

BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS HALÓFILOS DE CANARIAS Y ESTUDIO DE LA MICROHALOCINA S8

SEARCH FOR HALOPHILIC MICROORGANISMS FROM THE CANARY ISLANDS AND STUDY OF MICROHALOCIN S8

Trabajo de Fin de Grado

Daniela Álvarez Bernal

Tutorizado por Ricardo Guillermo Álvarez y José Manuel Pérez de la Lastra

Grado en Biología

Mayo 2024

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis padres, que si no fuera por ellos no habría llegado donde estoy. Gracias a su esfuerzo he podido estudiar lo que he querido, con su ayuda he llegado al final de esta carrera y gracias a su apoyo no me he rendido estos 4 años.

A mi familia y amigos por apoyarme en todo, por darme ánimos cuando los he necesitado y por darme un entorno en el que desconectar. Gracias a toda esta gente que me quiere he podido remontar en los momentos que sentía que no podía más.

Además, agradecer a mis tutores, José Manuel y Ricardo, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo, por guiarme y ayudarme a terminar la carrera de la mejor manera posible.

Gracias al Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA) por ofrecerme sus instalaciones y maquinaria para poder llevar a cabo el trabajo de investigación.

Y por último, agradecer a la Universidad de la Laguna estos años como estudiante y los conocimientos que he adquirido gracias a los profesores que la componen.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	9
Material y métodos	10
Microorganismos halófilos	10
Análisis estructural de la halocina S8.....	14
Resultados y discusión.....	15
Microorganismos halófilos	15
Análisis estructural de la halocina S8.....	21
Conclusiones.....	26
Conclusions	26
Bibliografía.....	28

Resumen

Entre los mecanismos de defensa innata de los organismos destacan los péptidos antimicrobianos (PAMs). Las halocinas son PAMs sintetizadas por microorganismos halófilos, tales como bacterias y arqueas, que habitan en ambientes con alta salinidad. La halocina S8 es una microhalocina formada por 36 aminoácidos que se encuentra en una proteína precursora de 311 aminoácidos, cuya estructura y procesamiento se desconoce. El objetivo del trabajo fue la búsqueda de microorganismos halófilos de Canarias y el estudio de la posible estructura de la halocina S8.

Se recogieron muestras salinas de Lanzarote y Tenerife y se identificaron microorganismos halotolerantes del género *Staphylococcus*, *Paenibacillus* y de la familia Propionibacteriaceae. Además, se realizaron modelos estructurales de la halocina S8 con dos herramientas bioinformáticas: i-TASSER y AlphaFold. Para la proteína precursora de la halocina S8 se determinó que el mejor modelo era el de i-TASSER. Este modelo no contenía puentes disulfuro entre el precursor y el péptido y su estructura era más abierta, lo que le confiere mayor accesibilidad para las enzimas y menor coste metabólico para el procesamiento del péptido. Por último, se concluyó que para el péptido halocina S8 el mejor modelo era el de AlphaFold, por su alta puntuación en ERRAT y por el consenso en la predicción del puente disulfuro intrapéptido con otra herramienta (CYS_REC).

Palabras clave: Halófilas; halocinas; péptidos antimicrobianos (PAMs); halotolerantes; puentes disulfuro.

Abstract

Among the innate defense mechanisms of organisms, antimicrobial peptides (AMPs) stand out. Halocins are AMPs synthesized by halophilic microorganisms, such as bacteria and archaea, that inhabit environments with high salinity. Halocin S8 is a microhalocin consisting of 36 amino acids found in a precursor protein of 311 amino acids whose structure and processing is unknown. The aim of the work was to search for halophilic microorganisms from the Canary Islands and to study the possible structure of Halocin S8.

Saline samples were collected from Lanzarote and Tenerife and halotolerant microorganisms of the genus *Staphylococcus*, *Paenibacillus* and the family Propionibacteriaceae were

identified. In addition, structural models of halocin S8 were performed with two bioinformatics tools: i-TASSER and AlphaFold. For the halocin S8 precursor protein, the best model was determined to be the i-TASSER one. This model did not contain disulfide bridges between the precursor and the peptide and its structure was more open, which confers greater accessibility for enzymes and lower metabolic cost for processing the peptide. Finally, it was concluded that for the halocin S8 peptide the best model was the AlphaFold model, because of its high ERRAT score and consensus in predicting the intra-peptide disulfide bridge with another tool (CYS_REC).

Keywords: Halophiles; halocins; antimicrobial peptides (AMPs); halotolerants; disulfide bridges.

Introducción

Los organismos han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse de las diferentes amenazas a las que están expuestos, desarrollando el llamado sistema inmune, que se divide en sistema innato y sistema adaptativo. Dentro de la respuesta inmune innata, los efectores más importantes son los péptidos antimicrobianos (PAMs) (Téllez & Castaño, 2010).

Los PAMs son moléculas que contienen entre 12 y 60 aminoácidos, cuya función principal es mediar la rápida respuesta contra otros organismos como bacterias, parásitos, virus y hongos, por lo que tienen un amplio espectro antimicrobiano (Olascoaga Del Angel et al., 2018). Además, los PAMs son generalmente producidos por distintos tipos de células y tienen variedad de mecanismos de acción (Téllez & Castaño, 2010).

A pesar de que los PAMs han sido denominados de muchas formas, una de las más representativas es la de péptidos catiónicos de defensa del huésped (Olascoaga Del Angel et al., 2018). Este nombre es muy característico porque la mayoría de los PAMs tienen un gran contenido de arginina y lisina en comparación con el de ácido aspártico y ácido glutámico, por lo que su carga neta es positiva. Asimismo, otra de las características más importantes es que tienen gran cantidad de residuos hidrofóbicos (>30%). En cuanto al tamaño, secuencia y la estructura los PAMs pueden ser muy diferentes entre ellos (Rivas Santiago et al., 2006).

Actualmente existen muchos microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos convencionales, un problema que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas como los PAMs (Téllez & Castaño, 2010). A pesar de que los antibióticos se dirigen a actividades celulares específicas, estos péptidos, en cambio, se dirigen a la capa de lipopolisacárido de la membrana celular (Bahar & Ren, 2013). La interacción PAM-membrana se produce por fuerzas electrostáticas entre su residuo amino-positivo y la carga negativa de la membrana del patógeno, por lo que esta interacción depende de la composición de la membrana y de la concentración disponible que haya del PAM (Olascoaga Del Angel et al., 2018). Esto último coloca a las células eucariotas fuera de la diana de muchos PAM por su alto nivel de colesterol y su baja carga aniónica en la membrana (Bahar & Ren, 2013). En el caso de que hubiera interacción PAM-membrana se abren poros en la membrana que generalmente provocan la lisis y muerte del patógeno (Olascoaga Del Angel et al., 2018).

Aunque este es el mecanismo de acción más común de los PAMs, se han descrito otros que se dirigen a la pared celular, otros al ADN, ARN o a moléculas involucradas con la síntesis de las proteínas. Se trata de moléculas con mucho potencial y aplicaciones casi ilimitadas que pueden ser muy prometedoras para su uso contra enfermedades infecciosas (Olascoaga Del Angel et al., 2018).

Según la Antimicrobial Peptide Database (APD), existen 3940 PAMs hasta la fecha (enero 2024), de los que 3146 son naturales, 190 predichos y 314 sintéticos. Con respecto a los PAMs naturales los podemos encontrar en los seis reinos, desde procariotas hasta eucariotas (Bahar & Ren, 2013). Gran parte de estos péptidos naturales pertenecen a las bacterias, denominados bacteriocinas.

Las bacteriocinas son toxinas proteicas producidas por bacterias y ciertas arqueas que inhiben el crecimiento de otras cepas patógenas. Pueden ser de espectro estrecho o amplio, según inhiban cepas de su misma especie o cepas de otros géneros, respectivamente (Worku Negash & Andualem Tsehai, 2020). Además, se ha observado que algunos de estos péptidos poseen mayor actividad que los PAMs de los eucariotas (López M et al., 2008). Normalmente están codificadas por un grupo de 3 genes muy ligados entre sí: un gen para la bacteriocina, otro para una proteína de inmunidad que interactúa con el dominio C-Terminal de la misma bacteriocina, y otro de lisis, que es el que generalmente libera la bacteriocina (Riley, 1998).

Las bacteriocinas se han observado en la mayoría de las especies que componen los grupos de bacterias grampositivas, gramnegativas y arqueas. Se piensa que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina (López M et al., 2008). Mientras que los PAM de bacterias y eucariotas han sido más estudiados, apenas existe información de los producidos por arqueas, los cuales reciben el nombre de arqueocinas. Estas últimas se clasifican en halocinas y sulfolobocinas, según sean producidos por el orden Halobacteriales o el Sulfolobales, respectivamente (Kumar et al., 2021).

Las halocinas son bacteriocinas producidas por microorganismos que habitan ambientes salinos e hipersalinos, por lo que no sólo las producen las arqueas, pues también hay halocinas producidas por bacterias halófilas (Haque et al., 2020). Según su tamaño las halocinas se clasifican en microhalocinas (< 10 kDa), normalmente hidrófobas, tolerantes a bajas concentraciones de sal, al calor y a su almacenamiento a largo plazo; y halocinas

proteicas (> 10 kDa) generalmente más sensibles, en ocasiones llegando a perder su actividad bajo estrés ambiental (Kumar et al., 2021).

La interacción entre los iones hidratados y los residuos ácidos de la superficie de las halocinas, permite la estabilización de la estructura plegada característica de estas proteínas y que sean activas en concentraciones iónicas elevadas, donde otras proteínas bacterianas se desnaturalizan e inactivan. A diferencia de la mayoría de los PAMs, las halocinas son de naturaleza hidrofóbica y/o aniónica, con un contenido alto de residuos cargados negativamente, como aspartato y glutamato, que les confiere mayor resistencia a los disolventes. Sin embargo, esto hace que no sean capaces de formar hélices anfipáticas como muchos PAMs, impidiendo la interacción con las membranas bacterianas cargadas negativamente (Kumar et al., 2021).

Al tratar células con halocinas se deforma la membrana o se inhibe el antiporte Na^+ / H^+ por lo que se producen cambios en el pH interno, el flujo de sodio y protones, el potencial de membrana y la fuerza motriz de protones, lo que conlleva finalmente a la muerte celular (Kumar et al., 2021).

En cuanto a las rutas biosintéticas, sólo se han detallado para unas pocas halocinas, pero una de las características que comparten es que se sintetizan como precursores polipeptídicos que posteriormente se separan para liberar las halocinas maduras, aunque se desconoce la regulación del proceso de maduración y qué enzimas están involucradas en la separación del péptido. Además, los precursores contienen en el extremo N-terminal una secuencia señal TAT reconocida por la vía de Twin Arginine Translocation para exportar los péptidos a través de la membrana celular (Kumar et al., 2021).

Las halocinas han sido útiles para aplicaciones industriales, concretamente en el mantenimiento de alimentos salados por su estabilidad en ambientes hipersalinos (Aparici-Carratalá et al., 2023). Sin embargo, su función en los ecosistemas no está muy bien estudiada. Se cree que las arqueas halófilas sintetizan estas halocinas como un mecanismo de defensa para combatir a los competidores de su comunidad, ya sea por falta de nutrientes o por falta de espacio en el nicho (Ghanmi et al., 2020).

A pesar de saber que pueden llegar a tener cierto interés, no se ha indagado sobre cuál podría ser su función contra patógenos humanos (Lach et al., 2023). Esto último se debe, sobre todo,

a la falta de información sobre estos péptidos y la dificultad que conlleva el cultivo de haloarqueas. Las condiciones de cultivo requieren una alta concentración de sal, que provoca corrosión e impide la posterior purificación de la halocina por cromatografía (Aparici-Carratalá et al., 2023).

Actualmente sólo se conocen las secuencias de aminoácidos (Tabla 1) y nucleótidos de las halocinas H4, C8 y S8. La halocina H4 es una halocina proteica que contiene 313 aminoácidos. En cambio, las halocinas C8 y S8, también denominadas microhalocinas, son similares a las pequeñas bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas, que suelen ser más resistentes a altas temperaturas y disolventes orgánicos (Kumar et al., 2021).

Tabla 1. Secuencias de las proteínas precursoras de las halocinas H4, S8 y C8.

Halocina	Secuencia de proteína precursora	Regiones de la proteína precursora
H4	MSKDRDGRRT SRRGTLKKIG GFSLGALSFG AVGRTQAATG	Péptido señal: 1-46 aa, 46 aa Halocina H4 madura: 47-359 aa, 313 aa
	SSVTTADIAP PGPNGDPKSV QIDDKYTGAE MYGEGDFRVG	
	LGTDLTMYPP VYRESLGNGS GGWEFDFTVC GSTACRFVDS	
	NGDVKEDDKA KEMWWQEINF NDINQDLYSR NDSDWVGSTP	
	ADTQPEFDYT EFALARDGVT LALTALNPAM GSLALGATYF	
	LSDMVNWIAS QHEDDSSLKR KWDYDGLSGP LYADSSTYLL	
	ARDEMTSNSY ESFTIDNIAV AFPEFPVVRTK YYVTFTAPDD	
	PSTQSISTLE EEGIYRVPAT EVAAARPPGS RRSKSAADEM	
	VYVADPKKFI EVEPVKNPSI PDRIYEEIEQ KKKQSRKQ	
	MSDKDSINRR NVLRKIGGIG VASAVGFSGL ASGESLSDDE	
KQDVIDTIYK SQRVEQIKKK FGGVNIEPKK VQSVTTNQSG		
DLVTAKLSVS DGDLYVSSVK DTTVIVQFDR SASEIGESWP		
KNTEAFIKST SSGVDLLRTA TDEEIKDVTE GVNTSEIESA		
DAVNI FIDPE SQTYYMEKYD FNNKVLEMF E LATGGTSSGK		
ISPTREDQNH EYNVREHKVF NSEKQNIQLQ SDCNINSNTA		
ADVILCFNQV GSCALCSP TL VGGPVPTVAC LLVVCFGTPN		
AVSAILEEVD NSCFNLIKDV ISCWDEWTSF W		
MKEDNNTSEE SGRINRRNVL KTVGAAGLFA AGSTGMAAAA	Péptido señal: 1-207 aa, 207 aa Halocina C8 madura: 208-283 aa, 313 aa	
DSLSQAE EPK LLTGTEKRTL ARELAKTPAF RELAQRARAD		
GAQIRSDADS IVAGYARGED FAREVVQYDL ENLTDAAEAS		
IVIGRNPETG EIEVANLDYY YETDDGVLDE VHRFEPTNAS		
ETDGVQSAAT SDGATVIAVD TDAIREAQNS EIDVDESSPS		
NAAPT PADID ITGCSACKYA AGQVCTIGCS AAGGFICGLL		
GITIPVAGLS CLGFVEIVCT VADEYSGCGD AVAKEACNRA		
GLC		

Teniendo en cuenta que el interés del grupo de investigación del IPNA-CSIC es la síntesis de pequeños péptidos, la halocina S8 es la más indicada para su investigación puesto que tiene, prácticamente, la mitad de aminoácidos que la C8.

La halocina S8 está compuesta por 36 aminoácidos, tiene un peso molecular de 3,6 kDa y fue la primera microhalocina descubierta. Este péptido es resistente a la tripsina y diversos

disolventes orgánicos, pero sensible a la proteinasa K, tiene un pI de 3,6 con casi un 50% de residuos hidrofóbicos, abundantes residuos polares neutros, pocos cargados negativamente y 4 residuos de cisteína. Además, mantiene su actividad a 4 °C en ausencia de sal durante varios meses y es termoestable hasta 94 °C (Kumar et al., 2021).

La halocina S8 es el resultado de la rotura de una proteína precursora de 311 aminoácidos y 34 kDa cuyo gen, halS8, se encuentra en un megaplásmido en la cepa S8a. La fragmentación de esta proteína tiene como resultado una proteína N-terminal de 230 aminoácidos que contiene la secuencia de señal TAT, la halocina madura de 36 aminoácidos y una proteína C-terminal de 45 aminoácidos. Se cree que la función de la proteína N-terminal podría ser proteger a la halobacteria productora del propio efecto de la halocina madura (Kumar et al., 2021).

La halocina S8 ha sido detectada en nueve halobacterias: *Haladaptatus cibarius*, *Haloferax larsenii*, *Haloterrigena daqingensis*, *Haloterrigena jeotgali*, *Haloterrigena saccharevitans*, *Halovirax ruber*, *Natrialbaceae archaeon*, *Natrinema pellirubrum* y *Natronococcus occultus*) (Kumar et al., 2021).

Los organismos halófilos que producen estos péptidos se denominan así por su capacidad para crecer y evolucionar en ambientes con altas concentraciones de sales (Incerti & Ramos Cormenzana, 1996). Algunos ejemplos de estos ambientes son las salinas solares, los lagos hipersalinos, suelos salinos y el agua de mar, es decir, medios extremófilos (Incerti & Ramos Cormenzana, 1996).

Los halófilos se clasifican según la concentración de sal que soporten en: débiles (1%-3%), moderados (3%-15%) y extremos (15%-30%). Éstos últimos se consideran microorganismos extremos al desarrollarse en ambientes hipersalinos (Cruz Luna, 2021). Aunque esta clasificación se hace en función del nivel de NaCl, porque es la más abundante en estos ambientes, hay algunos microorganismos que requieren de iones específicos para su óptimo crecimiento (Babiano Casasola, 2022).

Entre los halófilos extremos existen microorganismos muy diversos, que soportan condiciones muy variadas, no solo de salinidad sino también de acidez o alcalinidad, temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, luminosidad, entre otras (Babiano Casasola, 2022). En los ambientes con salinidad extrema predominan las arqueas, y a medida que la

concentración de sal es más moderada, la población de arqueas van disminuyendo a la vez que aumenta la de las bacterias. En ambientes con salinidad menor al 10% predominan las bacterias. En cuanto a los microorganismos eucariotas, éstos son muy escasos en concentraciones mayores del 5% (Valdez Gastélum, 2014).

La pared celular de las bacterias halófilas está compuesta por peptidoglucano por lo que soportan altas presiones, impidiendo la lisis celular. Existen bacterias halófilas pertenecientes al grupo de Gram-positivas como al de Gram-negativas. Algunas especies tienen bacteriorrodopsina y otras producen sus propios carotenoides, que les protege de la radiación solar. La temperatura óptima de crecimiento de las bacterias halófilas está alrededor de los 50 °C (Cruz Luna, 2021).

A diferencia de las bacterias, la pared celular de las arqueas está compuesta por una capa paracrística llamada capa S, donde no está presente el peptidoglucano, otorgando resistencia a las lisozimas y a la penicilina. Además, los lípidos de las membranas de arqueas contienen enlaces éter en vez de éster, otorgándole mayor resistencia. Hay arqueas halófilas que forman colonias blanquecinas, pero hay otras que contienen carotenoides en la membrana que producen pigmentos rojizos llamados bacterioruberinas. En el caso de las arqueas la temperatura óptima de crecimiento suele ser de 37 °C (Cruz Luna, 2021).

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la búsqueda de microorganismos halófilos de Canarias y el estudio de la posible estructura de la halocina S8.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Cultivar microorganismos a partir de muestras de sal de Lanzarote y Tenerife.
- Determinar qué microorganismos se encuentran en los ambientes hipersalinos de Lanzarote y Tenerife.
- Realizar un análisis estructural tanto de la proteína precursora como de la propia halocina S8.

Material y métodos

Microorganismos halófilos

El trabajo de campo se realizó en febrero de 2024 en la Laja del sol (29° 05' 31.4" N 13° 41' 27.9" W, 19 °C y 1 msnm) situada en la localidad de la Santa en el municipio de Tinajo, Lanzarote, Canarias (Figura 1). La Laja del Sol es un lugar de naturaleza volcánica en el que se crean pequeños charcos de agua marina, donde el agua se evapora y se deposita la sal.



Figura 1. Sitio de estudio y recolección de muestras en Lanzarote.

Se recogieron muestras de seis charcos diferentes de la zona, usando tubos de centrífuga de 15 mL estériles, pipetas Pasteur, hisopos y una espátula de metal esterilizada en el momento de la recolección. En cada uno de los charcos se recogió una muestra de sal de aproximadamente 2-3 g, un volumen de agua de aproximadamente 10 mL y se hizo un raspado de la superficie rocosa del charco con un hisopo (Figura 2).



Figura 2. Muestras recolectadas en Lanzarote.

La segunda recogida de muestras fue en abril de 2024 en Radazul (28° 24' 06.0" N 16° 19' 36.6" W, 20°C, 1 msnm), municipio El Rosario, Tenerife, Canarias (Figura 3). En este caso se recogieron muestras en tubos Eppendorf de 1,5 mL de dos charcos diferentes, pero únicamente de sal.

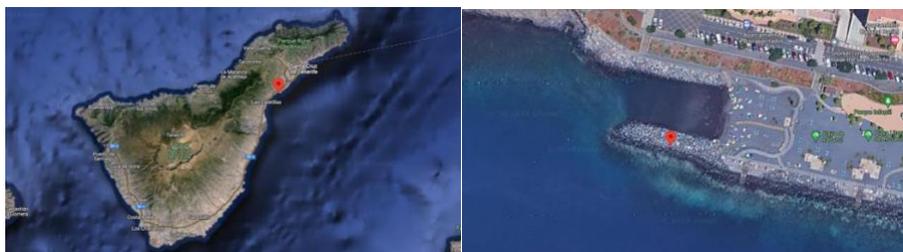


Figura 3. Sitio de estudio y recolección de muestras en Tenerife.

Posteriormente, cada una de las muestras fue cultivada tanto en medio sólido como en medio líquido. Se utilizó Agar Soja-Trypticaseína (TSA) y Caldo Soja Trypticaseína (TSB) respectivamente, ambos con una concentración final de un 25% de NaCl (Cruz Luna, 2021). Para la manipulación de los microorganismos se usó una cabina de flujo laminar “Captair” tipo 2005 HPS a 220 V-Hz (Cruma, Barcelona, España). Las muestras de agua y sal de cada charco se mezclaron, excepto una de Lanzarote y las dos de Tenerife, que contenían sal totalmente evaporada. Para el cultivo en medio líquido se inocularon 100 μ L de muestra en 2 mL de cultivo y para el medio sólido se hizo una cuadrícula en una placa de Petri y se depositaron 20 μ L en cada uno de los cuadrantes (Figura 4). En el caso de las muestras que no contenían agua, la metodología consistió en la adición de 10 mL de agua destilada estéril a las muestras de sal recogida en los tubos de centrifuga de 15 mL, añadiendo posteriormente 100 μ L de esta solución a 2-3 mL de medio de cultivo líquido. Para la muestra de Lanzarote se tomaron 20 μ L para depositarlos en la cuadrícula y en el caso de las muestras de Tenerife éstas se mezclaron y se añadió 300 μ L a una placa de Petri con medio sólido.

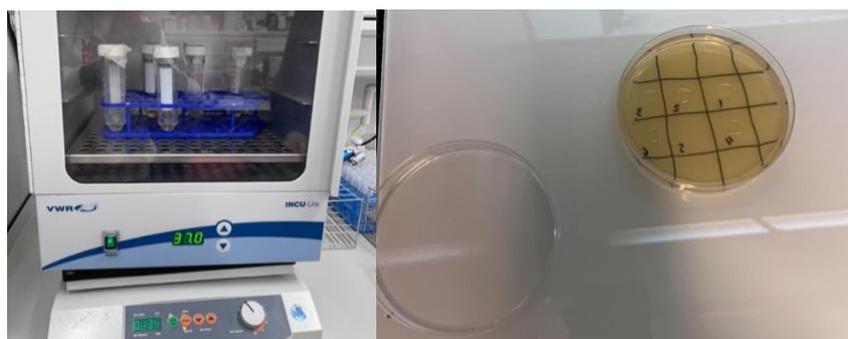


Figura 4. Cultivo e incubación de las muestras recogidas en TSA y TSB enriquecido con un 25% de NaCl

Además, tras realizar los cultivos de las muestras de Lanzarote por separado, también se hizo un cultivo en medio sólido de una mezcla de todas las muestras. Se añadió 1 mL de cada una de las muestras a un tubo Falcon de 50 mL, se mezcló bien y se sembraron 300 μ L de la mezcla por el método de extensión en una placa de Petri. Finalmente, los cultivos se incubaron a 37 $^{\circ}$ C con agitación durante 2 semanas (Rodríguez-Valera et al., 1979).

De estos cultivos, concretamente de los que se encontraban en medio líquido, pasadas las dos semanas se realizó un cultivo en medio sólido de aquellas muestras que mostraban turbidez con el fin de aislar colonias. Para ello, se realizó una siembra por agotamiento en placa de Petri y se volvió a incubar a 37 $^{\circ}$ C durante otras dos semanas.

Tras realizar los cultivos, el siguiente paso fue la identificación de las colonias que habían crecido mediante la secuenciación parcial del gen 16S rARN, para esto se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, para la extracción de ADN se utilizaron colonias aisladas de los cultivos sólidos. Con una punta estéril se fue recogiendo una muestra de cada colonia, que se depositó en un tubo Eppendorf de 0,2 mL con 12 µL de agua de calidad de biología molecular y se agitó la suspensión hasta obtener homogeneidad. Para llevar a cabo la lisis los microorganismos éstos se calentaron a 98 °C durante 5 minutos y se centrifugaron. Posteriormente se conservó el sobrenadante con el ADN y se realizaron dos PCRs para cada cultivo.

En la primera PCR se amplificó un fragmento del gen 16S rARN, usando el siguiente par de cebadores específicos para bacterias (Cruz Luna, 2021). Con estos cebadores el amplicón generado era de 1500 pb:

- fD1 5' - CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'
- rD1 5' - CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC - 3'

Tabla 2. Composición de las mezclas finales de PCR para cada una de las colonias.

Compuesto	Cantidad
5X PHIRE Reaction Buffer	4 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
Cebador Forward	1 µL
Cebador Reverse	1 µL
Polimerasa Phire	0,4 µL
H ₂ O	3,2 µL
ADN	10 µL
Volumen final	20 µL

En la Tabla 2 se describen las cantidades utilizadas para la PCR con su volumen final según el manual aportado por el fabricante (Thermo Fisher Scientific™). Se utilizó la Phire Hot Start II ADN Polimerasa de Thermo Scientific™ (Massachusetts, Estados Unidos) por su rapidez, eficacia y resistencia a inhibidores. Para la amplificación se utilizó el Termociclador de Gradiente "Multigene Optimax" bajo las condiciones descritas en la Tabla 3, también aportadas por el fabricante (Thermo Fisher Scientific™) en el manual del producto.

En la segunda PCR se amplificó un fragmento del gen 16S rARN también, pero en este caso, con unos cebadores específicos para arqueas (Cruz Luna, 2021). El amplicón generado en este caso era de 806 pb:

- SSU1ArF 5' - TCCGGTTGATCCYGCBRG -3'
- 806rB 5' - GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3'

Tabla 3. Condiciones para realizar la PCR utilizando cebadores específicos para bacterias.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98 °C	30 segundos	1
Desnaturalización	98 °C	5 segundos	25-35
Anillamiento + Extensión	72 °C	25 segundos	
Extensión final	72 °C	1 min	1
	4 °C	Mantener	

Las cantidades utilizadas fueron las mismas que en la primera extracción, mostradas en la Tabla 2, pero las condiciones de la PCR en este caso fueron distintas (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones para realizar la PCR utilizando cebadores específicos para arqueas.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98 °C	30 segundos	1
Desnaturalización	98 °C	5 segundos	25-35
Anillamiento	55 °C	5 segundos	
Extensión	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	1 minuto	1
	4 °C	Mantener	

A continuación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1%, con 150 mL de gel y 15 µL de colorante Gel Green Nucleic Acid Stain de la marca Milipore Corporation (Darmstadt, Germany). Se utilizó el marcador de ADN O' gene ruler de Thermo Scientific™ (Massachusetts, Estados Unidos). Para las muestras se tomaron 8 µL del producto PCR que se mezclaron con 5 µl de tampón de carga 5X ADN loading buffer, de la marca Avantor™ (Radnor, Pensilvania, EEUU). El gel de electroforesis se conectó a 100 V durante 1,5 horas aproximadamente. Al finalizar las electroforesis se visualizaron las muestras en un transiluminador de luz azul de la marca NIPPON GENETICS (Düren, Alemania): Para la purificación del ADN del producto PCR se usó el kit mi-PCR PURIFICATION KIT 250 RXNS. Para la purificación de ADN del gel se usó el kit mi-Gel Extraction Kit, ambos de la marca Metabion (Planegg, Alemania).

Para la secuenciación de ambas cadenas se usaron 10 μ l de ADN procedentes de cada colonia, que se mezclaron con 0.5 μ l de cebadores reverse o forward, en cada caso. Por último, las muestras fueron enviadas a la empresa Secugen S.L. (Madrid, España).

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa SnapGene software y a partir de las éstas se hizo un Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la base de datos non-redundant (nr) estándar y la opción para secuencias muy similares.

Análisis estructural de la halocina S8

Para el modelado de la estructura terciaria de las proteínas y péptidos se usaron las herramientas AlphaFold (Mirdita et al., 2022) e I-TASSER (J. Yang & Zhang, 2015). Se realizó un modelo de la estructura tanto de la proteína precursora del péptido como de la propia halocina S8. Estos programas utilizan estructuras de proteínas ya conocidas para realizar predicciones de la estructura de proteínas que aún no han sido determinadas experimentalmente.

Cada uno de los modelos obtenidos se evaluó mediante el servidor ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) que puntúa la calidad de las estructuras generadas, otorgando un valor según sea de menor o mayor calidad (0-100), analiza las estadísticas de las interacciones no enlazadas entre diferentes tipos de átomos y traza el valor de la función de error frente a la posición de una ventana deslizante de 9 residuos, calculada por comparación con las estadísticas de estructuras altamente refinadas. Se trata de una herramienta muy fiable utilizada para evaluar las estructuras determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X.

Además, se utilizó el software UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) para generar gráficos de Ramachandran, que nos permite determinar cuántos residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura secundaria determinado, y cuántos presentan unos ángulos de torsión forzados de acuerdo con la estructura de la proteína de la que disponemos. Exceptuando las glicinas, cuantos más residuos presenten ángulos forzados y fuera de las áreas permitidas, más probable será que la estructura no sea la más adecuada.

Para visualizar la estructura de los modelos se utilizó el software UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021). El análisis estructural consistió en los posibles puentes disulfuro que podrían formar el péptido halocina junto con la proteína precursora y también los del péptido sólo. Para ello se utilizó la herramienta online de [Softberry](#), denominada [CYS_REC](#), que realiza predicciones de la formación y localización de puentes disulfuro dentro de una proteína, así como la medición manual de las distancias entre los azufres (S) de los residuos de cisteína en las estructuras 3D visualizadas con ChimeraX.

Resultados y discusión

Microorganismos halófilos

En los cultivos en medio líquido pertenecientes a las muestras de Lanzarote se observó algo de turbidez en dos de ellos tras 2 semanas, pero al pasarlos al medio sólido no hubo ningún tipo de crecimiento, por lo que no se pudieron aislar colonias. A pesar de esto, en el posterior cultivo en medio sólido, que contenía la mezcla de todas las muestras, sí que hubo un crecimiento significativo, donde las colonias estaban bien aisladas (Figura 5).

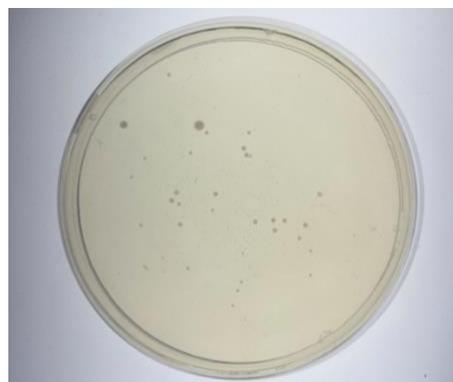


Figura 5. Cultivo en TSA de una mezcla de todas las muestras recogidas en Lanzarote tras 3 semanas de incubación a 37 °C.

Del cultivo observado en la Figura 5 se obtuvieron 34 colonias, de las cuales sólo 4 dieron positivo en la PCR con los cebadores específicos para bacterias. Los amplicones generados tuvieron un tamaño aproximado de 1500 pb, correspondiente al tamaño descrito por Cruz Luna (2021). Para el resto de las PCR, incluidas aquellas con los cebadores específicos de arqueas, los resultados obtenidos en la secuenciación no fueron concluyentes y no se pudo identificar ninguna de las colonias (Figura 6).

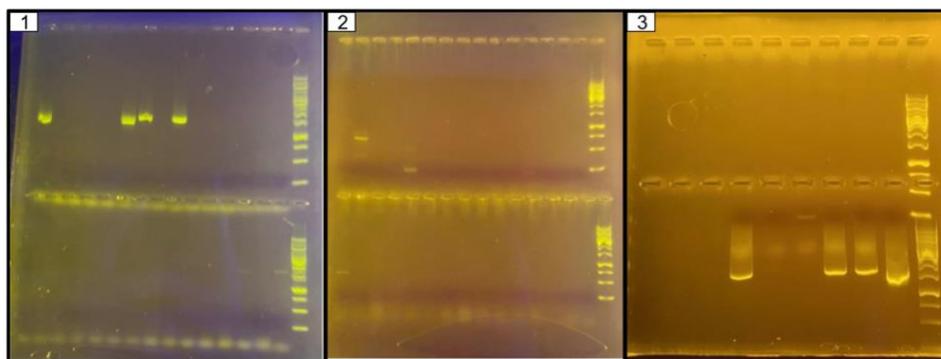


Figura 6. Electroforesis resultante de la PCR de las muestras de Lanzarote: 1) con cebadores específicos para bacterias; 2) con cebadores específicos para arqueas; 3) en la parte superior del gel se muestran las PCR de las colonias restantes con cebadores específicos para arqueas y en la parte inferior aquellas PCR restantes con cebadores específicos de bacterias.

Debido a estos resultados se volvieron a realizar todas las PCR para comprobar que el resultado fuera el mismo. Sin embargo, las electroforesis obtenidas fueron muy diferentes a las primeras, siendo todas ellas negativas o no concluyentes, dado que no contábamos con un control positivo para la PCR (Figura 7).

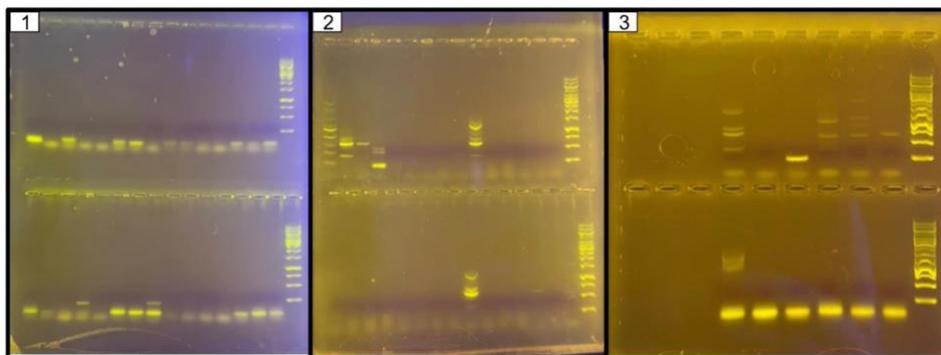


Figura 7. Electroforesis resultante de la segunda PCR de las muestras de Lanzarote: 1) con cebadores específicos para bacterias; 2) con cebadores específicos para arqueas; 3) en la parte superior del gel se muestran las PCR de las colonias restantes con cebadores específicos para arqueas y en la parte inferior aquellas PCR restantes con cebadores específicos de bacterias.

A pesar de esto, el producto PCR de las 4 colonias que habían dado un resultado positivo en la primera electroforesis de bacterias (Figura 6) se purificó con el kit mi-PCR y se mandó a secuenciar a la empresa Secugen S.L. En el cromatograma de las secuencias obtenidas también se observaron anomalías, como dobles picos y resultados confusos, por lo que fueron editadas manualmente, quedando como se observa en la Figura 8.

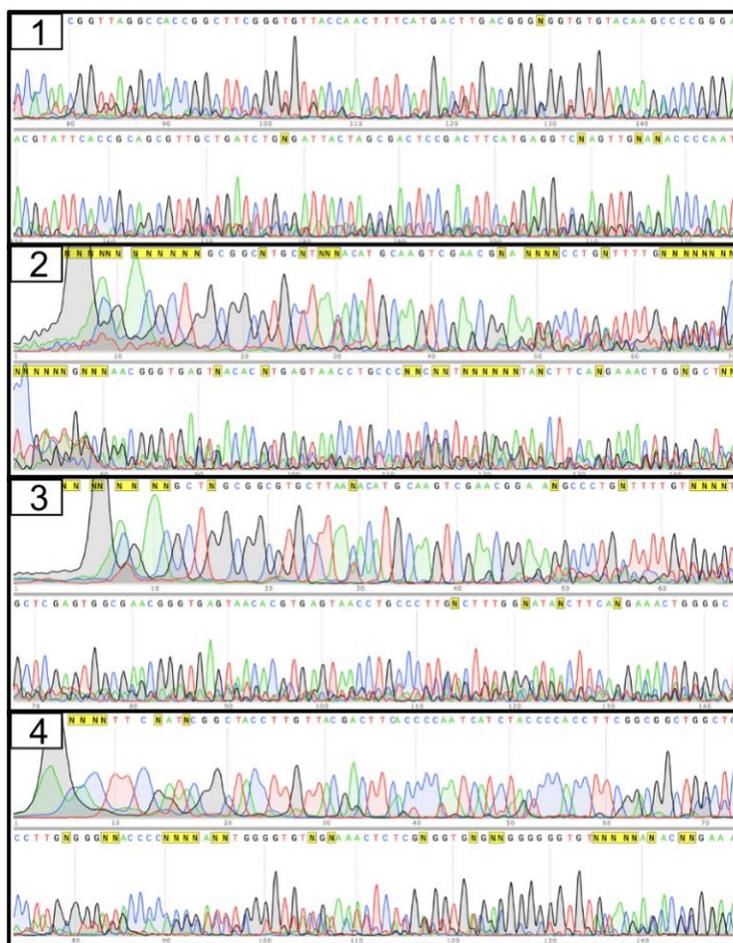


Figura 8. Secuencias de las colonias positivas en la PCR de las muestras recolectadas en Lanzarote.

Con respecto a las muestras de Tenerife se observó un crecimiento tanto en medio líquido como en medio sólido (Figura 9) de la mezcla de ambas muestras. En total se recogieron 18 colonias aisladas y se realizaron PCRs, tanto con cebadores de bacterias como con cebadores de arqueas.

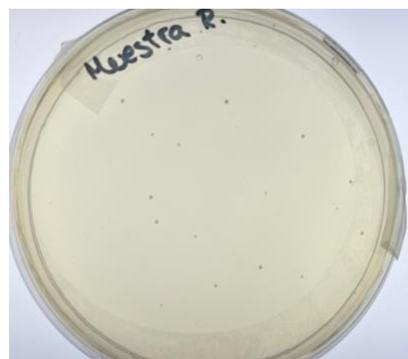


Figura 9. Cultivo en TSA de las muestras de los 2 charcos recogidas en Tenerife tras 2 semanas de incubación a 37 °C

En la Figura 10 se observa el resultado final de la electroforesis. Para los cebadores específicos de arqueas se obtuvieron bandas positivas en dos colonias, mientras que para los cebadores de bacterias las bandas obtenidas no estaban muy definidas. Los amplicones generados fueron de aproximadamente 1000 pb, valor similar al descrito en Cruz Luna (2021). En este caso la purificación del producto PCR se realizó con el mi-Gel Extraction Kit puesto que,

además del producto de PCR, se observaban bandas residuales en algunas muestras y era necesario cortar el gel y aislar las bandas específicas. La presencia de bandas adicionales en los productos de PCR es posible que sean resultado de la poca especificidad de los cebadores usados, ya que, por ejemplo, para el caso de arqueas se trataban de cebadores degenerados en sus extremos 3`.

En la Figura 10 podemos observar cómo una de las bandas, aunque de manera tenue, aparecía en la PCR con cebadores específicos para arqueas, pero mostraba un resultado negativo en la PCR con cebadores específicos para bacterias, por lo que se podría intuir que esa colonia era una arquea.

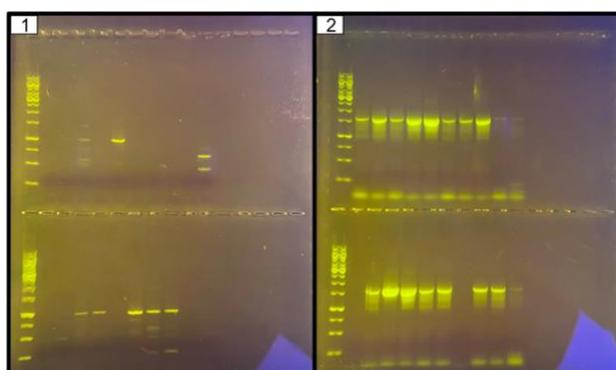


Figura 10. Electroforesis de las PCR con las muestras de Tenerife. 1) PCR con cebadores específicos para arqueas de las 18 colonias. 2) PCR de las 18 colonias, pero con cebadores específicos para bacterias.

Teniendo en cuenta el resultado de la PCR con cebadores de bacterias, se repitió otra PCR, pero en este caso se le dieron 5 ciclos menos para comprobar si el resultado obtenido fue debido a que había mucho producto de amplificación, que incluyese productos de PCR menos específicos. Además, también se realizó otra PCR con cebadores específicos de arqueas de las colonias que tuvieron un resultado positivo, con el objetivo de tener mayor cantidad de producto PCR para su purificación, y de la colonia que dio negativo en la PCR con cebadores específicos de bacterias, con el fin de obtener material necesario para su purificación, puesto que el ADN obtenido de la banda anterior no era suficiente.

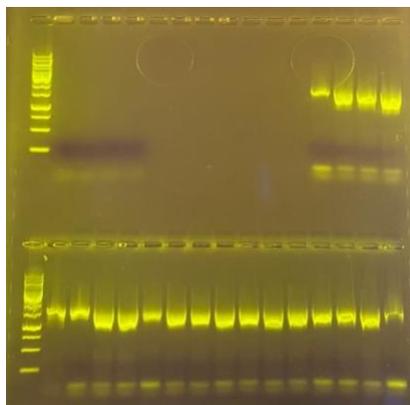


Figura 11. Electroforesis resultante de las PCR repetidas para las muestras de Tenerife. En los pocillos 2, 3 y 4 se encuentran las muestras de la PCR con cebadores de arqueas. A partir del pocillo 13 comienzan las muestras de las PCR de bacterias, exceptuando el primer pocillo inferior correspondiente al marcador de peso molecular y al último pocillo inferior que se corresponde con el control negativo.

Como podemos observar en la Figura 11, las PCR con cebadores específicos para arqueas dieron negativo para las 3 colonias, pero en el caso de las PCR con cebadores específicos de bacterias se obtuvieron bandas más claras en algunas de las colonias. De este gel se cortaron las bandas de 4 colonias de las PCR con cebadores de bacterias para su purificación utilizando el método anterior, el mi-Gel Extraction Kit.

Finalmente se mandaron a secuenciar ambas cadenas de un total de 6 muestras pertenecientes a Tenerife. En este caso las secuencias que se obtuvieron fueron muy buenas (Figura 12) con unos cromatogramas que mostraban picos bien diferenciados, al contrario que las anteriores.

Con cada una de las secuencias, tanto las pertenecientes a Lanzarote, como las de Tenerife, se realizó un Nucleotide BLAST en la base de datos del NCBI para determinar a qué organismos pertenecían.

En la Tabla 5 se plasman los organismos identificados en las muestras recogidas. La asignación en cada caso se realizó teniendo en cuenta el valor más bajo de E-value obtenido en el BLAST. Diferentes trabajos mencionan la existencia de muchas especies de *Staphylococcus* halotolerantes, capaces de desarrollarse en ambientes con una concentración de NaCl del 25% (Daoud et al., 2013; Komaratat & Kates, 1975; Nanjani & Soni, 2014; Scybert et al., 2003) y en las muestras estudiadas se encontraron 3 especies diferentes de este género en Tenerife, algunas descritas en la literatura como halotolerantes (Komaratat & Kates, 1975) y otras, como *S. hominis* y *S. pasteurii* que, aunque no existan evidencias de su

existencia en ambientes halófilos, lo más probable es que también sean capaces de tolerar altas concentraciones de sal.

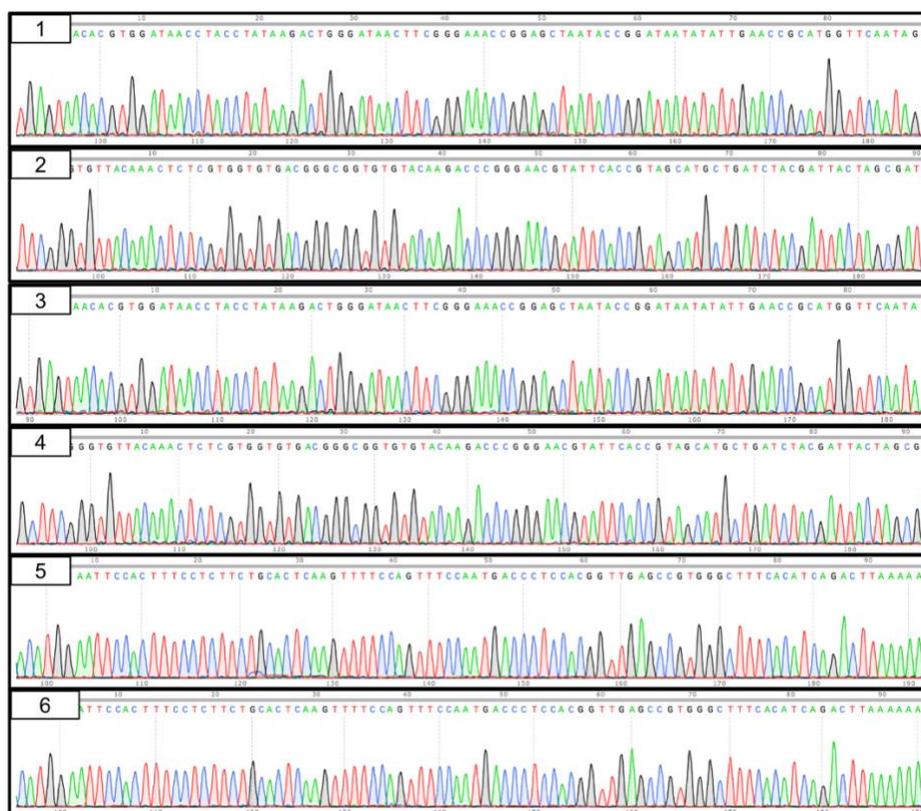


Figura 11. Secuencias de las colonias positivas en la PCR de las muestras recolectadas en Tenerife.

Además, en Lanzarote se identificaron dos organismos halotolerantes que pertenecen a la familia Propionibacteriaceae y existen estudios que corroboran que algunas especies de esta familia tienen capacidad para crecer en concentraciones entre 10-60 g/L de NaCl (Marshall & Odame-Darkwah, 1995). Por último, también se identificó una especie del género *Paenibacillus*, cuyo crecimiento según la literatura es en medios con una concentración de sal entre 2,9% y 14,6% (Sokhansanj et al., 2005), aunque también se han aislado especies de lagos salinos (L. Yang et al., 2021) por lo que podría tratarse de una especie que, con el tiempo, se ha adaptado a unas concentraciones de sal mucho más altas.

Tabla 5. Microorganismos identificados en el estudio mediante la secuenciación del 16S rARN.

Microorganismo	E-value	Localización	Referencia
<i>Cutibacterium acnes</i>	0	Lanzarote	Marshall & Odame-Darkwah (1995)
Uncultured <i>Propionibacterium</i> sp.	3*E-47	Lanzarote	Marshall & Odame-Darkwah (1995)
<i>Paenibacillus</i> sp.	2*E-21	Lanzarote	Sokhansanj et al. (2005)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	Tenerife	Komaratat & Kates (1975)
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	Tenerife	Daoud et al. (2013)
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0	Tenerife	Daoud et al. (2013)

Análisis estructural de la halocina S8

Dado que la estructura y el procesamiento de la proteína precursora y la halocina S8 se desconocen. A partir de la secuencia de la proteína precursora del péptido (Tabla 1) se generaron modelos con dos programas diferentes: AlphaFold e iTASSER. Cada uno aportaba 5 modelos diferentes, el criterio de elección en cada uno de los programas era diferente. AlphaFold realizaba automáticamente una clasificación donde el mejor modelo se encontraba en el “ranking 1”. En el caso de i-TASSER, este programa utiliza el “C-score” que adquiere valores entre -5 y 2. Cuanto mayor sea este valor, mayor confianza tendrá ese modelo. Se volvió a realizar el mismo procedimiento, pero con la secuencia del péptido de la halocina S8.

En la Figura 13 se observa el modelo elegido para la proteína en AlphaFold, con la prueba de distancia global (GDT), que compara las predicciones del programa con otras estructuras determinadas experimentalmente. Una puntuación de 100 significa una coincidencia completa.

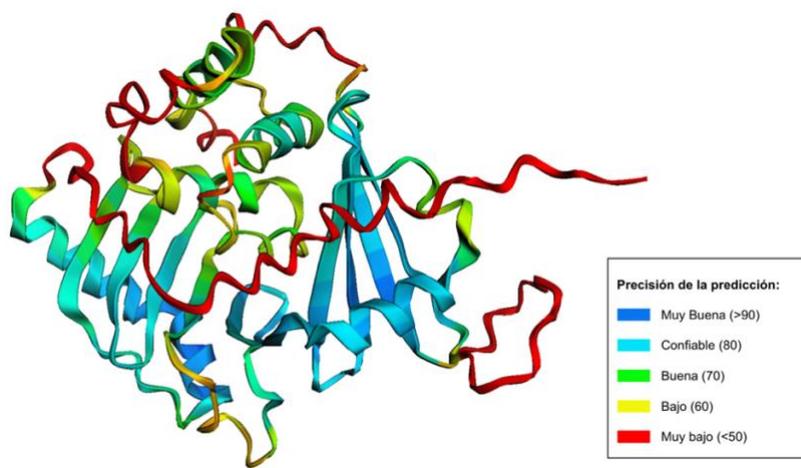


Figura 13. Predicción de la estructura de la proteína precursora del péptido de la halocina S8 por AlphaFold donde se indica el nivel de precisión según la zona de la proteína.

Además, mediante el software ChimeraX se ubicó el péptido dentro de esta estructura (Figura 14) y si comparamos las dos figuras se puede observar cómo el péptido se encuentra en regiones donde la predicción es buena o confiable en su mayoría, aunque también se encuentra en alguna pequeña región donde la precisión es muy baja (Figura 13). Se realizó también un análisis de los puentes disulfuro que se podrían formar entre el péptido y la proteína precursora, teniendo en cuenta las distancia entre átomos de azufre de las cisteínas. Según Garduño Jiménez (2017) se forman puentes disulfuro cuando la distancia es menor de 2.1 Å. Según este modelo de AlphaFold, entre la proteína y el péptido se formarían 3 puentes disulfuro, es decir, 3 de las cisteínas que forman el péptido maduro tendrían una unión covalente con el resto de la proteína precursora de la halocina S8 (CYS 253-275; CYS 256–270; CYS 293–246).

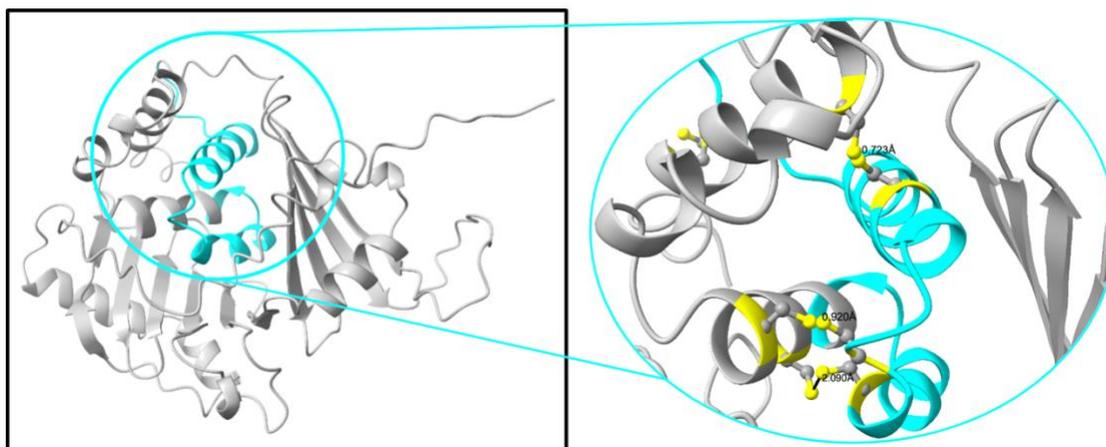


Figura 14. Predicción de la estructura de la Proteína precursora de la halocina S8 por AlphaFold con el péptido marcado en color azul cian. En amarillo se marcan las cisteínas presentes y en negro la distancia que tienen los puentes disulfuro que se formarían entre el péptido y la proteína precursora.

Para el modelo de i-TASSER difiere del obtenido al del AlphaFold, como se muestra en la Figura 15. El análisis de los posible puentes disulfuro entre el péptido y la proteína precursora también era muy diferente, ya que las cisteínas más cercanas mostraban una distancia de 6.98 Å. En este caso el péptido no formaría puentes disulfuro con la proteína precursora.

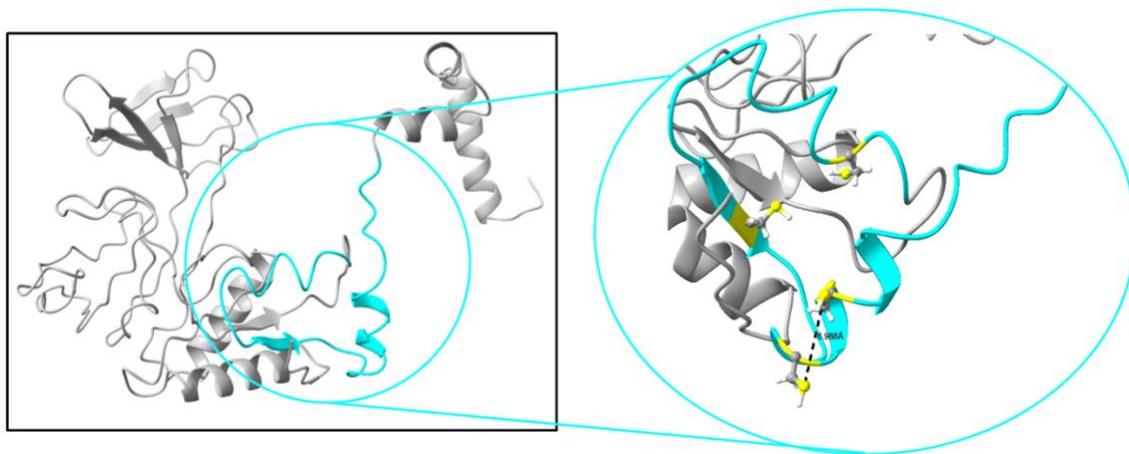


Figura 15. Predicción de la estructura de la proteína precursora de la halocina S8 por i-TASSER con el péptido marcado en color azul cian. En amarillo se marcan las cisteínas presentes y en negro la distancia de los azufres más cercanos.

En primer lugar, estos dos modelos se compararon con la herramienta ERRAT. El modelo de AlphaFold tuvo una puntuación de 67.61 sobre 100 y el de i-TASSER de 91.13 por lo que según esta herramienta el modelo de i-TASSER tendría una mayor calidad y podría corresponderse con la estructura real que adoptaría esta proteína en su conformación nativa, o de mínima energía.

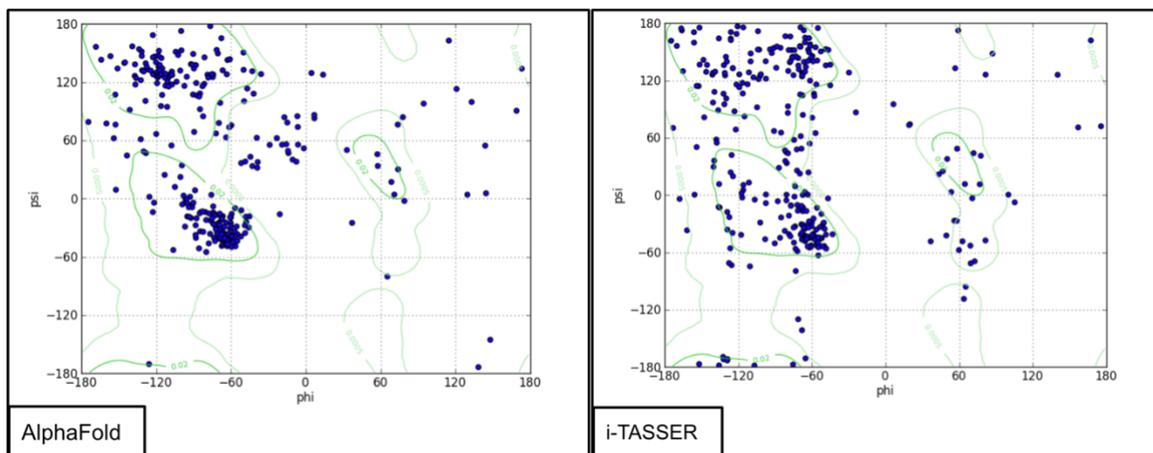


Figura 16. Gráficos Ramachandran de los modelos de la proteína precursora de la halocina S8 generados con el software Chimera X, a la izquierda el gráfico correspondiente al modelo de AlphaFold y a la derecha el correspondiente a i-TASSER.

En segundo lugar, también se realizaron gráficos Ramachandran de ambos modelos. En la Figura 16 se observa cómo estos gráficos corroboran la puntuación del ERRAT, puesto que en el gráfico correspondiente al AlphaFold encontramos 39 aminoácidos fuera de las zonas

correspondientes a las estructuras secundarias, mientras que en el gráfico del modelo de i-TASSER el número de aminoácidos fuera de estas zonas es 13, mucho menor.

Además de estos resultados hay que tener en cuenta que en el modelo de i-TASSER la estructura de la proteína es más abierta, lo que facilitaría la interacción de una posible enzima con actividad proteasa para la escisión del péptido. Para visualizarlo mejor se realizó un estudio de la superficie de ambos modelos donde se observa cómo el péptido en el modelo de AlphaFold se encuentra ubicado en el interior de la proteína, dificultando el acceso a una posible enzima (Figura 17).

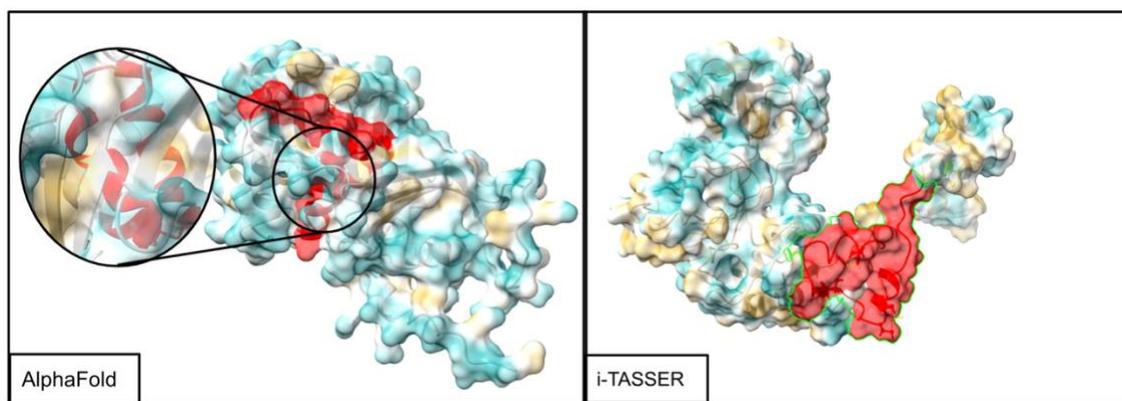


Figura 17. Representación de la superficie de los modelos de la proteína precursora de la halocina S8 generada en el software Chimera X. A la izquierda el modelo proporcionado por AlphaFold y a la derecha el modelo de i-TASSER.

El modelo de i-TASSER tampoco contiene puentes disulfuro, a diferencia del modelo de AlphaFold, que al tener 3 puentes disulfuro entre la proteína y el péptido se necesitarían dos tipos de enzimas: una proteasa, para liberar el péptido de la cadena de la proteína precursora, y una oxidorreductasa para romper las uniones existentes entre las cisteínas, por lo que el procesamiento de este péptido sería más complejo. Debido a estos resultados y a las razones descritas anteriormente, la estructura del modelo del i-TASSER parece ser la más aproximada, por su simplicidad y menor impedimento estérico de la posible enzima asociada a la liberación del péptido halocina S8, y un menor coste metabólico asociado dicho procesamiento.

En cuanto al análisis de la posible estructura de la halocina S8, también se usaron las dos herramientas utilizadas anteriormente (Figura 18). En el modelo de AlphaFold las cisteínas 16 y 26 del péptido maduro formaban un puente disulfuro. En cambio, en el modelo de i-

TASSER son las cisteínas 3 y 16 las que forman esta unión. Según la herramienta ERRAT el modelo de AlphaFold obtuvo una puntuación de 70.37 sobre 100 y el modelo de i-TASSER de 35.71.

Para refinar más la elección del modelo más adecuado se utilizó la herramienta CYS_REC, cuya predicción se realiza a partir de la estructura primaria del péptido, utiliza matrices de ponderación construidas a partir de ejemplos positivos y negativos y realiza una matriz de probabilidades basada en la estructura secundaria predicha (www.softberry.com). CYS_REC estipuló que de las 4 cisteínas que contiene el péptido maduro, la que se encuentra en la posición 16 es la que más probabilidad tiene para formar un puente disulfuro, y que el patrón de parejas más probables fueron la cisteína 3 con la 23 y la cisteína 16 con la 26. Ninguno de estos patrones coincide con los posibles puentes disulfuro predicho en el modelo de i-TASSER, pero sí que uno de los puentes probables, la cisteína 16 con la 26, coincide con el modelo del modelo de AlphaFold, que además es el que tuvo más puntuación en el ERRAT, por lo que en este caso el modelo más adecuado para el péptido maduro sería el generado con AlphaFold.

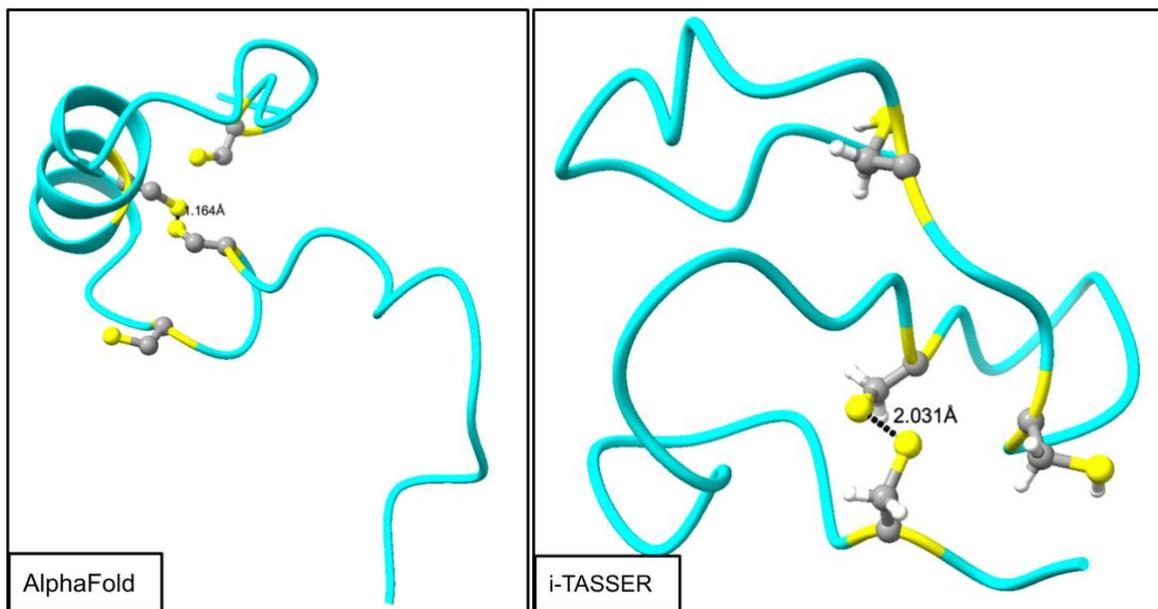


Figura 18. Predicción de la estructura del péptido maduro de la halocina S8. A la izquierda el modelo proporcionado por AlphaFold y a la derecha el modelo de i-TASSER. En amarillo se representan las cisteínas y en negro los puentes disulfuro formados.

Conclusiones

- Se logró aislar y secuenciar varias colonias de las muestras de sal marina. Revelando la presencia de especies halotolerantes como *Paenibacillus* sp. y *Staphylococcus* sp. en Tenerife y otras especies de la familia Propionibacteriaceae en Lanzarote.
- La proteína precursora de la halocina S8 se modeló utilizando dos herramientas bioinformáticas: i-TASSER y AlphaFold, siendo la predicha por i-TASSER la que tendría mayor confianza según el análisis de los diagramas de Ramachandran y las puntuaciones obtenidas por la herramienta ERRAT.
- El modelo de predicho por i-TASSER confiere más ventajas para el procesamiento y la posible liberación del péptido halocina S8, que el predicho por AlphaFold, en términos de accesibilidad a enzimas, menor rotura de enlaces y menor coste metabólico asociado al procesamiento.
- El modelo estructural de AlphaFold para la halocina S8 madura obtuvo una mayor puntuación en ERRAT y, además el puente disulfuro que se formaría entre las cisteínas coincide con el predicho por CYS_REC, adquiriendo mayor confianza este modelo respecto al modelo predicho por i-TASSER.

Conclusions

- It was possible to isolate and sequence several colonies from sea salt samples. Revealing the presence of halotolerant species such as *Paenibacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. in Tenerife and other species of the Propionibacteriaceae family in Lanzarote.
- The halocin precursor protein S8 was modeled using two bioinformatics tools: i-TASSER and AlphaFold, with the one predicted by i-TASSER having the highest confidence according to the analysis of the Ramachandran diagrams and the scores obtained by the ERRAT tool.
- The i-TASSER predicted model conferred more advantages for the processing and possible release of the halocin S8 peptide than that predicted by AlphaFold, in terms of enzyme accessibility, lower bond breakage and lower metabolic cost associated with processing.

- The AlphaFold structural model for mature halocin S8 scored higher in ERRAT and, in addition, the disulfide bridge that would form between the cysteines coincides with that predicted by CYS_REC, making this model more confident than the model predicted by i-TASSER.

Bibliografía

- Aparici-Carratalá, D., Esclapez, J., Bautista, V., Bonete, M. J., & Camacho, M. (2023). Archaea: current and potential biotechnological applications. *Research in Microbiology*, 174(7). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104080>
- Babiano Casasola, J. (2022). Sustancias bioactivas producidas por microorganismos halófilos [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/143604/1/BABIANO%20CASASOLA%2C%20JULIA.pdf?sequence=1>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. En *Pharmaceuticals* (Vol. 6, Número 12, pp. 1543-1575). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, 2(9), 1511-1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>
- Cruz Luna, D. N. (2021). Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl in vitro [Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional, México]. [http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/LITER_CIIDIROAX/510/Cruz%20Luna,%20D.%20N.%20\(2021\).pdf?sequence=1](http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/LITER_CIIDIROAX/510/Cruz%20Luna,%20D.%20N.%20(2021).pdf?sequence=1)
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Gargouri, Y., Ali, Y. Ben, & Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232-237. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2013.03.018>
- Garduño Jiménez, J. C. (2017). Análisis teórico de la formación de puentes disulfuro vecinales [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México]. [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/80119/TESIS-FINAL%20\(2\).pdf?sequence=1](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/80119/TESIS-FINAL%20(2).pdf?sequence=1)
- Ghanmi, F., Carré-Mlouka, A., Zarai, Z., Mejdoub, H., Peduzzi, J., Maalej, S., & Rebuffat, S. (2020). The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar 2 saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. *Research in Microbiology*, 171(2), 80-90. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325081930097X>
- Haque, R. U., Paradisi, F., & Allers, T. (2020). Haloferax volcanii for biotechnology applications: challenges, current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1371-1382. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10314-2>
- Incerti, C., & Ramos Cormenzana, A. (1996). Aislamiento de microorganismos halófilos procedentes de ríos, pantanos y aguas residuales de la provincia de Granada. *Ars Pharmaceutica*, 37(2), 253-260.
- Komaratat, P., & Kates, M. (1975). The lipid composition of a halotolerant species of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 398(3), 464-484. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(75\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(75)90197-6)

- Kumar, V., Singh, B., van Belkum, M. J., Diep, D. B., Chikindas, M. L., Ermakov, A. M., & Tiwari, S. K. (2021). Halocins, natural antimicrobials of Archaea: Exotic or special or both? *Biotechnology Advances*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107834>
- Lach, J., Krupińska, M., Mikołajczyk, A., Strapagiel, D., Stączek, P., & Matera-Witkiewicz, A. (2023). Novel Antimicrobial Peptides from Saline Environments Active against *E. faecalis* and *S. aureus*: Identification, Characterisation and Potential Usage. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/ijms241411787>
- López M, J. E., Ochoa Z, A., Santoyo P, G., Anaya L, J. L., Medina M, E., Matínez T, M., & Loeza L, P. D. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3), 49-57. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911110007>
- Marshall, D. L., & Odame-Darkwah, J. K. (1995). Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. *LWT - Food Science and Technology*, 28(2), 222-226. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)91554-0](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)91554-0)
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679-682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Nanjani, S. G., & Soni, H. P. (2014). Characterization of an extremely halotolerant *Staphylococcus arlettae* HPSSN35C isolated from Dwarka Beach, India. *Journal of basic microbiology*, 54(8), 843-850. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201200690>
- Olascoaga Del Angel, K. S., Sánchez Evangelista, G., Carmona Navarrete, I., Galicia Sánchez, M. del C., Gómez Luna, A., Islas Arrollo, S. J., & Castañeda Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedor para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta Médica de Mexico*, 154(6), 681-688. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70-82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Riley, M. A. (1998). Molecular Mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, 32(1), 255-278.
- Rivas Santiago, B., Sada, E., Hernández Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1), 62-71.

- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1979). Isolation of Extreme Halophiles from Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1), 164-165.
- Roohi, A., Ahmed, I., Khalid, N., Iqbal, M., & Jamil, M. (2014). Isolation and Phylogenetic Identification of Halotolerant/Halophilic Bacteria from the Salt Mines of Karak, Pakistan. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16(3), 564-570. <http://www.fspublishers.org>
- Scybert, S., Pechous, R., Sitthisak, S., Nadakavukaren, M. J., Wilkinson, B. J., & Jayaswal, R. K. (2003). NaCl-sensitive mutant of *Staphylococcus aureus* has a Tn917-lacZ insertion in its ars operon. *FEMS Microbiology Letters*, 222(2), 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00312-4)
- Sokhansanj, A., Karkhane, A. A., & Jazii, F. R. (2005). Identification and characterization of salt-inducible polypeptide in *Paenibacillus* sp., a moderately halophilic bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 573-575. <https://doi.org/10.1263/JBB.100.573>
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- Valdez Gastélum, K. K. (2014). Estudio de la reducción de compuestos orgánicos en agua residual salina mediante microorganismos halotolerantes. [Tesis Doctoral, Centro de investigación y desarrollo tecnológico en Electroquímica, México]. <https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/330/1/Estudio%20de%20la%20reducci%C3%B3n%20de%20compeustos%20org%C3%A1nicos%20en%20agua%20residual%20salina%20mediante%20microorganismos%20halotolerantes.pdf>
- Worku Negash, A., & Andualem Tsehai, B. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(1), W174-W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Yang, L., Huang, H. W., Wang, Y., Kou, Y. R., Yin, M., Li, Y., Wang, X. Q., Zhao, G. F., Zhu, W. Y., & Tang, S. K. (2021). *Paenibacillus turpanensis* sp. nov., isolated from a salt lake of Turpan city in Xinjiang province, north-west China. *Archives of Microbiology*, 203(1), 77-83. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02003-w>