

Producción de halocina L3 y estudio de sus posibles aplicaciones biomédicas.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Autor: **Mateo Francisco Leal Ferrández**

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

Grado en Biotecnología

Área de conocimiento: Microbiología

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso 2016-2017



INDICE

1. Resumen, Abstract y Palabras Clave	3
2. Introducción	4
2.1. Dominio <i>Archaea</i> y filogenia.....	4
2.2. Arqueas halófilas extremas	8
2.3. Halocinas	9
3. Antecedentes y Objetivos.....	12
4. Materiales y Métodos	13
4.1. Microorganismos	13
4.1.1. Arqueas halófilas extremas.	13
4.1.2. Bacterias	13
4.2. Medios de cultivo y esterilización	13
4.2.1. Medios de cultivo para halófilos extremos	13
4.2.2. Medios de cultivo para bacterias	14
4.3. Condiciones de crecimiento	14
4.4. Microscopía óptica.....	14
4.5. Técnicas de cultivo en doble capa	14
4.6. Detección de la actividad inhibitoria de las muestras	16
4.6.1.a) Método de las diluciones dobles: cálculo de las UA/mL	16
4.6.1.b) Medición de los halos de inhibición	17
4.7. Detección de fagos	18
4.8. Estudios realizados con la cepa productora	18
4.8.1. Detección de actividad halocina intracelular.....	18
4.8.2. Producción de halocina L3 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales.....	18
4.9. Producción y obtención de halocina L3 a gran escala.....	19
4.10. Estabilidad de la halocina L3 frente a la proteinasa K	20
4.11. Estudio del efecto de la halocina L3 en procariotas del Dominio <i>Bacteria</i>	21
5. Resultados y Discusión	22
5.1. Selección de la cepa sensible	22
5.2. Ausencia de fagos en los extractos de halocina L3.....	22
5.3. La halocina L3 no es intracelular.....	23
5.4. Producción de halocina L3 en función del tiempo y a diferentes concentraciones de sales.....	23
5.5. Obtención de halocina L3 a gran escala.....	27
5.6. La halocina L3 es sensible frente a la proteinasa K.....	29
5.7. Estudio de la halocina L3 como sustancia antibacteriana.....	30
5.7.1. Efecto en <i>Bacillus sp.</i>	30
5.7.2. Efecto en <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
5.8. Estudio del efecto de la halocina L3 como antitumoral.....	35
6. Conclusiones y Proyección Futura.....	36
7. Bibliografía.....	37

1.- RESUMEN, ABSTRACT Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

La producción de halocinas por arqueas halófilas extremas es un hecho ampliamente atribuido a la Familia *Halobacteriaceae* (Meseguer et al. 1986; Torreblanca et al., 1994). Una de ellas, la halocina L3 producida por *Haloarcula sp* cepa L3, es una halocina no sal dependiente que ha mostrado tener 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 L3, 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 attributed feature within the *Halobacteriaceae* Family (Meseguer et al. 1986; Torreblanca et al., 1994). Among these, the L3 halocin produced by the *Haloarcula* genus L3 strain, is a nondependent salt halocin. This halocin 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 L3 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: Halocina L3, haloarqueas, halófilos extremos, antibacterianos.

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*, después analizar las secuencias del 16S rRNA de un amplio grupo de procariotas. El 16S rRNA 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 “*Archaeobacteria*” (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 anaerobios, alcalófilos y neutrófilos. Se han encontrado, además, arqueas mesófilas en diferentes ambientes como mares y suelos (Forterre, P. et al., 2002).

Por todo ello, se estableció 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*.

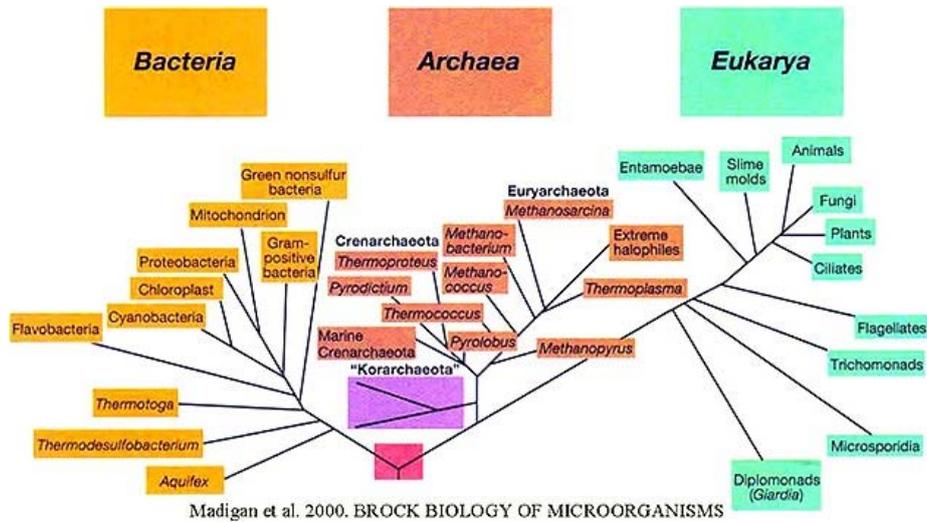


Figura 1: Árbol filogenético de los tres Dominios actuales que constituyen la vida.

Ahora bien, la propuesta "universal" de un árbol de tres dominios, basado en el RNA ribosomal y los genes esenciales involucrados principalmente en la traducción de proteínas, puede haber sido errónea, debido a la acumulación de algunas evidencias que sugieren que el Dominio *Archaea* y *Eukarya* estarían más cercanos entre sí, si se comparan con el Dominio *Bacteria* porque comparten un ancestro común que no es compartido por *Bacteria* (Williams et al., 2013).

Este árbol eocito propone *Archaea* como un grupo hermano de los eocitos, que Woese et al. (1990) llamó *Crenarchaeota*. Esto implica que, en base a un pequeño grupo de genes esenciales, solo existen dos dominios principales de la vida (*Bacteria* y *Archaea*).

En esta novedosa formulación, la hipótesis *eocito* (figura 2b), implica que uno o todos los TACK (acrónimo formado por las iniciales de los 4 filos que forman las arqueas: *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Korarchaeota*.) de *Archaea* están cercanos al linaje eucariótico nuclear, en el que un archaeon participó en los orígenes eucariotas, fundando el linaje del hospedador mediante endosimbiosis mitocondrial. Ambos árboles han sido propuestos de tener la rama bacteriana como inicio de la vida. Sin embargo, el debate de las hipótesis de los tres dominios/eocito (figura 2) permanece en controversia porque mediante diferentes métodos filogenéticos se han obtenido resultados distintos, a veces a partir de los mismos datos (Gribaldo et al., 2010).

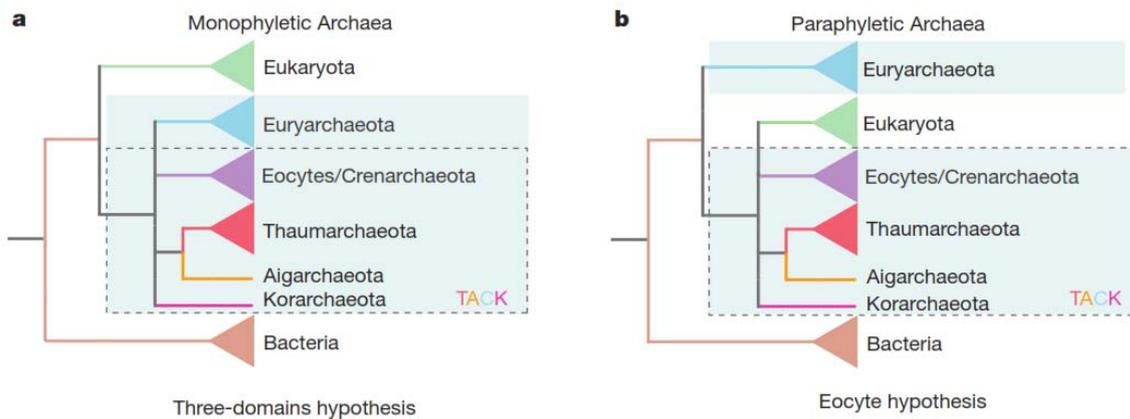


Figura 2: La hipótesis de los tres dominios y la hipótesis eocito. En **a** se observa como existen tres dominios diferenciados (*Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea*), sin embargo, en **b** se propone que el Dominio *Archaea* dio lugar al *Eukarya*. Esto supone el paso de los tres a los dos dominios, en el que el Dominio *Bacteria* se mantiene como el inicio de la vida. Además, los TACK de *Archaea* comprenden *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Korarchaeota*.

Hasta 1996, el dominio *Archaea* se componía de dos Phyla de acuerdo con los estudios de comparaciones de 16S rRNA (Woese y col., 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 y col., 2002). Dentro del segundo, el Phylum *Euryarchaeota* se encuentran microorganismos hipertermófilos, metanógenos, halófilos y metanógenos termofílicos (Brown y col., 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 y col., 1996). Posteriormente en el año 2002 (Huber y col. 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 y col. 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 y col., 2010; Jin-Kyung Hong y col., 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 3 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.

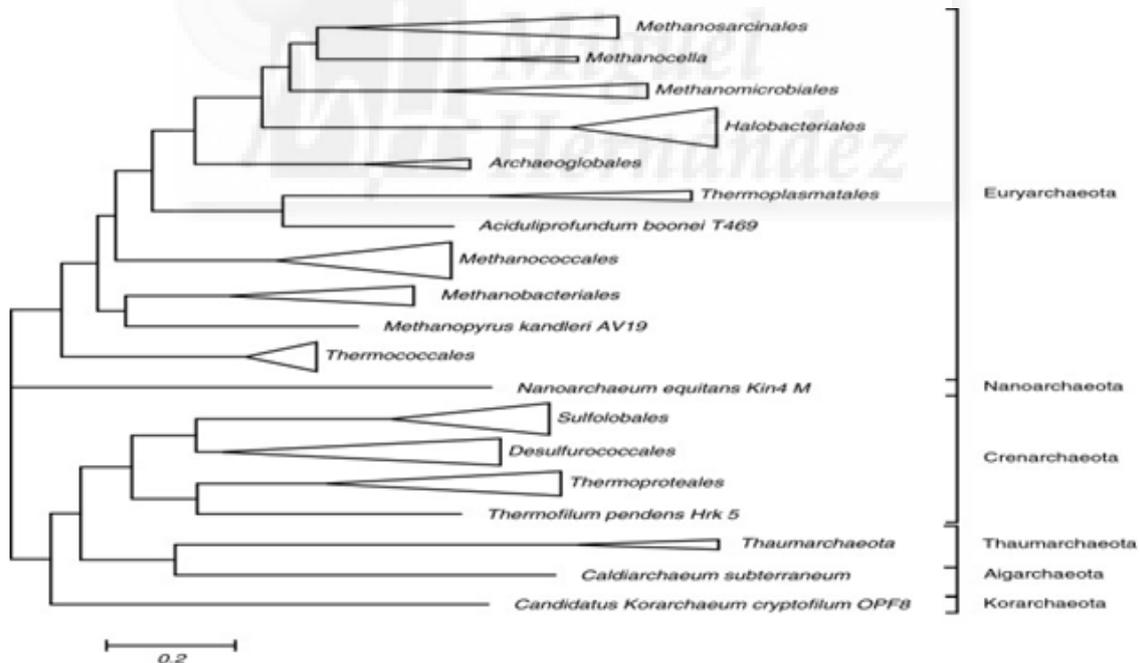


Figura 3: Filogenia del Dominio *Archaea* basado en la comparación de la secuencia de proteínas ribosómicas. Modificado por Wolf *et al.* 2012.

2.2. Arqueas halófilas extremas

Las arqueas halófilas extremas se encuentran todas ellas dentro del *Phylum Euryarchaeota* (Woese et al., 1990; Bams et al., 1996). De momento solo 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).

Para poder soportar las extremas condiciones de los medios hiperosmóticos que habitan, las haloarqueas acumulan en su citoplasma los denominados solutos compatibles que evitan la pérdida de agua intracelular. Lo más frecuente es la acumulación de K^+ , del que se han observado concentraciones de hasta casi 5 M (Larsen, 1967; Ginzburg et al., 1970; Kushner, 1985). Pero algunos estudios también muestran la presencia de haloarqueas con altas concentraciones intracelulares de Na^+ (1-2 M) y de Cl^- (alrededor de 3,5 M) (Christian y Walto, 1962). Cabe destacar que la mayoría de las proteínas intracelulares de haloarqueas son sal-dependientes, siendo activas únicamente a concentraciones salinas inusualmente elevadas, ello explica que estos microorganismos no sean capaces de crecer en ambientes con bajas concentraciones de sales.

Además de las altas concentraciones de sales de estos ambientes, también se suelen alcanzar temperaturas elevadas de hasta 60°C y el contenido en O_2 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).

Algunas de las estrategias seguidas por estos microorganismos para poder sobrevivir en medios microaerófilos y anaeróbicos son: i) formar vesículas de gas que les permitan situarse en la superficie ya que logran flotar, donde la concentración de oxígeno es mayor (Pfeifer et al., 1997). ii) utilizar aceptores de electrones alternativos en la respiración como el nitrato (Mancinelli et al., 1986; Hochstein et al., 1991; Lledó et al., 2004), tiosulfato de azufre (Tindall et al., 1986), dimetilsulfóxido (Oren et al., 1990) o fumarato (Oren et al., 1991). iii) crecer anaeróbicamente por fermentación de algunos aminoácidos (Hartmann et al., 1980). iv) comportarse como fotoheterótrofo (*H. salinarum*), obteniendo energía en forma de ATP mediante la fosforilación de ADP mediada por la proteína bacteriorrodopsina, la cual se activa por efecto de la luz (Stoeckenius et al., 1979).

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 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-Meyerhof 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).

Finalmente comentar que las cepas utilizadas en este trabajo pertenecen a los géneros *Halobacterium* 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. Además, necesitan elevadas concentraciones de Mg⁺² para su crecimiento. Por último, al género *Haloarcula* requiere 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 producidas 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 producen un desequilibrio osmótico que produce una hinchazón provocando finalmente la lisis celular de los microorganismos sensibles (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 mencionan en la tabla, los estudios realizados a nivel de gen han sido con la halocina H4 (Cheung *et al.*, 1997) y con las microhalocinas S8 (Price y Shand, 2000) y C8 (Sun *et al.*, 2005). En el caso de la halocina C8, fue la primera vez que se reportó acerca de la inmunidad contra halocinas, en el que un único gen codifica a la vez un antibiótico peptídico y una proteína inmune, dando lugar a un novedoso mecanismo inmune para los antibióticos peptídicos (Sun *et al.*, 2005). Además, también se han realizado estudios para la identificación del mRNA responsable de la producción de halocina (Cheung *et al.*, 1997; Price y Shand, 2000). Finalmente, 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, y 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 <i>et al.</i> , 1982	H1	<i>Haloferax mediterranei</i> M2a	Platas <i>et al.</i> , 1996
H3	<i>Haloarchaeon</i> sp cepa Gaa12	Rodríguez-Valera <i>et al.</i> , 1982	S8	<i>Halobacterium</i> sp cepa S8a	Price y Shand, 2000
H5	<i>Haloarchaeon</i> sp cepa Ma2.20	Rodríguez <i>et al.</i> , 1982	U1	Cepa no caracterizada	Haseltine <i>et al.</i> , 2001
H4	<i>Haloferax mediterranei</i> R4 ATCC 33500	Meseguer y Rodríguez-Valera, 1985, 1986	C8	<i>Halobacterium</i> sp cepa AS7092	Li <i>et al.</i> , 2003
R1	<i>Halobacterium salinarum</i> cepa GN101	Rdest y Sturm, 1987	Sech7a	<i>Haloferax mediterranei</i> SechA	Pāsi <i>et al.</i> , 2008
A4	<i>Halobacterium</i> sp cepa TuA4	Rdest y Sturm, 1987	KPS1	<i>Haloferax volcanii</i> KPS1	Kavitha <i>et al.</i> , 2011
H6/H7	<i>Haloferax gibbonsii</i> Ma2.39	Torreblanca <i>et al.</i> , 1989, 1990, Meseguer <i>et al.</i> , 1995	SH10	<i>Natrinema</i> sp cepa BTSH10	Karthikeyan <i>et al.</i> , 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. La halocina que producía fue denominada H7, y al estudiarse se concluyó que tenía 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 de las extrasístoles ventriculares que se producen durante el mismo, lo que llevó a plantear a los autores la posible aplicación en medicina humana. Por este motivo se patentó tanto la sustancia, un péptido de 28 aminoácidos, como sus posibles efectos clínicos en enfermedades en la que dicho intercambiador está implicado (*Torreblanca et al.*, 2004). Posteriormente se demostró que la halocina H7 inhibe también el intercambiador Na^+/H^+ de células de mamífero (*Lequerica, J.L. et al.*, 2006).

Por otro lado 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 las halocinas L3 y L8 (*Pastor, A.* 2014) demostró que en placas sembradas con *Bacillus* y tratadas con halocina, estas afectaban 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 4) 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 4: 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, varias 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), las halocinas L3 y L8 mostraron 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 (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 L3 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 por ejemplo procariontes del Dominio *Bacteria*.

OBJETIVOS

En este punto, es importante aclarar que no se ha realizado una caracterización completa de la halocina L3, sino una purificación parcial de la misma. Por tanto, cuando hablamos de halocina L3 nos estamos refiriendo siempre a un extracto procedente del sobrenadante de la cepa productora, con actividad inhibitoria y de naturaleza proteica.

Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1. Optimizar la producción de halocina L3 en función del tiempo y del crecimiento a diferentes concentraciones de sales.
2. Detectar la existencia o no de actividad inhibitoria intracelular.
3. Descartar que la actividad inhibitoria sea debida a fagos.
4. Comprobar la naturaleza proteica de la halocina L3.
5. Confirmar que la halocina L3 no es sal dependiente.
6. Producir halocina L3 a gran escala y purificarla parcialmente.
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

Haloarcula sp cepa L3 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 L3 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

Todos los medios de cultivo utilizados para crecer las arqueas halófilas extremas, se prepararon con la misma base, una solución de agua de sales (SW) que conserva las proporciones relativas del agua de mar, con una reducción de las concentraciones de CaCl_2 y NaHCO_3 para evitar la precipitación de las mismas a concentraciones más elevadas (*Rodriguez Valera et al.*, 1980). Se utilizó una concentración del 25% de SW (SW25%) 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 hasta completar un litro. Una vez preparada la cantidad requerida se filtró con papel de filtro para eliminar impurezas.

Los medios sólidos y líquidos se prepararon adicionando a la base de SW 25%, 0,5 gramos de extracto de levadura (Panreac). El pH se ajustó a 7,2 en todos los casos. En el caso de los medios sólidos también se adicionó el 2% de agar-agar (Panreac). Finalmente, todos los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave vertical (JP Selecta S.A.) a 121°C durante 20 minutos. En el caso de los medios sólidos, tras el autoclavado fueron distribuidos en placas de Petri estériles o en tubos de vidrio (agar inclinado).

Las cepas se conservaron en medio de cultivo sólido, tanto en tubos de 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 (Todd-Hewitt Broth w/ 2% Yeast Extract); 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 2% 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.

4.3. Condiciones de crecimiento

Para el cultivo de las distintas cepas utilizadas en este trabajo, se realizó la técnica de siembra en placa por agotamiento y la técnica de extensión con asa de vidrio. Tras la siembra, las placas se incubaron a 37°C durante un período comprendido entre 6-8 días (en el caso de las arqueas halófilas extremas), y de 24-48 horas para las bacterias. A continuación, y tras observar la pureza de los aislamientos, estas cepas se conservaron en medio sólido inclinado.

4.4. Microscopía óptica

Para la observación de bacterias se empleó un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus BX50) provisto de una cámara digital. La observación se realizó a un aumento de 1000x. Las bacterias fueron previamente fijadas en su mismo medio añadiendo formaldehído (1% concentración final) a cada muestra.

4.5. Técnicas de cultivo en doble capa

Para la obtención de dobles capas de las cepas indicadoras, 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, se obtienen 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 DO_{540} de 0,5 que se corresponde aproximadamente con 10^7 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) (Meseguer *et al.*, 1985, 1986). Se transfieren 100 µl de esta dilución preparada (inóculo) a los tubos de vidrio. Las dobles capas contendrán, por tanto, 10^6 UFC/mL.

Las placas Petri con 15 mL de medio sólido se mantienen a 55°C en una estufa para que se forme agua que permita una fácil extensión. A su vez, los tubos de vidrio con medio sólido, se mantienen a 55°C en baño maría para evitar su solidificación, dado que la temperatura de gelificación del agar es de 45°C. Este medio líquido se vierte en el inóculo de cada cepa y se agita rápidamente. El conjunto se vierte y se extiende uniformemente en las placas, formándose el *top agar* (capa superior de agar).

De esta forma obtenemos las dobles capas conteniendo las cepas sensibles sembradas en la capa superior. Finalmente, se guardaron a 4°C para evitar el crecimiento de los microorganismos hasta su posterior uso.

En la siguiente figura se muestra un esquema de todo el proceso.

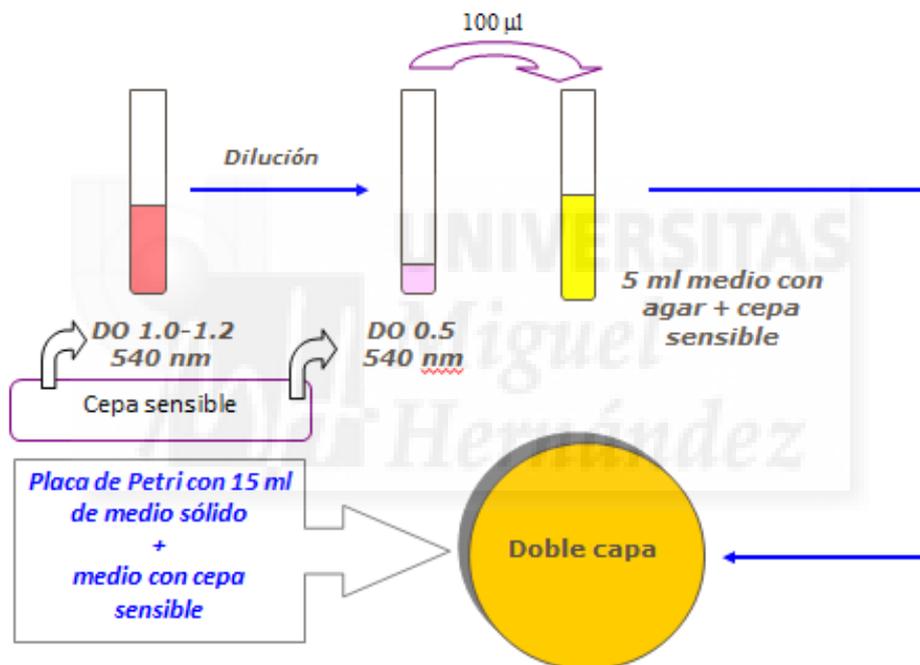


Figura 5: Técnica de cultivo en doble capa (DC). Tras la formación de una base de 15 mL de medio sólido, se forma una capa superior de 5 mL que contiene la cepa sensible.

4.6. Detección de la actividad inhibitoria de las muestras

Para medir la actividad de las diferentes muestras conteniendo halocina L3 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 Rodriguez.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 6). 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 7).

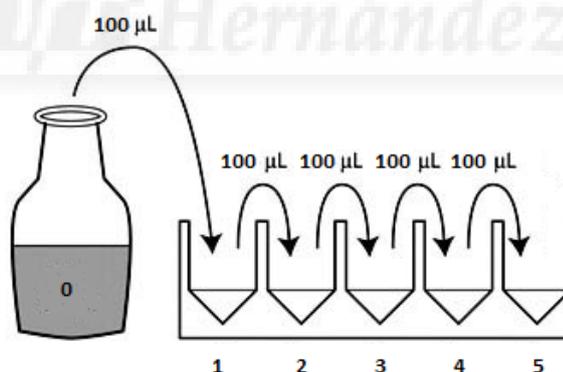


Figura 6: Dilución doble seriada.

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

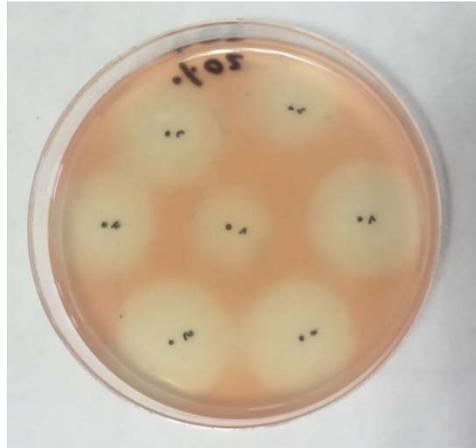


Figura 7: Doble capa de *H. salinarum* NRC 817 en la que se midió la actividad de una muestra conteniendo halocina L3 (160 UA/mL) mediante el método de las diluciones dobles.

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 8).



Figura 8: Doble capa de *H. salinarum* NRC 817 en la que se comprobó la actividad de halocina L3 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 fagos que formaran calvas de lisis, se realizó el siguiente experimento.

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 inhibitorio fuese debido a la presencia de fagos, 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 de tamaño de poro (CHMLAB) 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 L3 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 L3 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 L3 a gran escala

Con el fin de obtener una producción a mayor escala de la halocina L3, 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 DO_{540} de 3.

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 (*Pellicon*) con su montaje, utilizado en los experimentos de filtración de grandes volúmenes de cultivo.

En primer lugar, se utilizaron ultrafiltros de $0,45 \mu\text{m}$ 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, 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.

Para concentrar la halocina, el filtrado obtenido se hizo pasar a través de ultrafiltros 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 Falcón a -80°C durante 24 horas para asegurar su total congelación. Posteriormente se llevó a un liofilizador (Testar Cryodos-80), y una vez finalizado el proceso se resuspendió el producto seco en 0.5 mL de agua destilada estéril.

En todos los casos, los sobrenadantes con las halocinas se conservaron a -20°C hasta su utilización. En cada uno de los pasos descritos se comprobó la presencia o ausencia de halocina L3 mediante los métodos descritos en el apartado 4.6.1.

4.10. Estabilidad de la halocina L3 frente a la proteinasa K

Para confirmar la naturaleza proteica de la halocina L3, 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 que se especifican en la siguiente tabla:

	A	B	C	D
Halocina L3	200 μL	200 μL	200 μL	
Proteinasa K	0,5 μL			0,5 μL
Agua destilada		0,5 μL		200 μL
Tampón sin enzima			0,5 μL	
Volumen total	200,5 μL	200,5 μL	200,5 μL	200,5 μL

El ensayo **A** sería para detectar la naturaleza proteica de la halocina en el caso de que fuese inhibida por la proteasa. El ensayo **B** como control negativo. El ensayo **C** para descartar que la inhibición de la actividad fuese debida a alguno de los componentes del tampón utilizado. Y finalmente el ensayo **D** para comprobar si la proteinasa K podría inhibir por sí sola el crecimiento de la cepa sensible.

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 L3 en procariotas del Dominio *Bacteria*

Para estudiar el posible efecto antibacteriano de la halocina L3 se realizaron ensayos de actividad de esta proteína sobre el crecimiento de dos cepas del Dominio *Bacteria*. Como modelo de estudio se utilizaron las cepas no patógenas *Bacillus* sp CECT40 y *Streptococcus pneumoniae* R6.

En primer lugar, se inocularon ambos microorganismos en sus medios de cultivo (apartado 4.2.2) y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,1. A continuación se añadió la halocina y se realizó un seguimiento de la curva de crecimiento hasta el comienzo de la fase de muerte, tomando muestras cada 15 minutos en el caso de *Bacillus* y cada 10 minutos en el caso de *S. pneumoniae*, midiendo la DO₅₅₀.

En paralelo se tomaron muestras para microscopía como se describe en el apartado 4.4. Cada 45 minutos para *Bacillus* y cada 30 minutos para *S. pneumoniae*.

Como control negativo se utilizaron cultivos de ambas cepas a los que en lugar de halocina L3 se les añadió el mismo volumen, pero de agua destilada.

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

5. Resultados y discusión.

5.1 Selección de la cepa sensible.

Para comenzar, se seleccionaron dos cepas de arqueas halófilas candidatas para ser utilizadas como indicadores de la actividad de la halocina L3, estas fueron *Halobacterium salinarum* NRC 817, por ser la cepa más ampliamente utilizada como sensible en varios trabajos previos con otras halocinas, y *Haloarcula californiae* ATCC 33799, por ser una de las más sensibles a la halocina L3 (Pastor, A. 2014). Tras la realización de varios ensayos con ambas cepas, finalmente se optó por la utilización de *Halobacterium salinarum* NRC 817, debido a que los halos de inhibición que se observaban en las dobles capas preparadas con la cepa *H. californiae* 799 eran menos nítidos, dificultando pues la observación de la inhibición y por tanto la medida de los halos.

5.2 Ausencia de fagos en los extractos de la Halocina L3

Basándonos en que 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), se puede diseñar un ensayo para confirmar que la inhibición observada con extractos de halocina L3 no era debida a la presencia de fagos.

Tras la extracción de un trozo de agar de un halo de inhibición y su transferencia a otra doble capa con la misma cepa sensible (apartado 4.7), el resultado que obtuvimos fue la ausencia de inhibición del crecimiento alrededor del agar transferido (Figura 9).

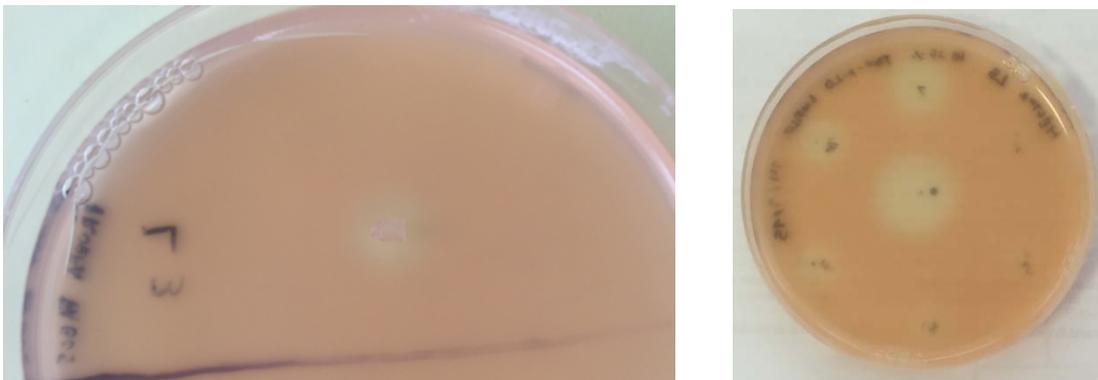


Figura 9: (izquierda) Cubo de agar con halocina adsorbida, colocado sobre una doble capa inoculada con *H. salinarum*. El crecimiento alrededor del cubo tras 7 días indica la ausencia de fagos de arqueas. (derecha) Comparación con una inhibición convencional en forma de halos, debida a la halocina L3.

5.3 La halocina L3 no es intracelular

La mayoría de las halocinas estudiadas son secretadas al exterior celular y se obtienen a partir del sobrenadante de los cultivos de las cepas productoras. Sin embargo, en algunos casos son retenidas total o parcialmente en el interior celular y por ello es necesario romper las células para poder extraerlas (*Meseguer, I. y Rodríguez-Valera, F. 1985*).

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

5.4 Producción de halocina L3 en función del tiempo y de la concentración de sales.

Como las arqueas crecen a elevadas concentraciones de sal, es importante estudiar la influencia que esta puede ejercer sobre 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, la producción de halocina también es óptima.

Para encontrar este óptimo de salinidad, se realizaron ensayos cuyos medios tenían distintas concentraciones de sales (15%, 20%, 25% y 30%). Todos ellos se realizaron por duplicado y los cultivos se dejaron crecer hasta que llegaron a la fase estacionaria.

En la figura 10 podemos observar los cultivos de la cepa productora a diferentes concentraciones de sales tras alcanzar la fase estacionaria. Las colonias y los cultivos de las arqueas halófilas extremas típicamente poseen un color rosa, rojo o naranja dependiendo de la especie. En el caso de nuestra cepa productora este color es naranja. Una menor intensidad de color indica menor concentración de células, como ocurre en el matraz del 30% de sales. Estos datos se corroboran al medir la DO_{520} (figura 11), donde observamos que a esa concentración de sales la fase estacionaria se alcanza en 1,4 de absorbancia, mientras que en el resto de concentraciones de sales puede llegar hasta una absorbancia de 3.

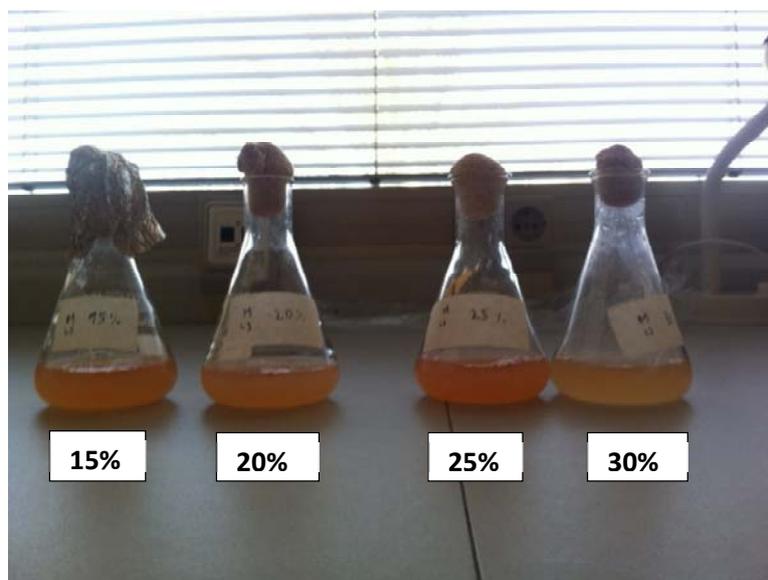


Figura 10: Cultivos en fase estacionaria de *Haloarcula sp* cepa L3 a distintas concentraciones de sales

En la figura 11 se puede comprobar que, con la composición de los medios empleada en los ensayos, la producción de halocina es proporcional al crecimiento del microorganismo, y con una ligera variación a las distintas concentraciones de sales. En general, con este ensayo se demuestra que cuanto mayor sea la densidad óptica del cultivo, mayor producción de halocina se obtiene.

Sin embargo, para elegir el óptimo de salinidad a la que realizar los experimentos de producción a gran escala, es recomendable no basarse solo en el dato de una mayor biomasa, ya que podría darse el caso de que la producción de halocina se viese favorecida en condiciones que no son tan óptimas para el crecimiento del microorganismo productor. Por ello, también se estimó oportuno comprobar si a una mayor concentración celular se obtenía además una mayor concentración de halocina o, por el contrario, no existe una correlación entre la producción de halocina y la concentración del microorganismo.

De nuevo, en la figura 11 se puede observar que se obtiene un mejor crecimiento cuanto menor concentración de sales tiene el medio, siendo el óptimo el 15%. Sin embargo, la producción de halocina es muy similar a concentraciones del 15% y 20% de sales, hecho que se demostró al medir la actividad inhibitoria de cada una de las muestras (figura 12) por lo que se decidió utilizar la concentración del 20% para la obtención de halocina a gran escala, ya que la posibilidad de una contaminación aumenta al bajar la concentración salina.

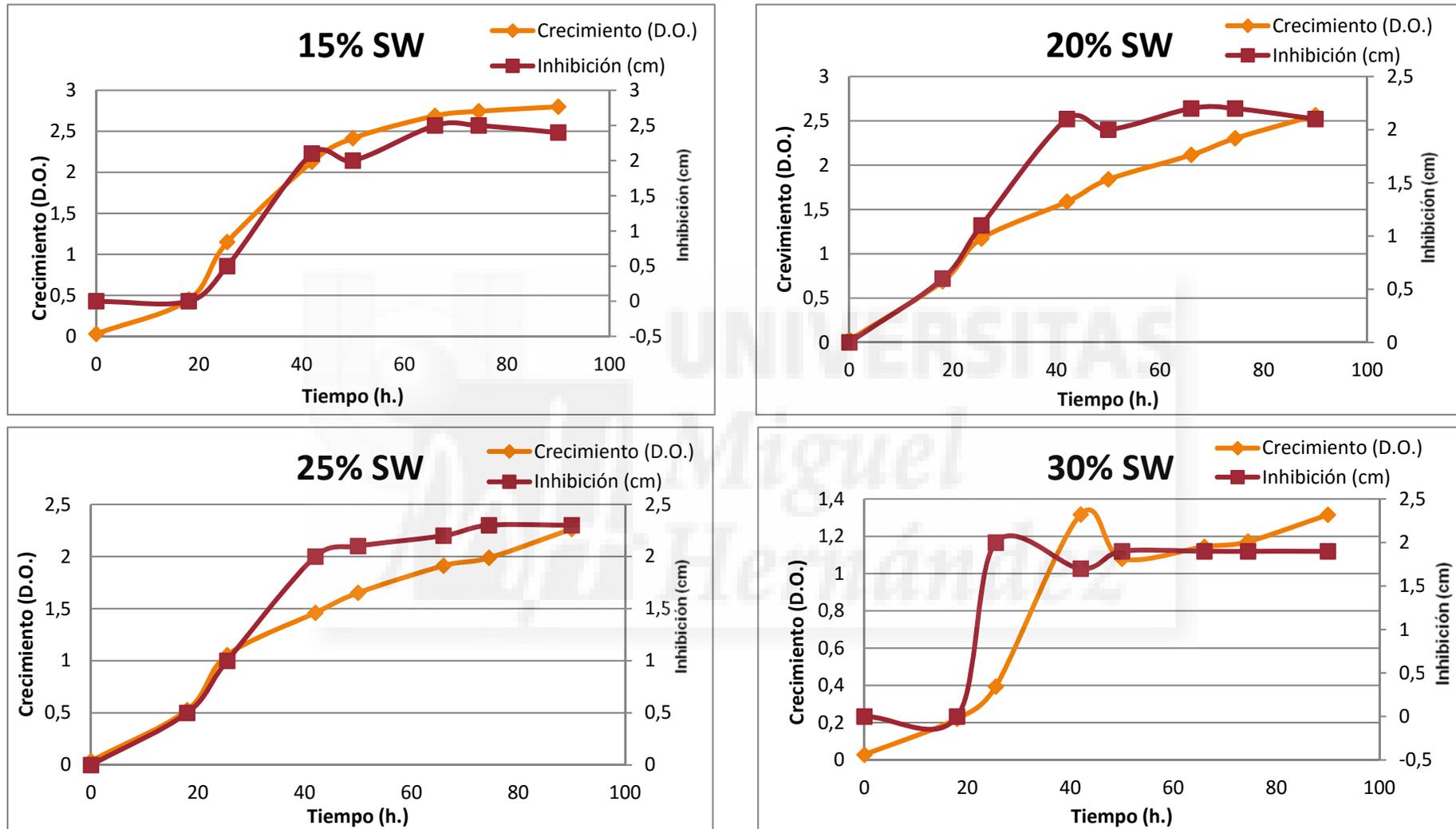


Figura 11: Curvas de crecimiento y producción de halocina L3 en función del tiempo en medios de cultivo con 15%, 20%, 25% y 30% SW.

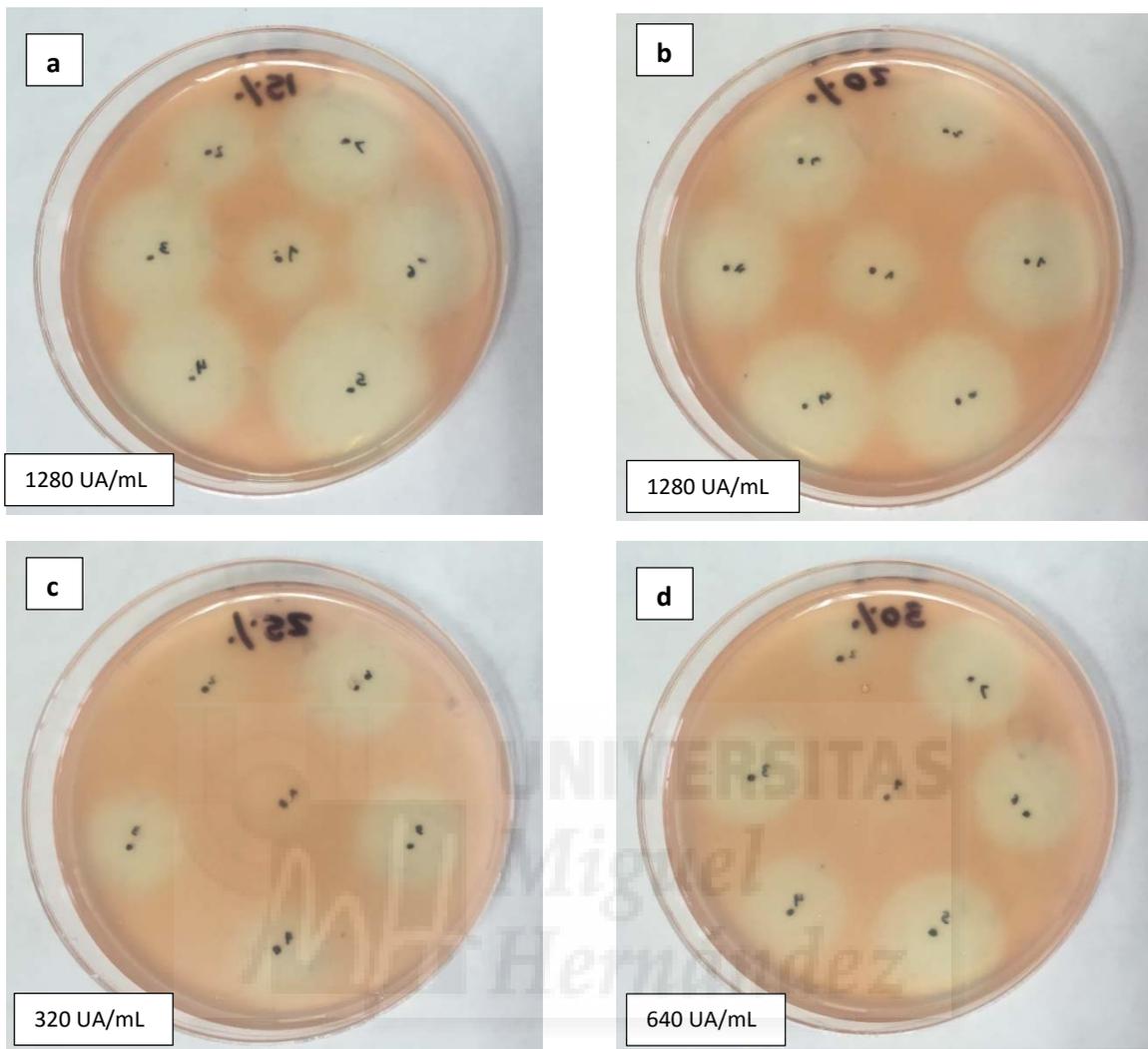


Figura 12: Dobles capas de *H. salinarium* mostrando los halos de inhibición producidos por la halocina L3 en el punto máximo de producción, a diferentes concentraciones de sales. a) 15%, b) 20%, c) 25%, d) 30%.

Como conclusión final comentar que el hecho de que a concentraciones del 25% y 30% de sales se observe un crecimiento más lento, así como una menor producción de halocina, se debe a que la cepa pertenece al género *Haloarcula*, cuyo crecimiento óptimo está entre el 15 y el 20% de sales (Torreblanca *et al.*, 1986).

5.5 Obtención de halocina L3 a gran escala y purificación.

El siguiente paso fue obtener una cantidad de halocina L3 suficientemente concentrada para poder utilizarla en los ensayos posteriores.

Para ello se prepararon 3 litros de medio de cultivo al 20% de sales y se inoculó la cepa productora hasta alcanzar una densidad óptica de 2.8, ya que fue a esta DO en donde obtuvimos una mayor producción de halocina según el ensayo anterior. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de concentración/semipurificación de la halocina que se ha descrito en el apartado 4.8.

Tras la primera etapa, cuyo propósito consistía en la eliminación de las células mediante filtros de membrana de 0,45 μm , se obtuvo un sobrenadante que poseía una actividad de 20 UA/ml.

A pesar de la actividad era un poco baja, al obtener un volumen final de sobrenadante de 2.4 litros, se obtuvo un total de 48000 UA, cantidad más que suficiente para continuar con el proceso de purificación.

El sobrenadante obtenido se filtró con ultrafiltros de membrana de 100 KDa de tamaño de poro, comprobándose que la actividad de la halocina se encontraba en el filtrado. A continuación, para concentrar la halocina, el filtrado se volvió a procesar a través de ultrafiltros de 10 KDa. En este caso la actividad se encontró en el retenido, lo cual nos indica que la halocina L3 tiene un tamaño mayor de 10 kDa . El volumen del retenido fue de 200 ml con una actividad de 20 UA/ml, lo que significó que disponíamos de un total de 4000 UA.

Este resultado nos indicó que habíamos perdido el 85% de la actividad total al hacer pasar la muestra a través de los ultrafiltros de 10 KDa. Según las especificaciones del fabricante este filtro de membrana está compuesto por ésteres de celulosa y dicha composición puede provocar una adsorción inespecífica de proteínas. En esta situación es recomendable la utilización de filtros de baja adsorción pero no disponíamos de los mismos.

El retenido fue dializado con el fin de eliminar todas las sales, provenientes del cultivo y presentes en el extracto. Tras el proceso de diálisis, se obtuvo un concentrado de alrededor 75 mL con una actividad de 40 UA/ml (3000 UA totales).

Para aumentar la concentración, se realizó una liofilización utilizando 45 mL de los anteriores obtenidos, pues la liofilización se realizó de 2 muestras y ambas debían tener el mismo volumen, y se recogió un volumen final de 0.5 mL obteniendo una actividad final de 1600 UA/mL. (800 UA totales). Los otros 30 mL de halocina dializada fueron congelados.

En la siguiente figura se expone el diagrama de flujo y el rendimiento obtenido en cada una de las fases del proceso de semipurificación.

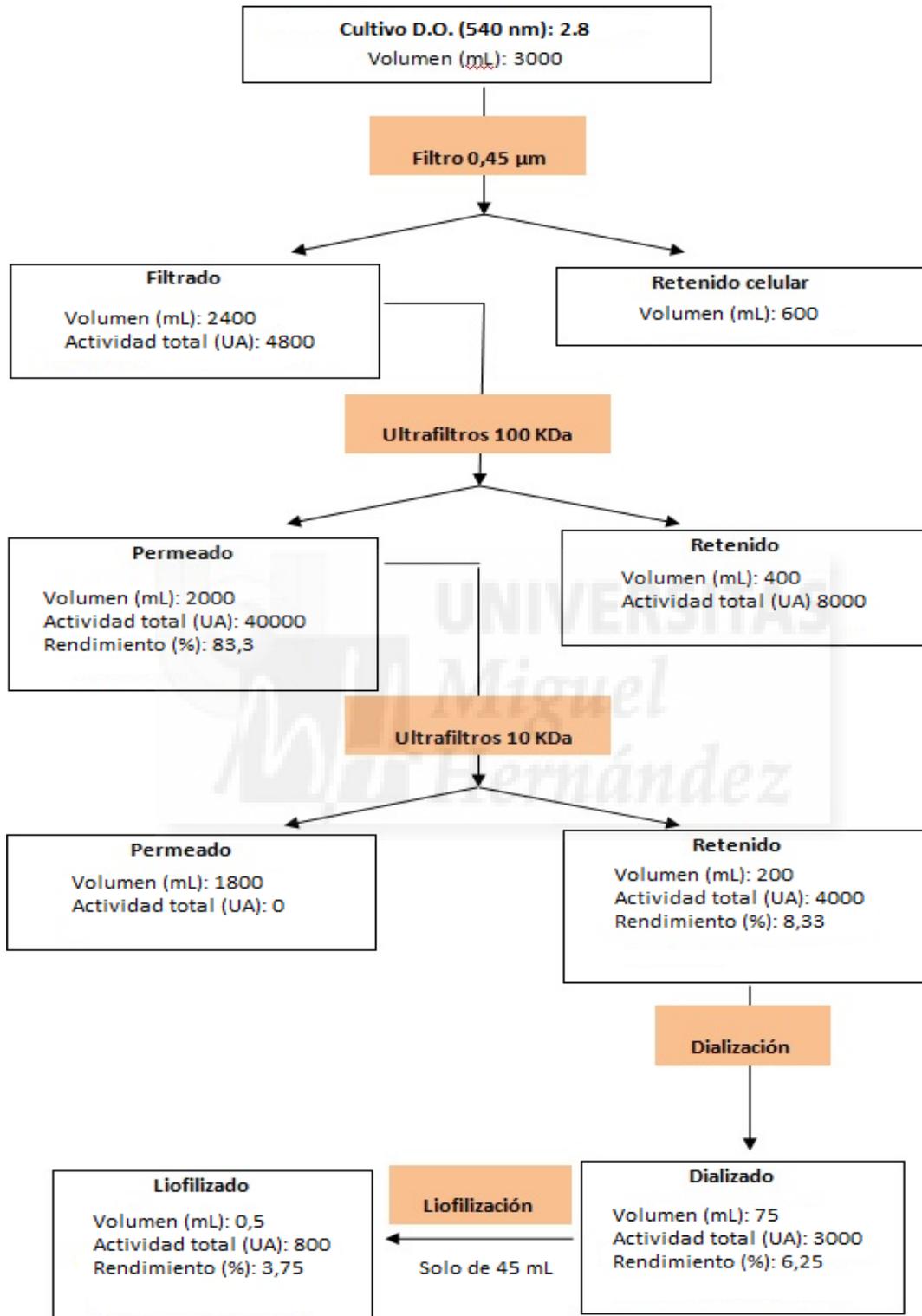


Figura 13: Esquema del proceso de obtención a gran escala de la halocina L3 y rendimiento del mismo.

Analizado los resultados obtenidos durante este ensayo, se puede concluir que para futuros procesos de producción de halocina L3 sería necesario; i) optimizar la composición del medio de cultivo para tratar de obtener una mayor producción, ii) utilizar siempre ultrafiltros de baja adsorción en el proceso de concentración para evitar la disminución del rendimiento, pues el método utilizado es relativamente fácil y sencillo para procesar grandes volúmenes en periodos de tiempo cortos, como pueden ser horas.

5.6 La halocina L3 es sensible a la proteinasa K.

Las halocinas se definen como péptidos o proteínas con capacidad antimicrobiana sobre cepas estrechamente relacionadas con la productora. Por ello, y para demostrar la naturaleza proteica de la halocina L3, se decidió someterla a la acción de la proteinasa K.

El ensayo se realizó con tres controles diferentes según se describe en el apartado 4.10. y los resultados se muestran en la figura siguiente:

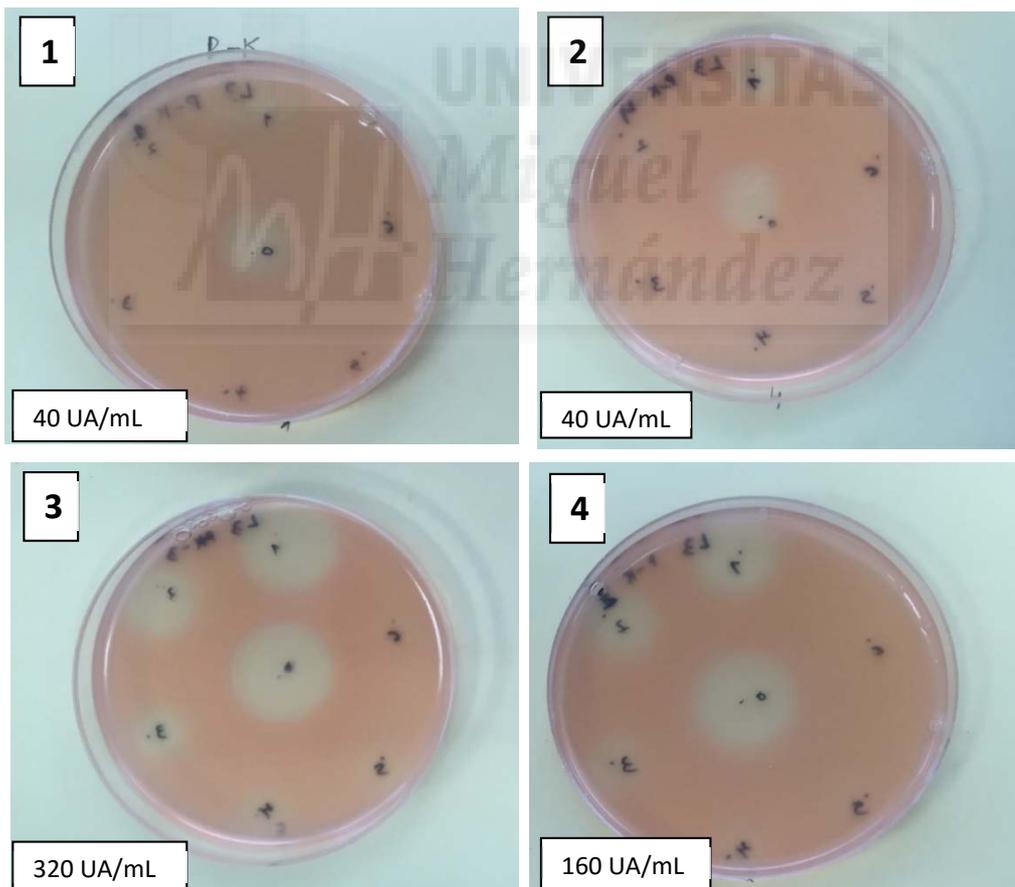


Figura 14: Efecto de la proteinasa K sobre un extracto semipurificado de halocina L3. 1) Halocina tratada con proteinasa K. 2) Control solo con proteinasa K en su tampón. 3) Control negativo con halocina y agua destilada. 4) Control con halocina y el tampón de la enzima.

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

- a) La proteinasa K ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa sensible.
- b) La proteinasa K degrada completamente la halocina, ya que el extracto con actividad tratado con la proteasa posee la misma actividad que el control en el que solo estaba presente la enzima.
- c) Los agentes quelantes empleados en el tampón salino no tienen ningún efecto inhibitor sobre la cepa sensible. Sin embargo, sí que observamos que la actividad de la halocina se reduce a la mitad, lo que nos podría indicar que si se produce alguna interacción entre estos y la proteína.

Como conclusión final se puede afirmar que la actividad inhibitoria se debe a una molécula de naturaleza proteica. Para tratar de determinar si se trata de una única proteína o de varias, se deberían realizar estudios de purificación de proteínas (cromatografía, HPLC, electroforesis) que no han podido ser llevados a cabo durante la realización de este trabajo.

5.7 Estudio de la halocina L3 como sustancia antibacteriana.

Como anteriormente se ha mencionado, la halocina L3 mostró tener un efecto sobre el crecimiento en medio sólido de *Bacillus sp* (Pastor, A., 2014). En base a estos resultados se diseñaron ensayos para ver si la halocina tenía efecto sobre el crecimiento en medio líquido de esta misma cepa bacteriana.

Por otro lado, y aprovechando un proyecto de investigación que lleva a cabo uno de los tutores de este TFG (el Dr. Manuel Sánchez Angulo), se decidió estudiar también si la halocina L3 tenía alguna actividad frente a *Streptococcus pneumoniae*.

5.7.1 Efecto en *Bacillus sp*

Puesto que se conoce que la halocina L3 tiene un efecto concreto sobre el crecimiento de *Bacillus sp* en medio sólido, se ha querido comprobar si también afectaba al crecimiento en medio líquido y su morfología celular.

Se prepararon 3 cultivos y se crecieron hasta una DO_{550} de 0.1, momento en el que se añadió a uno de ellos 80 UA/mL de halocina L3, a otro 160 UA/mL, y al tercer cultivo se le agregó el mismo volumen de agua destilada como control negativo.

A partir de este momento, se fueron tomando muestras cada 15 minutos de todos ellos para medir la absorbancia, hasta que se llegó a la fase estacionaria. Paralelamente, cada 45

minutos se tomaron muestras para la observación al microscopio óptico. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 15 y 16.

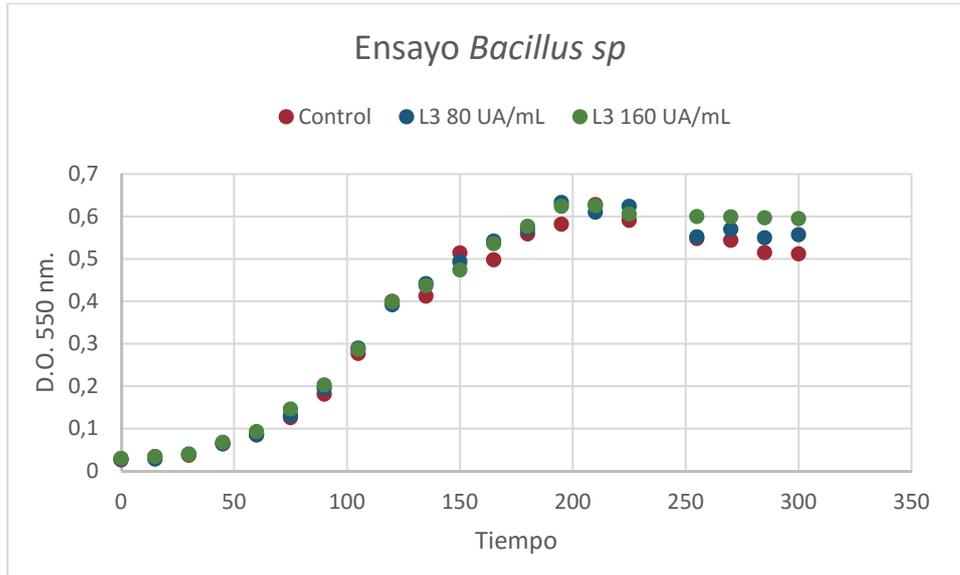


Figura 15: Efecto de la halocina L3 sobre el crecimiento de *Bacillus sp* en medio líquido. Rojo: control sin halocina. Verde: 80 UA/mL de halocina L3. Morado: 160 UA/mL de halocina L3.

En primer lugar, no se observó ningún efecto sobre el crecimiento en medio líquido de *Bacillus sp*, con las concentraciones de halocina empleadas (figura 15). Esto se puede explicar debido a que algunas especies bacterianas muestran un comportamiento diferente según crezcan en un medio líquido o en un medio sólido con agar. En medios sólidos algunas presentan un tipo de crecimiento conocido como "swarming" o enjambramiento, que se caracteriza por el desplazamiento de las bacterias sobre la superficie del medio de cultivo mediante la formación de una película, tratando de extenderse y cubrir toda la placa. Este efecto ha sido observado en especies del género *Bacillus*, motivado por la aparición de células hiperflageladas y por la síntesis de una lipoproteína, la surfactina, conocida por su potente efecto biosurfactante, además de por sus propiedades antimicrobianas. Al aumentar la humectabilidad de la superficie, las células tienen una capacidad mayor de moverse con facilidad para formar el enjambre. Ambos procesos se encuentran regulados por el gen *swrA*, de manera que mutantes en este gen son incapaces de formar este enjambre.

El hecho de que la halocina afecte a este fenómeno del crecimiento en medio sólido, pero no en medio líquido, nos indica que L3 podría estar alterando alguno de los procesos que desencadenan la producción de surfactina.

Finalmente, analizando los resultados en el microscopio óptico, tampoco se observó ninguna diferencia morfológica entre las células del cultivo control (figura 16 a y c) y las tratadas con halocina L3 (figura 16 b y d).

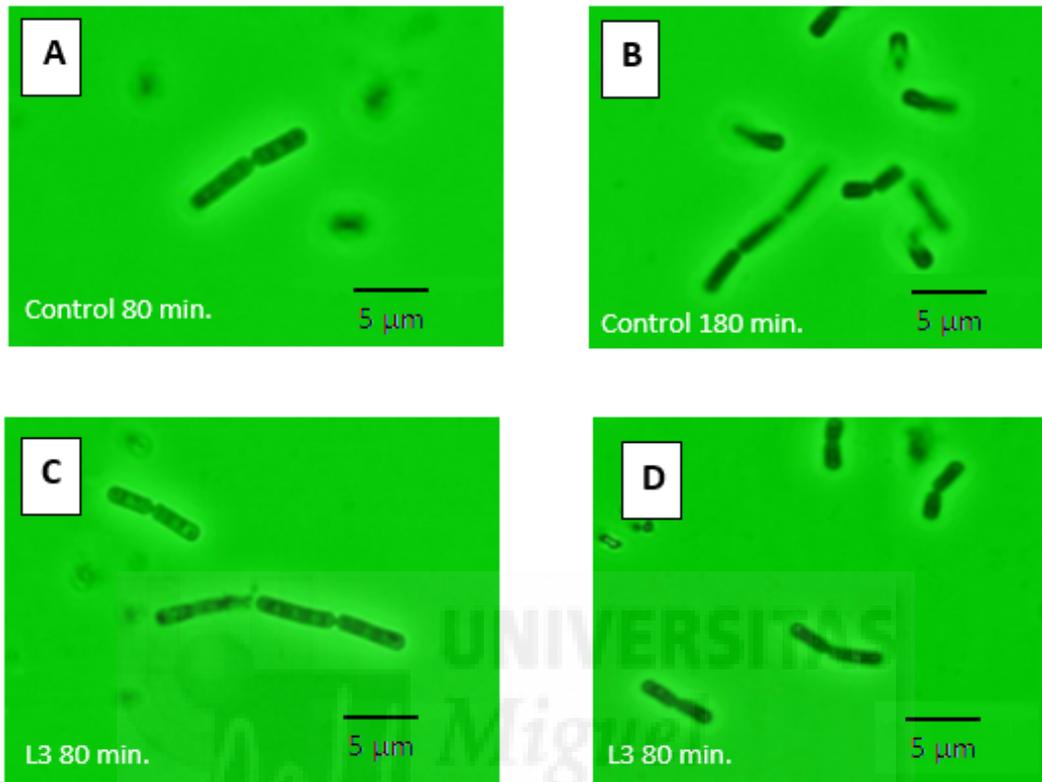


Figura 16: Microscopía óptica de células de *Bacillus sp* a diferentes tiempos en cultivos sin tratamiento (a y c), o tratados con 80 UA/mL de halocina L3 (b y d).

5.7.2 Efecto en *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos que afectan a los seres humanos. Por ello, existe un gran interés en la comunidad científica en encontrar sustancias que puedan ejercer un efecto bactericida sobre esta. Los cultivos de la cepa avirulenta R6 son muy sencillos de manejar en el laboratorio, y por ello se decidió estudiar si la halocina L3 producía algún efecto sobre esta cepa, alterando su crecimiento o su morfología.

Se sabe que, en condiciones óptimas, *S. pneumoniae* crece durante la fase exponencial formando diplococos y cadenas cortas de cuatro células. Conforme se va aproximando a la fase estacionaria, estas cadenas cada vez son más largas y el crecimiento va ralentizándose hasta detenerse. Además, al llegar a la fase estacionaria se activan una serie de autolisinas que producen que el cultivo primero sedimente y luego muera de forma muy rápida, al contrario que pasa con otras bacterias, que pueden permanecer largos periodos de tiempo en una fase de latencia antes

de llegar a lo que se conoce como fase de muerte. Esto provoca una disminución en la turbidez del cultivo.

La explicación de este comportamiento se debe a la virulencia del microorganismo, ya que la autólisis provoca una gran cantidad de endotoxinas que interferirán con el sistema inmune y provocarán una respuesta del hospedador (Martner *et al.* 2009).

El ensayo diseñado con la halocina L3 consistió en lo siguiente:

Utilizando cultivos en crecimiento exponencial de *S. pneumoniae*, se añadieron 80 UA/mL de halocina cuando la DO₅₅₀ del cultivo era de 0,1. Para observar el efecto sobre el crecimiento se midió la DO₅₅₀ de los cultivos cada 10 minutos hasta que se alcanzó la fase de muerte (figura 15).

Al igual que en el ensayo con Bacillus, Para detectar posibles cambios en la morfología de la bacteria se tomaron muestras cada 30 minutos para su observación en microscopio.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 17 y 18.

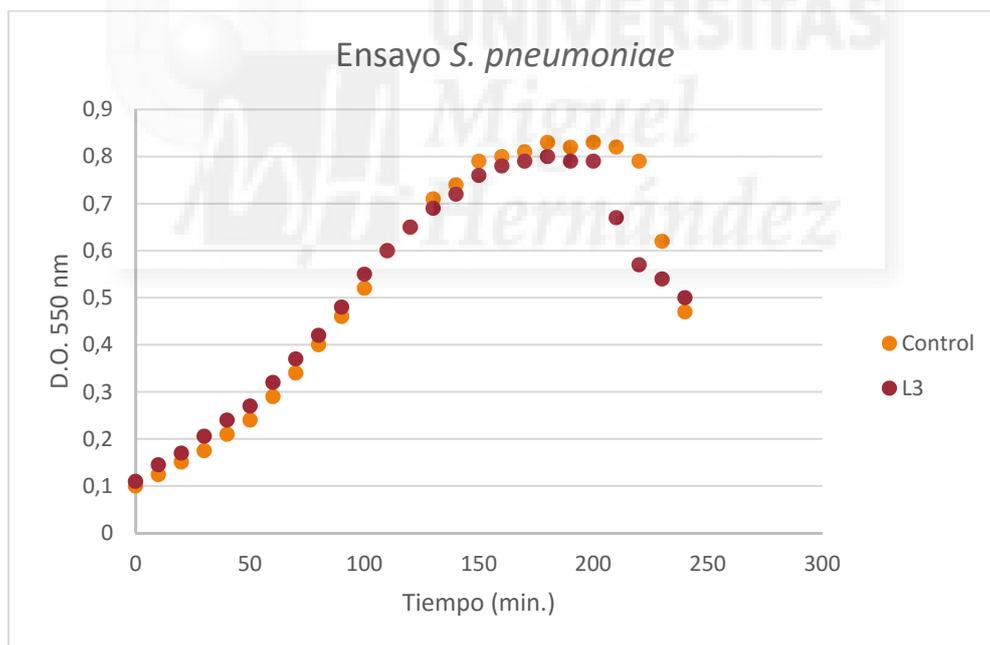


Figura 17: Efecto de la halocina L3 sobre el crecimiento de *S. pneumoniae*. Azul: control sin halocina. Rojo: cultivo con 80 UA/mL de halocina L3.

Como se puede observar, la halocina no afectó a la velocidad de crecimiento del microorganismo durante su fase exponencial. Lo que sí que se detectaron fueron cambios en la duración de la fase estacionaria cuando L3 estaba presente, pues en el cultivo con halocina la fase estacionaria tenía una duración menor respecto a la del cultivo control, por lo que alcanzaba antes la fase de muerte.

Al visualizar con el microscopio las muestras obtenidas, se vio que en las muestras tratadas con halocina L3 se aceleraba el proceso de formación de largas cadenas (figura 18c) que iban agregándose hasta formar flóculos celulares (figura 18 d y e).

Esta segregación puede tener un interesante punto de vista médico, pues una de las armas más importantes del neumococo como patógeno humano es su pequeño tamaño. Pero si se encuentra en forma de agregados grandes, es mucho más fácil para el sistema inmune detectarlos y generar una respuesta para eliminarlos. Además, se ha observado que esos agregados se mantienen después de que las células hayan lizado, lo que parece indicar que el contenido celular que actúa como endotoxina permanece con el flóculo y no se distribuye por el organismo.

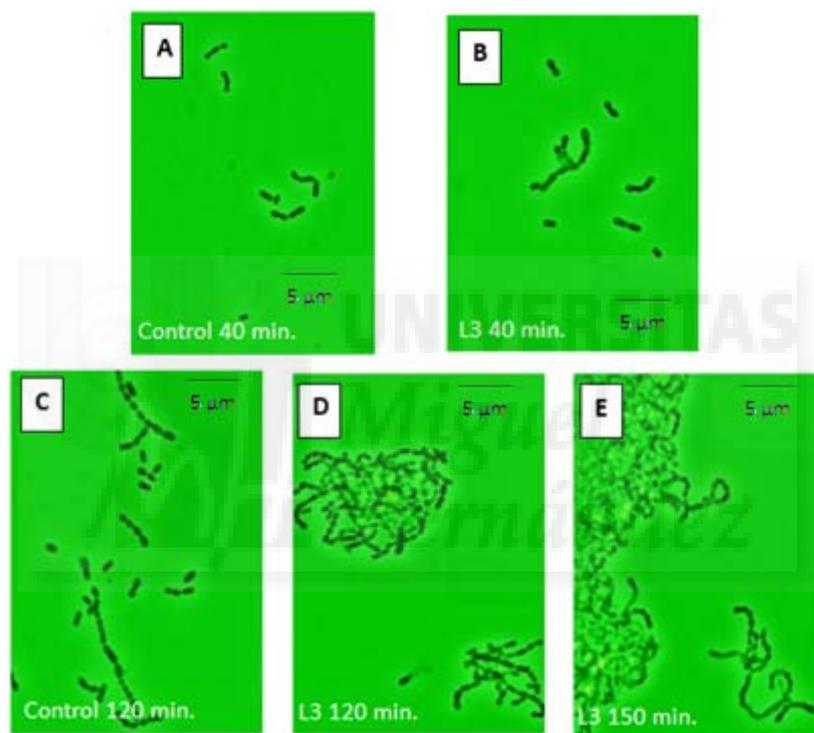


Figura 18: Imágenes de microscopía óptica de un cultivo de *S. pneumoniae*. *A* y *B* sin halocina; *C*, *D* y *E* tratadas con 80 UA/mL de halocina L3.

5.8 Estudio del efecto de la halocina L3 como antitumoral.

En primer lugar, es importante comentar que este ensayo no se ha incluido en el apartado de material y métodos ya que no fue realizado por nosotros, sino que buscamos alguna línea de investigación en la que poder realizar este tipo de estudio.

Contactamos con el grupo de investigación oncológica del Dr. Saceda, del IBMC de la Universidad Miguel Hernández, y aceptó el probar una muestra de la halocina en una de sus líneas celulares, concretamente la línea celular de cáncer de colón SW620. Se le suministró pues una muestra de L3 conteniendo 320 UA/ml y los resultados que obtuvieron se muestran en la figura 19.

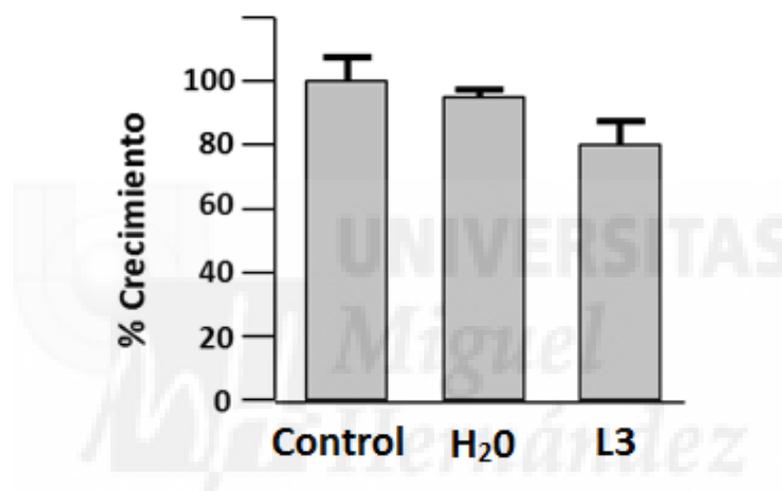


Figura 19: Efecto de la halocina L3 (32 UA totales) sobre el crecimiento en la línea de cáncer de colon SW620. Se puede observar una pequeña disminución en las células tratadas con halocina respecto a los ensayos control.

Como se puede observar en la figura, la halocina L3 parece tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta línea celular, a pesar de que se utilizaron bajas concentraciones de la misma.

Aunque estos resultados son muy preliminares, y serían necesarios ensayos más complejos. utilizando además mayores concentraciones de halocina, sí que convierte esta posible línea de investigación en un camino más que interesante para poder realizar en un futuro

6. Conclusiones y proyección futura

Conclusiones

1. La actividad inhibitoria del sobrenadante que se extrae de los cultivos de *Haloarqula sp* cepa L3 es debida a la presencia en el mismo de una (o varias) moléculas de naturaleza proteica, que hemos denominado halocina L3.
2. Dicha actividad inhibitoria no es debida a la acción de arqueofagos.
3. No se ha encontrado actividad inhibitoria intracelular en cultivos de *Haloarqula sp* cepa L3.
4. La producción de halocina L3 es bastante estable a las variaciones de la concentración de sales en el medio.
5. La actividad inhibitoria es debida a una molécula o a un complejo molecular, de naturaleza proteica, con un peso molecular estimado entre 10 y 100 KDa.
6. La halocina L3 no tiene ningún efecto sobre el crecimiento *Bacillus sp* en medio líquido ni en su morfología celular.
7. La halocina L3 tiene un efecto sobre la duración de la fase estacionaria en cultivos líquidos de *Streptococcus pneumoniae*. Además, produce una aceleración de la agregación, formándose antes las cadenas y los flóculos celulares.

Proyección futura

Como se ha comentado en la introducción, está demostrado que las halocinas producen en ocasiones efectos sobre todos los tipos celulares, bacterias, arqueas y eucariotas.

Los resultados obtenidos en este trabajo no hacen más que corroborar que las halocinas son unas sustancias con un gran potencial biotecnológico, abriendo campos para su aplicación en áreas como farmacología, fisiología o microbiología industrial, entre otras.

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, termophily 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.
- Cheung, J.,** Danna, K.J., O'Connor, E.M., Price, L.B., Shand, R.F., 1997. *Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon haloferax mediterranei R4.* J. Bacteriol. **179**, 548–551.
- 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.
- Ginzburg, M.,** Sachs, L. y Ginzburg, B.Z. 1970. *Ion metabolism in Halobacterium.* J. Gen. Physiol. **55**: 187-207.
- Gratia, A.** 1925 *Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille.* C. R. Soc. Biol. **93**:1040–1042.
- Gribaldo, S.,** Poole, A. M., Daubin, V., Forterre, P. & Brochier-Armanet, C. 2010. *The origin of eukaryotes and their relationship with the Archaea: are we at a phylogenomic impasse?* Nature Rev. Microbiol. **8**, 743–752
- 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 temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park*. **7**(3):622-34.
- Kushner, D.J.** 1985. *The halobacteriaceae*. En: *The bacteria*, vol. VIII. Ed. Woese, C.R. y Wolfe, R.S., pp. 171-214. Academic press, New York.
- Larsen H** 1967. *Biochemical aspects of extreme halophilism*. Adv Microbiol Physiol **1**: 97–132
- 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.
- Lledó, B.**, Martínez-Espinosa, R.M., Marhuenda-Egea, F.C. y Bonete, M.J. 2004. *Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon Haloferax mediterranei biochemical and genetic analysis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). **1674**: 50-59.
- 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. 1985. *Production and purification of halocin H4*. FEMS Microbiol. Lett. **28**: 177-182.
- Meseguer, I.** y Rodríguez-Valera, F. 1986. *Effect of halocin H4 on cells of Halobacterium halobium*. J. Gen. Microbiol. **132**:3061-3068.
- 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, RL. 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". Girlington 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*. Extremophylo. **6**:217-223.
- Oren, A.** 1991. *Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of fumarate*. J. Gen. Microbiol. **137**: 1387-1390.
- 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.
- Pfeiffer, F.**, Schuster, S.C., Broicher, A., Falb, M., Palm, P., Rodewald, K., et al., "Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1", Genomics, 2008, 91(4):335–346.
- 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 H1 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.
- Stoeckenius, W.**, Lozier, R.H. y Bogomolni, R.A. 1979. *Bacteriorhodopsin and purple membrane of halobacteria*. Biochem. Biophys. Acta. **505**: 215-278.
- 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.**, Rodríguez Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. y Kates. M. 1986. "Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov.". *Systematic and Applied Microbiology*, **8**: 89-99.
- Torreblanca, M.**, JL. Lequerica, E. O'Connor, I. Meseguer, MC. Dolz, L. Such, M. Sánchez, A. Alberola. 2004. "Nuevo péptido inhibidor del intercambiador Na⁺/H⁺ (PINHE). Patente nº 2220185
- 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.

