor cantidad de biomasa productora de halocina.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, y las células se crecieron hasta alcanzar el final de la fase estacionaria.

Sin embargo, para elegir la salinidad óptima a la que realizar los experimentos de producción a gran escala, decidimos no basarnos solo en el dato de una mayor biomasa ya que podría darse el caso de que la producción de halocina se viera favorecida en condiciones que no fueran tan óptimas para el crecimiento del microorganismo. Por ello, también estimamos

oportuno comprobar si a mayor concentración celular existía también una mayor concentración de halocina, o por el contrario, no había tal proporcionalidad entre la producción de halocina y la cantidad de biomasa.

Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11.

En la primera figura podemos comprobar que, con la composición del medio empleada en los ensayos, la producción de actividad halocina es proporcional a la concentración celular, y bastante estable a la variación de la concentración de sales del medio. Cuanto mayor es la densidad óptica del cultivo, mayor cantidad de halocina se obtiene.

En segundo lugar, los datos obtenidos con estos ensayos (figura 11) demuestran que se obtiene un mejor crecimiento y por ello una mayor producción de actividad inhibitoria (mayor diámetro de los halos de inhibición) cuando la concentración de sales del medio se encuentra entre el 15% y el 20% (siendo la máxima al 15%).



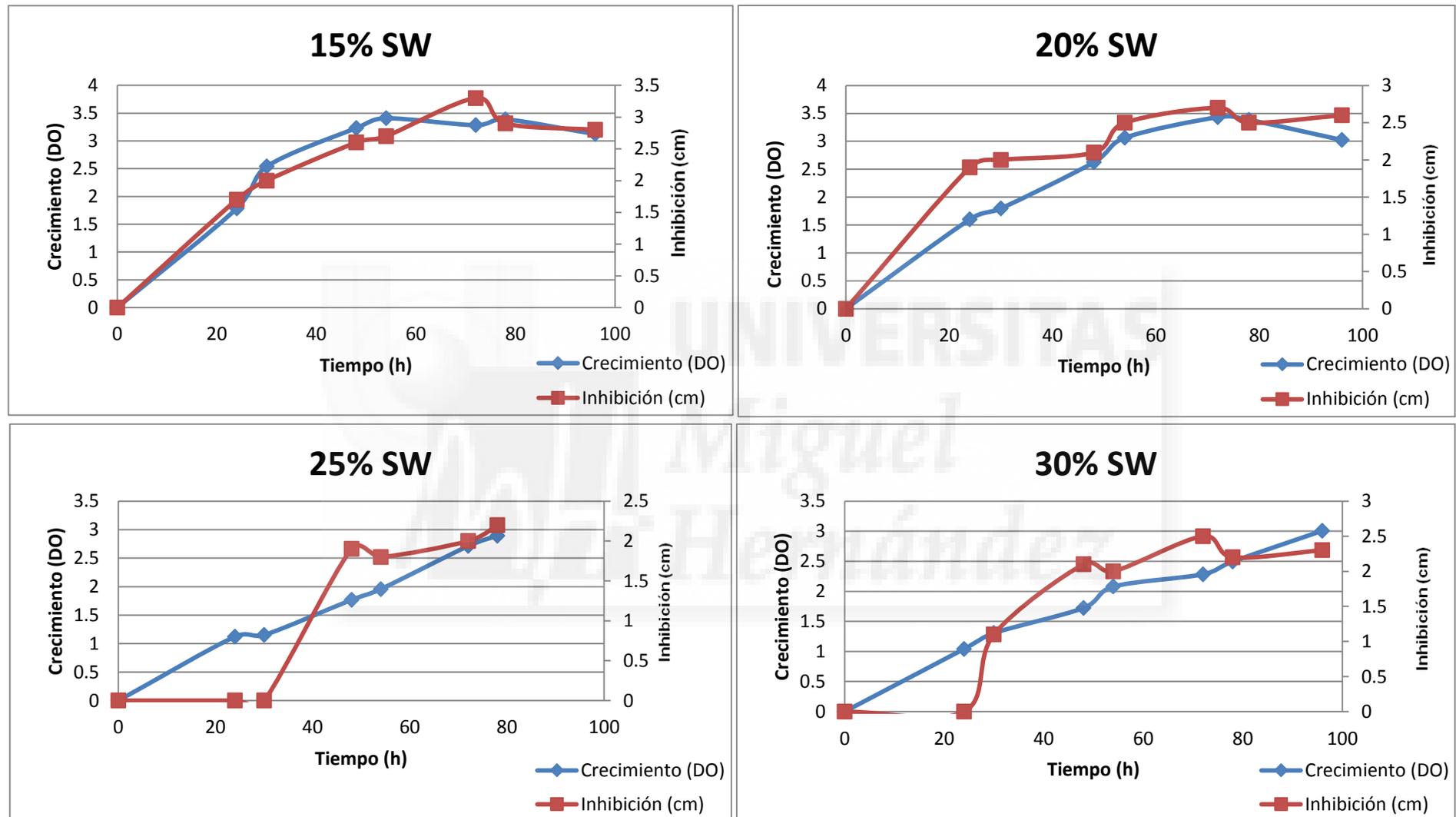


Figura 10: Curvas de crecimiento y producción de halocina L8 en función del tiempo en medios de cultivo con 15%, 20%, 25%, y 30% de sales.

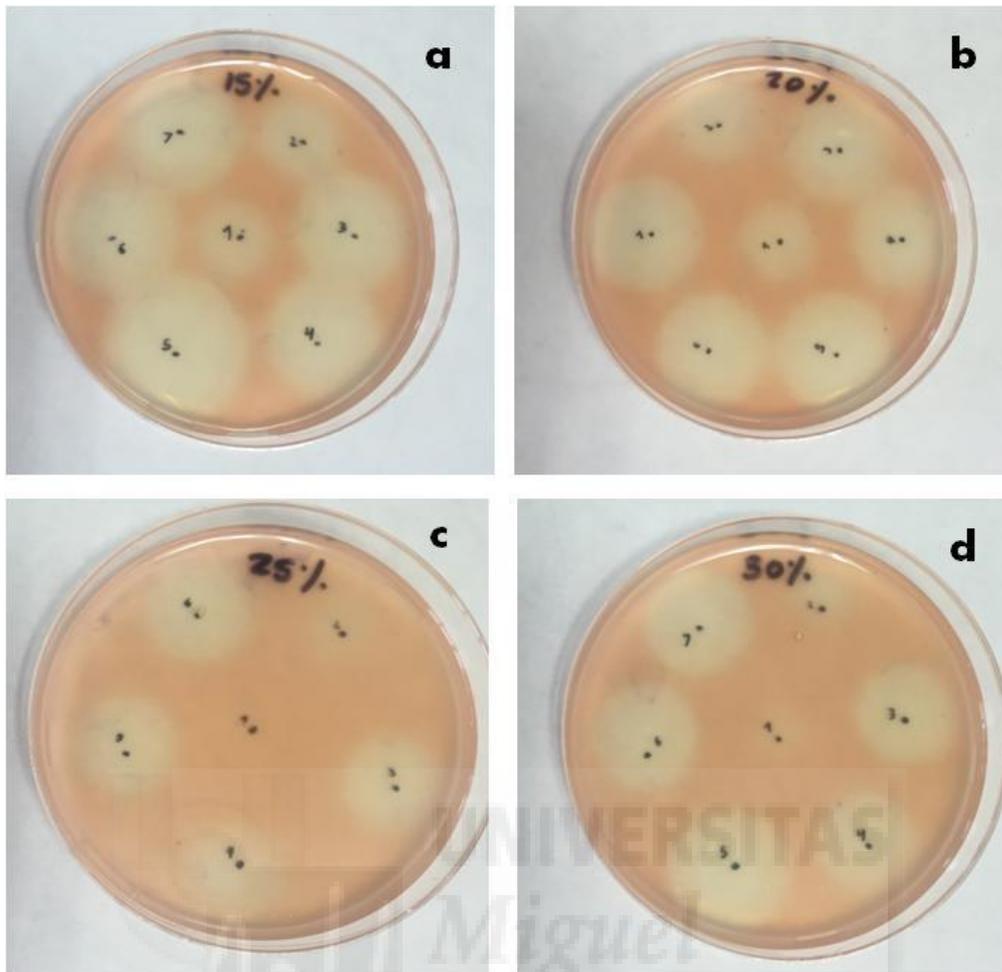


Figura 11: Dobles capas con los halos de inhibición observados en cada uno de los cuatro ensayos. **a:** 15% de sales; **b:** 20% de sales; **c:** 25% de sales y **d:** 30% de sales .

El hecho de que a concentraciones del 25% y 30% de sales se observase un crecimiento más lento así como una menor producción de halocina, se debe a que la cepa productora pertenece al género *Haloferax*, una haloarquea cuyo crecimiento óptimo se encuentra entre el 12-15% de sales.

Para la obtención de halocina L8 a mayor escala, optamos por una concentración salina del 20%, a pesar de que la cepa productora crece más rápido al 15%, ya que la contaminación de los medios por hongos es más frecuente al disminuir la concentración de sales. Por otro lado, la actividad inhibitoria obtenida en un medio con un 15% de sales es muy similar a la producida con el 20% de sales.

5.5. Obtención de halocina L8 a gran escala

En este punto del trabajo lo que se pretendía era obtener un sobrenadante conteniendo la halocina L8, en suficiente cantidad como para ser utilizada en ensayos posteriores.

Para ello se crecieron tres litros de cultivo de la cepa productora al 20% de sales hasta alcanzar una DO de 3,2. A continuación se llevó a cabo el proceso de concentración/semipurificación como se ha descrito en el apartado 4.8.

Tras la primera etapa consistente en la eliminación de las células mediante filtros de membrana de 0,45 μm , obtuvimos un sobrenadante que poseía una actividad de 20 UA/mL. Aunque esta actividad es bastante baja comparada con la que se obtiene con otras halocinas estudiadas (*Meseguer et al.*, 1985; *Torreblanca et al.*, 1989; *Platas et al.*, 1996), es conocida la influencia de los medios de cultivo en la producción de metabolitos secundarios. En algunos casos el cambio de los componentes de un medio de fermentación puede aumentar en 20 veces el rendimiento en la producción de un determinado metabolito (*Nallin-Omstead*, 1993). Para futuros estudios sería conveniente plantear una optimización del medio de cultivo con el fin de obtener mayores concentraciones de halocina L8.

No obstante, como disponíamos de un volumen final de sobrenadante de 2,8 litros, teníamos un total de 56000 UA, cantidad suficiente para continuar con el proceso de enriquecimiento.

El sobrenadante se hizo pasar primero a través de ultrafiltros tangenciales de 100 KDa de tamaño de poro, y se comprobó que la actividad de la halocina se encontraba en el permeado. A continuación, éste se pasó a través de ultrafiltros tangenciales de 10 KDa observándose que la actividad se encontraba en el retenido, lo cual indica que la halocina L8 tiene un tamaño comprendido entre 10 y 100 KDa. El volumen del retenido fue de 100 mililitros con una actividad de 80 UA/mL, lo que significa que disponíamos de un total de 8000 UA.

Es importante destacar la pérdida de más de un 85% de la actividad total al hacer pasar la muestra a través de los ultrafiltros de 10 KDa. Este tipo de filtros están compuestos por ésteres de celulosa y está descrito, incluso por el propio fabricante, que su composición puede provocar una adsorción inespecífica de proteínas. Por ello es recomendable utilizar filtros de baja adsorción, aunque sean más caros. En nuestro caso, los filtros disponibles eran normales en el caso de los de 10 KDa y de baja adsorción en el caso de los de 100 KDa. Si comparamos el rendimiento del proceso tras utilizar cada tipo de filtro, podemos afirmar que efectivamente, la importante pérdida de actividad al utilizar los filtros de 10 KDa puede deberse a la adsorción de la halocina a dichos filtros.

Finalmente, el retenido fue dializado con el fin de eliminar todas las sales presentes en el extracto. Tras la diálisis se obtuvo un concentrado de alrededor de 40 mL con una actividad de 160 UA/mL (6400 UA totales).

Para poder utilizar la halocina en ensayos con otros tipos de células, necesitábamos tenerla más concentrada. Por ello la muestra se liofilizó y se recogió en un volumen final de 1,5 mL obteniendo una actividad final de 3200 UA/mL (4800 UA totales).

En la figura 12 se expone el diagrama de flujo y el rendimiento de cada uno de los pasos seguidos en este proceso.

Una vez analizados los resultados obtenidos en este ensayo, podemos concluir que para futuros procesos de producción de halocina L8 sería necesario, por un lado, optimizar la composición del medio de cultivo para obtener mayores concentraciones de halocina a partir del cultivo inicial, y por otro, utilizar siempre filtros de baja adsorción para evitar pérdidas del producto, pues la ultrafiltración es un método rápido y sencillo que permite procesar volúmenes grandes y concentrarlos en cuestión de horas.



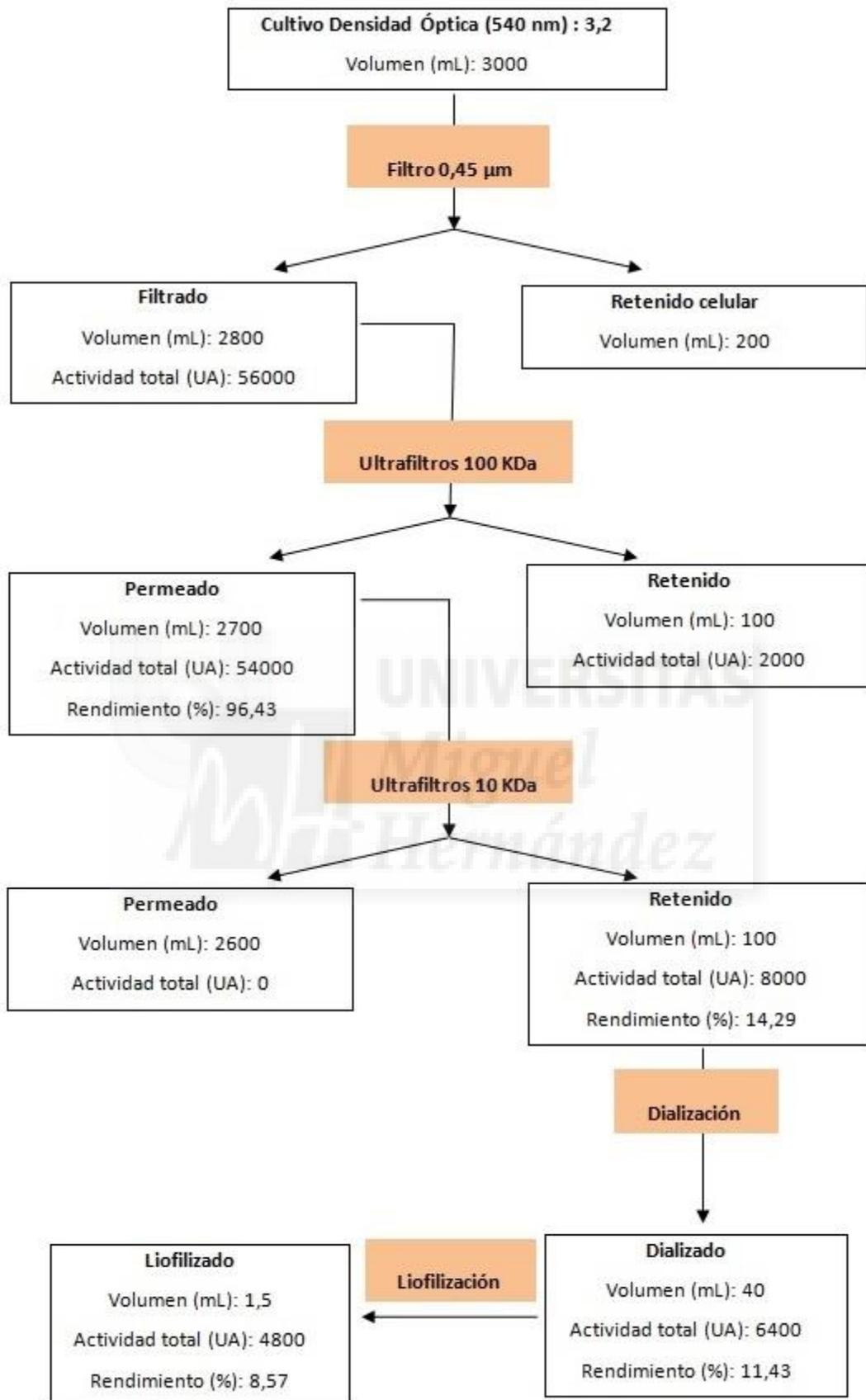


Figura 12: Esquema del proceso de obtención a gran escala de halocina L8 y rendimiento del mismo.

5.6. La halocina L8 es sensible frente a la proteinasa K

Las halocinas se definen como péptidos o proteínas con capacidad antimicrobiana sobre cepas relacionadas con la productora. Por ello, y para demostrar la naturaleza proteica de la halocina L8, se decidió someterla a la acción de una proteasa, la proteinasa K.

El ensayo se realizó con tres controles diferentes según se describe en el apartado 4.10. Los resultados se muestran en la figura 13.

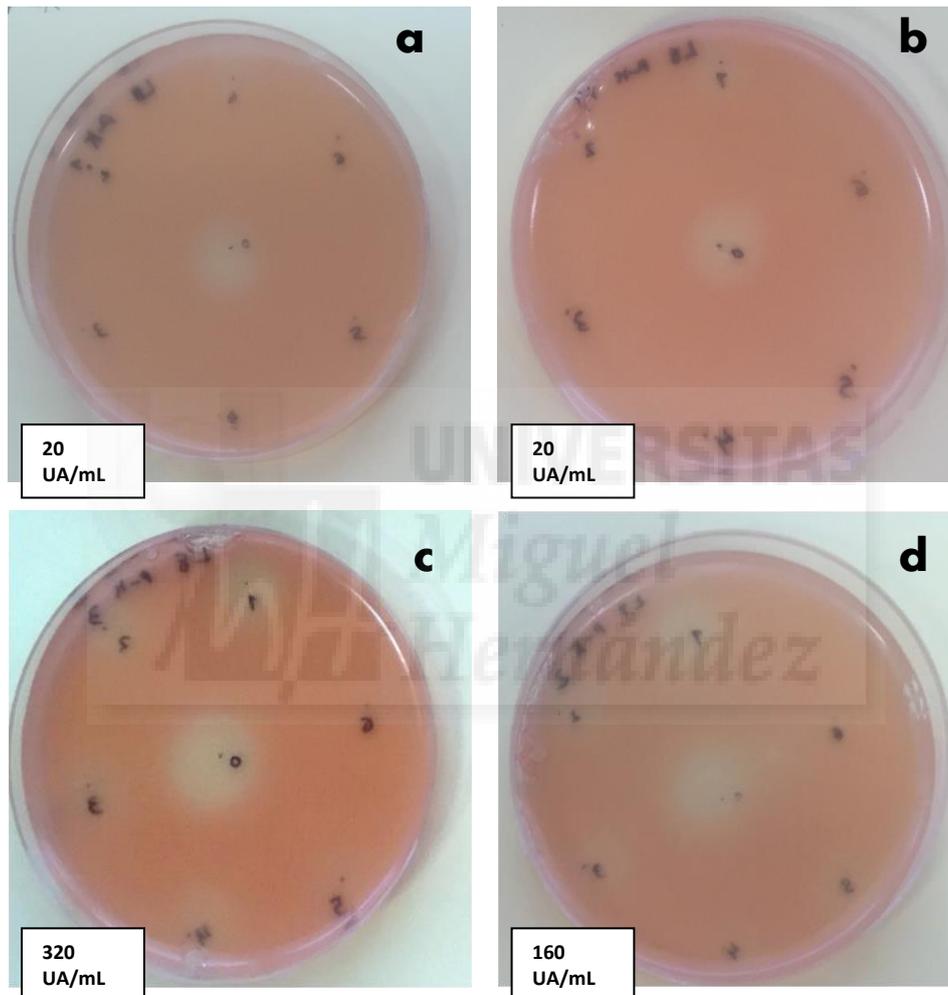


Figura 13: Efecto de la proteinasa K sobre un extracto semipurificado de halocina L8 conteniendo 320 UA/mL. a) Halocina tratada con proteinasa K. b) Control sólo con proteinasa K en su tampón. c) Control negativo con halocina y agua destilada. d) Control con halocina y el tampón de la enzima.

Durante el ensayo, las muestras de halocina L8 empleadas conteniendo 320 UA/mL (figura 13c, control negativo) mantuvieron toda su actividad.

A la vista de los resultados, cabe destacar varias consideraciones:

En primer lugar, la Proteinasa K ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa sensible (figura 13b).

En segundo lugar, la proteinasa K degrada por completo la halocina, ya que el extracto con actividad tratado con esta proteasa (figura 13a) posee la misma actividad que el control en el que solo estaba presente el enzima (figura 13b).

En tercer lugar, los agentes quelantes empleados en el buffer salino no tienen efecto inhibitor alguno sobre la cepa sensible (figura 13d). Sin embargo observamos que la actividad de la halocina se reduce a la mitad, lo que nos podría estar indicando una parcial degradación de L8.

Por todo ello, podemos afirmar que la actividad inhibitoria se debe a una(s) sustancia(s) de naturaleza proteica. Para poder determinar si se trata de una única proteína, se deben realizar estudios de purificación de proteínas (cromatografías, HPLC, electroforesis) que no han podido ser llevados a cabo en este trabajo.

5.7. Estudio de la halocina L8 como sustancia antibacteriana

Como se ha mencionado en la Introducción, la halocina L8 ya ha mostrado tener un efecto sobre el crecimiento en medio sólido de *Bacillus* sp (Pastor, A., 2014). En base a estos resultados preliminares, se diseñaron experimentos para ver si dicha halocina tenía efecto sobre el crecimiento en medio líquido de esta misma cepa bacteriana, y además, aprovechando que Manuel Sánchez (codirector del TFG) posee un proyecto de investigación sobre búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas contra *Streptococcus pneumoniae*, se decidió examinar la acción de la halocina L8 frente a dicha bacteria.

5.7.1. Efecto sobre *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos que afectan a la humanidad y hay un gran interés en buscar sustancias que puedan ejercer un efecto bactericida sobre dicha bacteria. Los cultivos de la cepa avirulenta R6 son muy sencillos de manejar en el laboratorio y por ello se decidió estudiar el efecto de la halocina L8 sobre su crecimiento y si provocaba alteraciones en su morfología. En condiciones óptimas la bacteria *S. pneumoniae* crece durante la fase exponencial formando diplococos y cadenas cortas de cuatro células. Según se va aproximando a la fase estacionaria las cadenas se hacen más largas. En la fase estacionaria el crecimiento cesa, pero en el caso de *S. pneumoniae* sucede un fenómeno muy llamativo. Otras bacterias pueden permanecer durante largos periodos en un estado latente antes de llegar a lo que se llama la fase de muerte, pero en *S. pneumoniae* al cabo de unas pocas horas se activan una serie de autolisinas que producen que el cultivo primero sedimente y luego muera de manera muy rápida. Este comportamiento se traduce en una disminución de la turbidez del cultivo. La explicación de este comportamiento tiene que ver con la virulencia del microorganismo: la autólisis generaría una gran cantidad de endotoxinas que interferirían con la respuesta inmune

del hospedador (Martner *et al.* 2009). En el caso del trabajo aquí presentado, este comportamiento tiene la ventaja de que podemos observar el efecto de una sustancia en cualquiera de las fases de crecimiento de un microorganismo.

Utilizando cultivos en crecimiento exponencial de *S. pneumoniae* se añadió halocina L8 (80 UA/mL) cuando la D.O.₅₅₀ del cultivo era de 0,1. Posteriormente se midió la Densidad Óptica de los cultivos cada 10 minutos hasta que alcanzaron la fase de muerte (figura 14). Al mismo tiempo se tomaron muestras cada 30 minutos para su observación al microscopio:

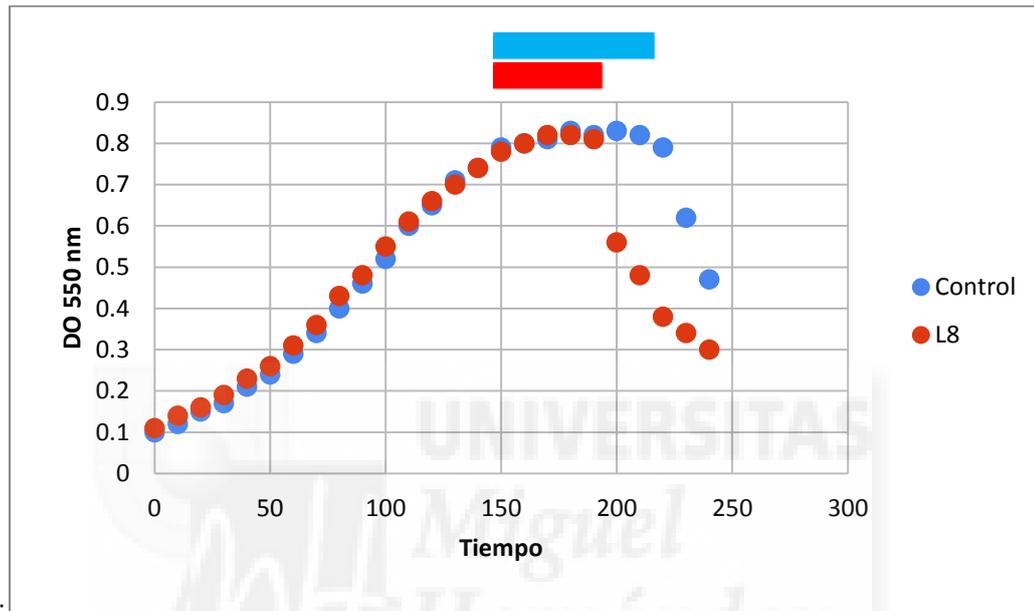


Figura 14: Influencia de la halocina L8 sobre el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*. Azul: control sin halocina. Rojo: Cultivo con 80 UA/mL de halocina L8. Las barras superiores indican la duración de la fase estacionaria de cada uno de los cultivos.

Se observó que la halocina no afectó a la velocidad de crecimiento del microorganismo durante la fase exponencial. En cambio, sí se observaron diferencias en la duración de la fase estacionaria cuando L8 estaba presente. Mientras que en el cultivo control la fase estacionaria era de unos 70 minutos, en los cultivos tratados ese tiempo disminuía hasta los 40 minutos (40% de reducción).

Por otro lado, la observación microscópica mostró que la acción de la halocina L8 provocaba la aparición temprana de largas cadenas de neumococo (figuras 15 b y d) que iban agregándose hasta formar flóculos celulares (figura 15 e).

La agregación de las cadenas de neumococos puede ser interesante desde el punto de vista biomédico. Una de las armas que utiliza el neumococo contra el sistema inmune es su pequeño tamaño. Pero si una sustancia favorece la formación de agregados celulares, las células inmunitarias podrían detectarlos y combatirlos de manera mucho más eficiente. Adicionalmente, hemos observado que esos agregados se mantienen incluso aunque las células hayan lisado, lo

que significa que gran parte del contenido celular que actúa como endotoxina permanece con el agregado y no se diseminaría por el organismo.

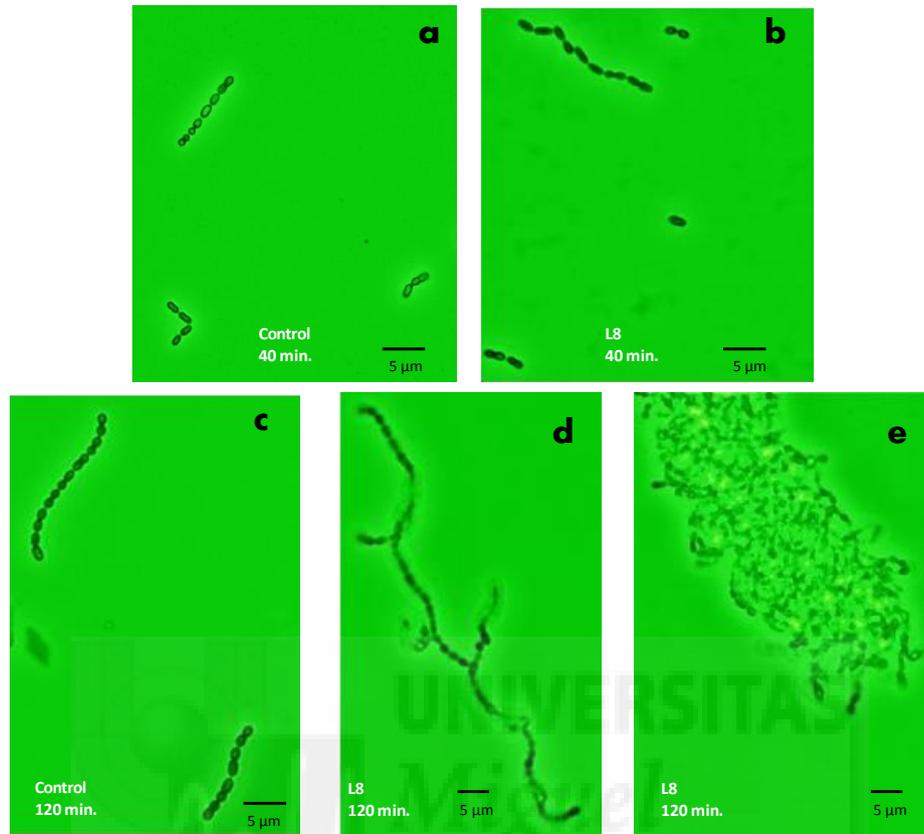


Figura 15: Microscopía óptica de un cultivo de *Streptococcus pneumoniae* (a y c sin tratar; b, d y e tratados con 80 UA/mL de halocina L8).

5.7.2. Efecto sobre el crecimiento de *Bacillus* sp

Puesto que la halocina L8 tiene un efecto concreto sobre el crecimiento de *Bacillus* sp en medio sólido, queríamos comprobar si también afectaba al crecimiento en medio líquido y/o a la morfología celular. Para ello se realizó un ensayo similar al diseñado para *S. pneumoniae*, aunque con algunas modificaciones.

Se prepararon tres cultivos y se crecieron hasta una DO_{550} de 0,1, momento en el que se añadió a uno de ellos 80 UA/mL y a otro 160 UA/mL de halocina L8, al tercer cultivo se le añadió el mismo volumen de agua destilada que de L8 para utilizarlo como control sin halocina. A partir de este momento se fueron tomando muestras cada 15 minutos de todos ellos hasta llegar al final de la fase estacionaria. En paralelo se tomaron muestras para la observación por microscopio cada 45 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16:

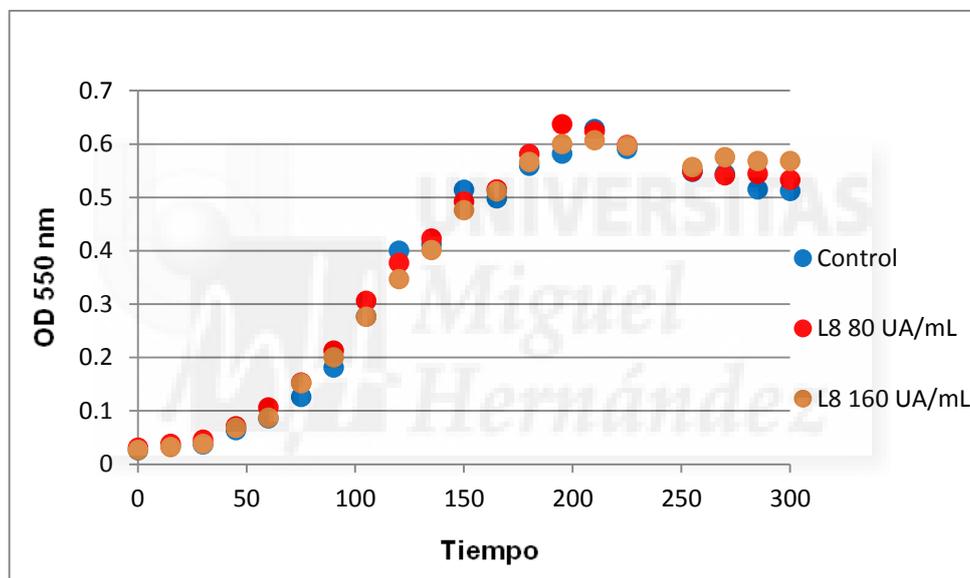


Figura 16: Efecto de la halocina L8 sobre el crecimiento de *Bacillus* sp. Azul: control sin halocina. Rojo: 80 UA/mL de halocina L8. Naranja: 160 UA/mL de halocina L8.

En este caso no se observó ningún efecto de la halocina L8 sobre el crecimiento en medio líquido de *Bacillus*, con ninguna de las dosis empleadas. Esto puede explicarse si tenemos en cuenta que muchas especies bacterianas muestran un comportamiento diferente cuando crecen en medios líquidos o en medios sólidos con agar. Es el denominado fenómeno de "swarming" o enjambamiento, dicho fenómeno se caracteriza macroscópicamente por el desplazamiento de las bacterias que forman una película sobre la superficie del medio de cultivo y se extiende hasta cubrir toda la placa (Hernández *et al.*, 1993).

En especies del género *Bacillus* se ha comprobado que este tipo de crecimiento está motivado por la aparición de células hiperflageladas y por la síntesis de una lipoproteína, la surfactina, que es un potente biosurfactante además de tener propiedades antimicrobianas. Esta

sustancia aumenta la humectabilidad de la superficie permitiendo a las células moverse con mayor facilidad para formar el enjambre. Ambos procesos se encuentran regulados por el gen *swrA* de tal forma que mutantes en este gen son incapaces de crecer en forma de enjambre (Ghelardi et al. 2012).

El hecho de que la halocina afecte a este fenómeno de enjambramiento, pero no al crecimiento de *Bacillus* en un medio líquido, nos hace pensar que L8 podría estar alterando cualquiera de los procesos que desencadenan dicha respuesta celular.

Además, la observación al microscopio no mostró ninguna diferencia morfológica entre las células control y las tratadas con la máxima concentración de halocina L8 (figura 17):

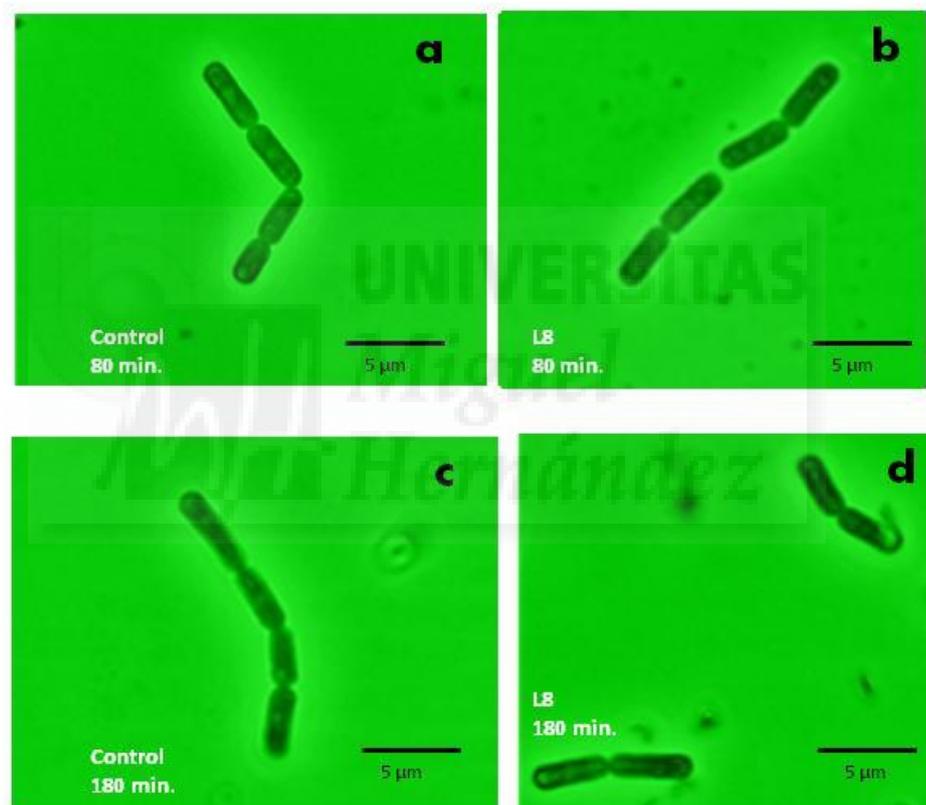


Figura 17: Microscopía óptica de células de *Bacillus sp* a diferentes tiempos en cultivos sin tratamiento (**a** y **c**) sin tratar, o tratados con 160 UA/mL de halocina L8 (**b** y **d**).

6.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

CONCLUSIONES

1. La actividad inhibitoria del sobrenadante que se extrae de los cultivos de *Haloferax* sp cepa L8 es debida a la presencia en el sobrenadante de una(s) sustancia(s) de naturaleza proteica, y que hemos denominado halocina L8.
2. La actividad inhibitoria del sobrenadante que se extrae de los cultivos de *Haloferax* sp cepa L8 no es debida a la acción de posibles arqueófagos.
3. No hemos encontrado actividad inhibitoria intracelular en cultivos de *Haloferax* sp cepa L8.
4. La producción de halocina L8 es bastante estable a las variaciones de la concentración de sales del medio.
5. La actividad inhibitoria es debida a proteína(s) con un peso molecular comprendido entre 10 y 100 KDa. Se hace necesario optimizar la producción a gran escala de esta halocina, sobre todo en los procedimientos de purificación.
6. La halocina L8 tiene un efecto sobre la duración de la fase estacionaria en cultivos líquidos de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Al microscopio la halocina L8 produce un efecto de agregación, llegando a formarse grandes flóculos celulares.
7. La halocina L8 no tiene efecto sobre el crecimiento ni la morfología celular de *Bacillus* sp cuando se cultiva en un medio líquido.

PROYECCIÓN FUTURA

El estudio aquí presentado es una etapa dentro de un proyecto de mucho más recorrido. Como se ha indicado en la Introducción, las halocinas han mostrado ser activas frente a diversos tipos de seres vivos, desde bacterias a células eucariotas. También se ha comentado el precedente de que la halocina H7 tiene un efecto farmacológico sobre las células eucariotas al bloquear la acción del intercambiador Na^+/H^+ . Estos hechos convierten a las halocinas en sustancias muy atractivas desde el punto de vista biotecnológico. Con dichos antecedentes en mente, se cedieron unas muestras de halocina L8 al grupo de investigación oncológica liderado por el Dr. Miguel Saceda para comprobar si dicho compuesto ejercía alguna acción sobre diversas líneas células tumorales. En los ensayos realizados en el laboratorio del Dr. Saceda se encontró que la halocina L8 parecía tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon SW620 (figura 18). A pesar de desconocer cuál es el mecanismo que explica este resultado preliminar, el mismo es lo suficientemente interesante como para intentar explorar este nuevo camino en futuros trabajos.

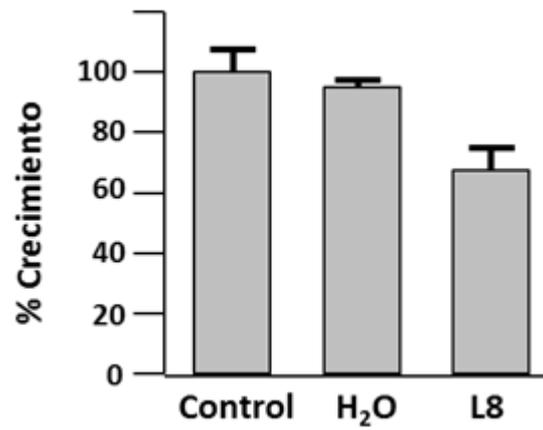


Figura 18: Efecto de la halocina L8 sobre el crecimiento de la línea de cáncer de colon SW620. Puede observarse una disminución significativa en los cultivos tratados cuando se comparan con los cultivos no tratados o con aquellos a los que se ha añadido agua.



7.- BIBLIOGRAFÍA

- Alberola, A.** Chorro, F.J., Torreblanca, M., Meseguer, I., Soria, B., Moya, A., Llavador E. and Such, L. 1999. *Effects of the Na⁺/H⁺ exchange inhibition with halocin H7 on chronotropism and atrial, AV nodal and ventricular refractoriness: a study on isolated rabbit heart.* Journal of Physiology and Biochemistry. **55**: 256.
- Bams, S.M.,** Delwiche, C.F., Palmer, J.D. y Pace, N.R. 1996. *Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophily from environmental rRNA sequences.* Proc. Natl. Acad. Sci USA **93**: 9188-9193.
- Boone, David R.,** Castenholz, Richard W. (Eds.). 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd Edition. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria.
- Brochier-Armanet, C.,** Boussau B, Gribaldo S, Forterre, P. 2008. *Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota.* Nat Rev Microbiol. **6**: 245–252.
- Brown, J. R.,** Doolittle, W. F. 1997. *Archaea and the Prokaryote to Eukaryote transition.* Microbiol. Mol. Biol. Rev., **61**: 456-502.
- Darnton, N. C.,** Turner, L., Rojevsky, S., Berg, H. C. 2010. *Dynamics of bacterial swarming.* Biophys J. **98**(10):2082-90.
- Forterre, P.,** Brochier, C. y Hervé, P. 2002. *Evolution of the Archaea.* Theor. Popul. Biol., **61**: 409-422.
- Ghelardi, E.,** Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., Senesi, S. 2012. *Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in Bacillus subtilis.* Appl Environ Microbiol. **78**(18):6540-4.
- Gratia, A.** 1925 *Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.* C. R. Soc. Biol. **93**:1040–1042.
- Harshey, R.M.** 2003. *Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal.* Annu Rev Microbiol. **57**:249-73.
- Hartmann, R.,** Sickinger, H.D. y Oesterhelt, D. 1980. *Anaerobic growth of halobacteria.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **77**: 3821-3825.
- Haseltine, C.,** Hill, T. Montalvo-Rodríguez, R., Kemper, S.K., Shand, R.F. y Blum, P. 2001. *Secreted Euryarchaeal microhalocins kill hyperthermophilic Crenarchaea.* Bacteriol. vol. **183**(1):287-291.
- Hernández, F.,** Rodríguez, E. 1993. *The swarming phenomenon of Clostridium tetani.* Rev. Biol. Trop. **41**(3B):857-9.
- Hochstein, L.I.** y Lang, F. 1991. *Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from Haloferax denitrificans.* Arch. Biochem. Biophys. **228**:380-385.
- Huber, H.,** Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. y Stetter, K.O. 2002. *A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont.* Nature. **417**:63-67.

- Hong, JK**, Kim, HJ, Cho, JC. 2014. *Novel PCR primers for the archaeal phylum Thaumarchaeota designed based on the comparative analysis of 16S rRNA gene sequences*. PLoS One. **9**(5):e96197.
- Kamekura, M.** 1998. *Diversity of extremely halophilic bacteria*. Extremophiles. **2**:289-295.
- Karthikeyan, P.**, Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. 2013: *Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon Natrinema sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India*. S. J. Biol. Sci. **2**:205-212.
- Kavitha, P.**, Lipton, A.P., Sarika, A.R., and Aishwarya, M.S. 2011. *Growth Characteristics and Halocin Production by a new Isolate, Haloferax volcanii KPS1 from Kovalam Solar Saltern (India)*. Research Journal of Biological Sciences, **6**:257-262.
- Kearns, D.B.** 2010. *A field guide to bacterial swarming motility*. Nat. Rev. Microbiol. **8**(9):634-44.
- Konisky, J.** 1982. *Colicins and other bacteriocins with established modes of action*. Ann. Rev. Microbiol. **36**:125-144.
- Kozubal, M.A.**, Romine, M., Jennings, R., Jay, Z.J., Tringe, S.G., Rusch, D.B., Beam, J.P., McCue, L.A., Inskeep, W.P. 2013. *Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high temperatura acidic iron mats in Yellowstone National Park*. **7**(3):622-34.
- Lequerica, J.L.**, O'Connor, J.E., Such, L., Alberola, A., Meseguer, I., Dolz, M., Torreblanca, M., Moya, A., Colom, F., Soria, B. 2006. *A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals*. Journal of Physiology and Biochemistry **62**(4): 253–62.
- Li, Y.**, Xiang, H., Liu, J., Zhou, M., Tan, H. 2003. *Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from Halobacterium strain AS7092*. Extremophiles. **7**(5):401–407.
- Magrum, L.J.**, Luehrsen, K.R. y Woese, C.R. 1978. *Are extreme halophiles actually bacteria?* J. Mol Evol. **11**:1-8.
- Mancinelli, R.L.** y Hochstein, L.I. 1986. *The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria*. FEMS Microbiol. Lett. **35**:55-58.
- Martner, A.**, Skovbjerg, S., Paton J.C., Wold, A.E. 2009. *Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines*. **77**(9):3826-37.
- Meseguer, I.**, Rodríguez, V.F., Ventosa, A., 1986. *Antagonistic interactions among halobacteria due to halocin production*. FEMS Microbiol. Lett. **36**(2-3), 177–182.
- Meseguer, I.**, Torreblanca, M.T., Konishi, T. 1995. *Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter by halocin H6*. J. Biol. Chem. **270**(12):6450–6455.
- Meseguer, I.** y Rodríguez-Valera, F. 1986. *Effect of halocin H4 on cells of Halobacterium halobium*. J. Gen. Microbiol. **132**:3061-3068.
- Meseguer, I.** y Rodríguez-Valera, F. 1985. *Production and purification of halocin H4*. FEMS Microbiol. Lett. **28**: 177-182.

- Montalvo-Rodríguez, R.**, López Garriga, J., Vreeland, R.H., Oren, A., Ventosa, A., Kamekura, M. 2000. *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **3**: 1065-1071.
- Nallin-Omstead, M.**, Monaghan, R.L. 1993. *Fermentation medium design: from discovery of an interesting natural product, to mass production*. In "International Conference Microbial Products as drugs: Modern methods for producing and identifying metabolites". Girton College Cambridge. September.
- Nomura, M.** 1967. Colicins and related bacteriocins. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**:257-84.
- Nunoura, T.**, Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Atomi, H., Takai, K., Takami, H. 2011. *Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group*. *Nucleic Acids Res.* **39**(8):3204-23.
- O'Connor, E.M.**, Shand, R.F. 2002. *Halocins and sulfolobocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**(1):23-31
- Oren, A.** y Mana, L. 2002. *Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium*. *Extremophyles.* **6**:217-223.
- Paši, L.**, Velikonja, B.H., Ulrih, N.P. 2008. *Optimization of the culture conditions for the production of a bacteriocin from halophilic archaeon *Sech7a**. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **38**(3):229-245.
- Pastor, A.** 2014. *Búsqueda de halocinas de interés biotecnológico con actividad antibacteriana*. Trabajo Fin de Grado en Biotecnología. Facultad CCEE. Universidad Miguel Hernández.
- Platas, G.**, Meseguer, I., Amils, R. *Optimization of the production of a bacteriocin from *Haloferax mediterranei* Xia3*. *Microbiol SEM.* 1996. **12**:75-84.
- Platas, G.**, Meseguer, I., Amils, R. *Purification and biological characterization of halocin HI from *Haloferax mediterranei* M2a*. 2002. *Int. Microbiol.* **5**:15-19.
- Price, L.B.**, Shand, R.F., 2000. *Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a*. *J. Bacteriol.* **182**:4951-4958.
- Rdest, U.**, Sturm, M. 1987. *Bacteriocins from halobacteria*. In "Protein purification: Micro to Macro". R. Burgess, ed. New York: Alan R. Liss Inc. pp. 271-278.
- Reeves, P.** 1965. *The bacteriocins*. *Bacteriol. Rev.* **29**:24-25.
- Rinke, C.**, Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, JF, Darling, A, Malfatti, S, Swan, BK, Gies, EA, Dodsworth, JA, Hedlund, BP, Tsiamis, G, Sievert, SM, Liu, WT, Eisen, JA, Hallam, SJ, Kyrpides, NC, Stepanauskas, R, Rubin, EM, Hugenholtz, P, Woyke, T. 2013. *Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter*. *Nature.* **499**(7459):431-7.
- Rodríguez-Valera, F.**, Juez, G., y Kushner, D.J. 1982. *Halocins: Salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods*. *Can. J. Microbiol.* **28**:151-154.

- Rodríguez-Valera, F.**, Ruiz-Berraquero, F. and Ramos-Cormenzana, A. 1980. *Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources*. J. Gen. Microbiol. **119**:535-538.
- Sahl, H.**, Brandis, H. 1981. *Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Microbiol. **127**:377-384.
- Shand, R.F.** y Leyva, K.J. 2007 *Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins*. In "Bacteriocins: ecology and evolution". Riley MA, Chavan MA, editors. New York, NY: Springer; pp. 93–109.
- Soppa, J.** y Oesterhelt, D. 1989. *Bacteriorhodopsin mutants of Halobacterium sp. GRB. I. The 5-bromo-2'-deoxyuridine selection as a method to isolate point mutants in halobacteria*. J Biol Chem. **264**:13043-13048.
- Spang, A.**, Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., et al. 2010. *Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota*. Trends Microbiol **18**: 331–340.
- Spang, A.**, Saw, J.H., Jørgensen, S.L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., Ettema, T.J. 2015. *Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes*. Nature. **521**(7551):173-9.
- Such, L.**, O'Connor, JE, Sáez, GT, Gil, F, Beltrán, JF, Moya, A, Alberola, A. 1999. *Flow cytometric analysis of peroxidative activity in granulocytes from coronary and peripheral blood in acute myocardial ischemia and reperfusion in dogs: protective effect of methionine*. Cytometry. **37**(2):140-6.
- Sun C.**, Li Y., Mei S., Lu Q., Zhou L., Xiang H. 2005. *A single gene directs both production and immunity of halocin C8 in a haloarchaeal strain AS7092*. Mol. Microbiol. **57**(2):537–549.
- Tagg, J.R.**, Dajani. A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Bact. Rev. **40**:722-756.
- Tanaka, T.**, Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H, Tanaka, M, Nakatsu, CH, Kamagata, Y. 2014. *A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability*. Appl Environ Microbiol. **80**(24):7659-66.
- Torreblanca, M.**, Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. 1990. *Effects of halocin H6 on the morphology of sensitive cells*. Biochem. Cell Biol. **68**:396-399.
- Torreblanca, M.**, Meseguer, I., Rodríguez-Valera, F. 1989. *Halocin H6, a bacteriocin from Haloferax gibonsii*. J. Gen. Microbiol. **135**:2655-2661.
- Torreblanca, M.**, Meseguer, I., Ventosa, A. 1994. *Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods*. Lett. Appl. Microbiol. **19**: 201-205.
- Williams, T.A.**, Foster, P.G., Cox C.J. y Embley, T.M. 2013. *An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life*. Nature. **504**:231–236.

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. I. 1990. *Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:4576-4579.

Woese, C.R., Magrum, L.J., Fox, G.E. 1978. *Archaeobacteria.* J. Mol. Evol **11**:245-252.

Woese. C.R. y Fox, G.E. 1977. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**:5088-5090.

Wolf, Y.I., Makarova, K.S., Yutin, N., Koonin, E.V. 2012. *Updated clusters of orthologous genes for Archaea: a complex ancestor of the Archaea and the byways of horizontal gene transfer.* Biol. Direct. **7**:46.

Zhang, R., Turner, L, Berg, HC. 2010. *The upper surface of an Escherichia coli swarm is stationary.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **107**(1):288-90.

