

Bioprospección *in silico* de Archaeas en el metagenoma de un tapete microbiano halófilo

José Agustín Piña López¹, José Ramón Pacheco Arjona², Mónica Noel Sánchez González¹, Rodrigo Arturo Rivera Solís^{1,*}

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Inn, Perif. de Mérida Lic. Manuel Berzunza 13615, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, C.P. 97203.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Tizapán, Mérida, Yucatán, C.P. 97100.

Fecha de recepción: 5 de diciembre de 2022 - Fecha de aceptación: 21 de abril de 2023

Resumen

Los ambientes hipersalinos son fuentes de organismos de alto interés para la bioprospección. Los tapetes microbianos halófilos son comunidades metabólicamente interdependientes adaptadas a la alta salinidad. El dominio Archaea es característico de estos ambientes, representando una alta variedad de funciones dentro de los ciclos biogeoquímicos, entre ellas, el reciclaje de nutrientes. En México, la bioprospección de Archaeas halófilas se encuentra en etapas tempranas, en consecuencia, existe un gran potencial de investigación en diferentes partes del país. Yucatán posee una gran variedad de ambientes hipersalinos, por lo que son sitios atractivos para la identificación de Archaeas halófilas novedosas. El objetivo de este trabajo fue identificar las secuencias de Archaeas presentes en el tapete microbiano de una charca salina en Santa Clara, Yucatán; utilizando herramientas *in silico* para la identificación y análisis de su metataxonomía. Con base en los resultados, se observó la presencia de Archaeas (5.83%) del total de secuencias del metagenoma obtenido. Halobacteria es la clase más abundante de las Archaeas encontradas en el metagenoma y es una clase característica de las Archaeas halófilas. En porcentajes menores al 1% se presentaron los grupos termófilos TACK y DPANN, así como varios géneros con presencia de especies desconocidas. La bioprospección de Archaeas en la región, marca la pauta a estudios más profundos que permitan identificar la participación ecológica de cada género dentro de los ecosistemas de estudios, así como nichos de aprovechamiento biotecnológico.

Palabras claves: Archaea, tapete microbiano hipersalino, bioprospección, *in silico*, metataxonomía

Bioprospection *in silico* of Archaea in the metagenome of a halophilic microbial mat

Abstract

Hypersaline environments are sources of organisms of high interest for bioprospecting. Halophilic microbial mats are metabolically interdependent communities adapted to high salinity. The

* rodrigo.rivera@correo.uady.mx

Archaea domain is characteristic of these environments, representing a high variety of functions within biogeochemical cycles, including nutrient recycling. In Mexico, the bioprospecting of halophilic Archaea is in early stages, consequently, there is a great research potential in different parts of the country. Yucatán has a wide variety of hypersaline environments, making them attractive sites for the identification of novel halophilic Archaea. The objective of this work was to identify the Archaea sequences present in the microbial mat of a saline pond in Santa Clara, Yucatán; using *in silico* tools for the identification and analysis of its metataxonomy. Based on the results, the presence of Archaea (5.83%) of the total sequences of the metagenome obtained was observed. Halobacteria is the most abundant class of Archaea found in the metagenome and is a characteristic class of halophilic Archaea. In percentages less than 1%, the thermophilic groups TACK and DPANN were present, as well as several genera with the presence of unknown species. The bioprospecting of Archaea in the region sets the tone for more in-depth studies that allow the identification of the ecological participation of each genus within the study ecosystems, as well as niches for biotechnological use.

Keywords: Archaea, hypersaline microbial mat, bioprospection, *in silico*, metataxonomy

1. Introducción

Los tapetes microbianos son biopelículas gruesas encontradas en la mayoría de los sedimentos. Su población está conformada por grupos microbianos especializados, cuya estratificación interna se basa en un apilamiento de capas con diferente actividad biológica (Gerba, 2015). Esta actividad es variada e interdependiente, permitiendo comprender cómo una comunidad microbiana interactúa y evoluciona ante ciertas condiciones, por lo que es de especial interés en ecosistemas extremófilos (Moissl-Eichinger et al., 2018).

Los tapetes microbianos extremófilos constituyen un modelo interesante para estudiar el efecto del estrés fisicoquímico sobre los mecanismos adaptativos de los individuos y de la comunidad. Desde una perspectiva taxonómica, la filogenia se delimita a organismos especializados a las condiciones del medio. Esto se puede visualizar en diversos ecosistemas extremófilos, pero es sobresaliente en los ambientes hipersalinos (Oueriaghli, 2014; Ximena & Ortiz, 2016).

Los ambientes hipersalinos poseen condiciones similares a aquellas predominantes en la tierra temprana. Estos ambientes se caracterizan por

contener concentraciones salinas mayores a las del agua de mar (más de un 3.5% de sales disueltas), con alto contenido en sulfatos como consecuencia de la evaporación por altas temperaturas. El origen de un ambiente hipersalino define su naturaleza iónica, dando pauta a diferentes comunidades microbianas en función a la salinidad como principal parámetro. Sin embargo, el oxígeno, los nutrientes y la radiación solar también delimitan la diversidad microbiana, llamando los organismos capaces de sobrevivir estas condiciones como organismos halófilos (Castro-Fernandez et al., 2017; DasSarma & DasSarma, 2017).

El dominio Archaea es característico de los tapetes microbianos hipersalinos, siendo el hábitat donde el dominio ha sido más estudiado. Los géneros de Archaeas halófilas poseen una fisiología especializada, que le permite sobrevivir a condiciones de alta salinidad, entre ellas se incluyen solutos como parte de su estructura celular. Por otro lado, son capaces de obtener energía mediante la degradación de materia orgánica, fotosíntesis, y la biosíntesis de compuestos primordiales (Baker et al., 2020; Pinto, 2017).

La metagenómica ha ayudado a incrementar el conocimiento que se tiene acerca de este grupo filogenético. El muestreo ambiental y las técnicas de secuenciación masiva han ayudado a reestructurar su filogenia en cuatro superfilos o grupos: TACK, DPANN, Asgard y Euryarchaeota (Baker et al., 2020; Rinke et al., 2021). Este último comprende a la mayoría de las Archaeas halófilas, distribuyéndose entre las clases Halobacteria, Methanomicrobia y Nanohaloarchaea (Castro-Fernandez et al., 2017).

La metagenómica también ha sido la principal herramienta para el estudio evolutivo y biológico de las arqueas dado que, permite examinar la relación entre estas y su medio ambiente, ampliando los estudios a un nivel funcional mediante el uso de herramientas bioinformáticas (*in silico*) que han permitido identificar enzimas novedosas (Ramos-Barbero et al., 2019).

Las arqueas halófilas poseen una diversidad enzimática vasta y única. Las enzimas asociadas al grupo filogenético se encuentran estrechamente relacionada a su taxonomía, que en comparativa con el dominio Bacteria, son más primitivas, promiscuas, y resistentes (Antunes et al., 2017; Littlechild, 2015). La adaptabilidad de las Archaeas, particularmente al estrés osmótico; se debe a la producción de biopolímeros, solutos compatibles, pigmentos, exopolisacáridos y enzimas funcionales a estas condiciones (Fazıl et al., 2022). La identificación de estas especies por metagenómica establece una primera base para su estudio, y propone un marco potencial de interés biotecnológico (Ramos-Barbero et al., 2019).

La península de Yucatán tiene una variedad de biosferas salinas: como manglares, charcas, playas, estuarios y salineras. Los tapetes microbianos de estas áreas han sido poco estudiados, ofreciendo un área de oportunidad para el estudio a través de la metagenómica

(Antunes et al., 2017; Nancy et al., 2021). Con base en el potencial de los ambientes hipersalinos, este trabajo pretende identificar Archaeas halófilas que en un futuro permitan estudiar el potencial biotecnológico de estos microorganismos.

2. Metodología

2.1 Muestreo

El metagenoma fue obtenido a partir de un tapete microbiano localizado en el fondo de una charca salinera en el poblado de Santa Clara, Yucatán. El sitio de muestreo se ubica cercano a la costa (latitud 21.37, longitud -89.02). Se colectaron las tres muestras en otoño del 10/10/2017, nombradas V1, V2 y V3, a una profundidad de 10 cm por debajo de la superficie de la charca y con un metro de separación entre ellas. Las muestras se transportaron en refrigeración hasta su uso. En el sitio de muestreo se midieron parámetros fisicoquímicos tales como pH, temperatura y conductividad.

2.2 Extracción y secuenciación

La extracción de ADN metagenómico se realizó a partir de 0.5g de sedimento, siguiendo el protocolo de Rojas y colaboradores (Rojas-Herrera et al., 2008). La secuenciación fue realizada usando la técnica de *Whole Genome Sequencing* (WGS) con una profundidad de 30 millones de lecturas pareadas. La longitud de las lecturas fue de 150pb usando MiSeq en la plataforma Illumina.

2.3 Análisis metagenómico.

Las secuencias fueron analizadas por dos metodologías: la primera empleando la plataforma en línea MG-RAST (<https://www.mg-rast.org/>) y la herramienta MEGAN6 (Huson et al., 2016).

2.4.1. MG-RAST

MG-RAST es una aplicación web de código abierto que realiza un análisis automático a nivel filogenético y funcional de metagenomas ambientales. Se fundamenta en la unión por similitud de secuencias del ARNr en unidades taxonómicas operacionales (OTU), las cuales son comparadas con las OTU representativas en la base de datos M5rna (Lima et al., 2021)

Los tres pares de secuencias correspondientes a las muestras fueron cargados en la plataforma MG-RAST, y se realizó la unión de los extremos pareados de las lecturas *Forward* y *Reverse* en una concatenación. Los datos fueron analizados con el algoritmo BLAT como control de calidad y se realizó un recorte de las regiones de baja calidad en las secuencias con la herramienta SolexaQA. Para el análisis metagenómico se efectuó un proceso de derreplicación, descartando secuencias idénticas para remover lecturas artificiales duplicadas (ADR). Al finalizar el análisis automático, se realizó un análisis funcional mediante KO (*KEGG Orthology*) en el dominio Bacteria y Archaea, buscando ofrecer una primera perspectiva en el potencial genómico del dominio Archaea (Dombrowski et al., 2019).

2.4 MEGAN6

MEGAN6 es un software de análisis metagenómico que permite la exploración visual y cuantitativa de microbiomas mediante árboles filogenéticos interactivos. Esta herramienta requiere el acondicionamiento manual de las secuencias para su análisis. La primera etapa de dicho acondicionamiento consiste en la limpieza de las secuencias, para lo cual se empleó la herramienta FASTP, realizando la eliminación de quimeras, réplicas, adaptadores, oligonucleótidos y regiones de baja confiabilidad (Chen et al., 2018).

La asignación taxonómica fue realizada mediante Kraken2, empleando la base de datos

“minikraken2_v2_8GB_201904”, excluyendo el genoma mitocondrial y cloroplástico. Las secuencias fueron analizadas en MEGAN6 utilizando el paquete *import_biom* de RStudio (v. 4.2.2) (Chao et al., 2016; Wood et al., 2019).

3. Resultados

La charca salinera presentó una temperatura de 33.34°C, pH de 7.87 y conductividad de 72µS, siendo parámetros que corresponden a un ambiente halófilo moderado alto. El análisis mediante MG-RAST logró identificar 13,098,719 secuencias en V1; 12,868,564 en V2; y 12,280,340 en V3; de las cuales un 15.56%, 16.56% y 18.03% respectivamente no pasaron el control de calidad. En promedio de las tres muestras se lograron identificar un 80.20% de las secuencias.

La composición taxonómica en promedio de las tres muestras está conformada por el dominio Bacteria (93.51%), Archaeas (5.83%), y Eukarya (0.46%). El porcentaje restante corresponde a secuencias asociadas a virus y secuencias sin clasificar. Las abundancias relativas en las divisiones taxonómicas en las tres muestras son muy similares, por lo que se manejarán promedios.

Dentro del dominio Bacteria, sobresale el filo Proteobacteria (46.6%) seguido de Bacteroidetes (15.23%) y el filo fotosintético Cyanobacteria (12.48%). En menor medida, se encuentran presentes Firmicute (4.16%), Chloroflexi (3.9%), Spirochaetes (2.84%), Verrucomicrobia (1.81%), Planctomycetes (1.31%) y Actinobacteria (1.12%). Entre los géneros bacterianos identificados destaca *Salinibacter*, ubicándose por arriba del 10% de los géneros del metagenoma total.

Entre las Archaeas, el filo con mayor porcentaje es Euryarchaeota (7.003%), y de este filo el 94% corresponde a la clase Halobacteria. El porcentaje restante, corresponde a la clase Methanomicrobia (5.01%) y a grupos con porcentajes menores al

1%, entre los que se encuentran Crenarchaeota, Kronarchaeota y Thaumarchaeota. Dentro de la clase Methanomicrobia, se encontraron las familias Metanosarcinales (75%) y Methanomicrobiales (25%).

La única familia identificada en Halobacteria fue Halobacteriaceae (98.09%), siendo el 1.91% restante correspondiente a secuencias de

especies de Halobacteriaceae sin identificar. Los géneros de mayor presencia fueron *Halorubrum* (18.17%), *Haloterrigena* (14.24%), *Natronorubrum* (13.85%), *Halobacterium* (8.14%) y *Haloplanus* (7.16%). El resto de los géneros se presentaron en valores menores al 5%. La distribución de los géneros en las tres muestras descritas se puede observar en la Figura 1.

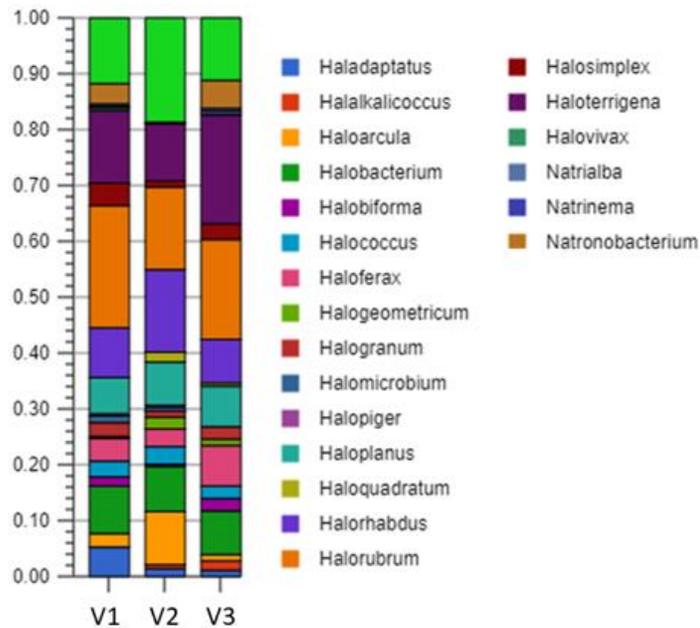


Figura 1. Distribución del total de géneros de Archaea encontrados

En MEGAN6 la clase de mayor abundancia también corresponde a Halobacteria (95%), seguido de Methanomicrobia (4%), y el 1% restante al grupo TACK. Se encontró la presencia de las tres familias de la clase Halobacteria: Haloferacales (49%), Halobacteriales (26%) y Natrionalbaceae (15%). El 10% restante corresponde a secuencias sin clasificar pero que pertenecen a la clase Halobacteria. En la clase Methanomicrobia se encontraron las familias Methanosarcinae (73%), Methanomicrobiales (18%) y

Methanotrix (6%), siendo el 3% restante a secuencias sin clasificar que pertenecen a la clase Methanomicrobia.

Los géneros identificados con mayor abundancia en Halobacteria son *Haloplanus* (18%), *Salinigranum* (6.66%), *Halorubrum* (4.66%) y *Natromonas* (3%). El resto del porcentaje se distribuye en diversos géneros, con una abundancia relativa oscilando al 1%. La distribución de los géneros encontrados en Halobacteria se puede observar en la Figura

2;Error! No se encuentra el origen de la referencia..

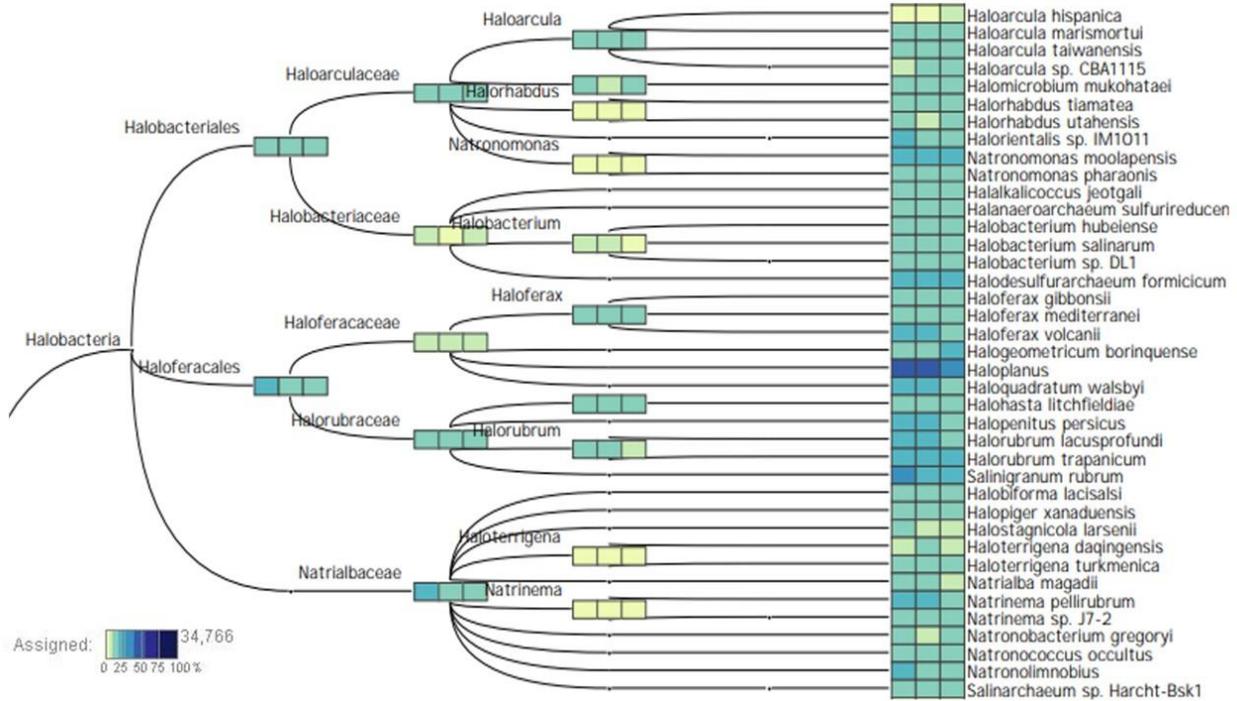


Figura 2. Heatmap de abundancia relativa de la clase Halobacteria entre las muestras V1, V2 y V3.

El análisis funcional puede visualizarse en la Figura 3. Los resultados del análisis se dividen conforme las funciones descritas en KEGG, y estas se subdividen a su vez en los diferentes metabolismos. El tercer nivel de subdivisión

posee mayor especificidad, identificándose en ambos dominios los transportadores ABC (9.12%), biosíntesis de Aminoacil ARNt (6.92%), y metabolismo de purinas (4.96%). El resto se ubicó en un porcentaje menor al 5%.

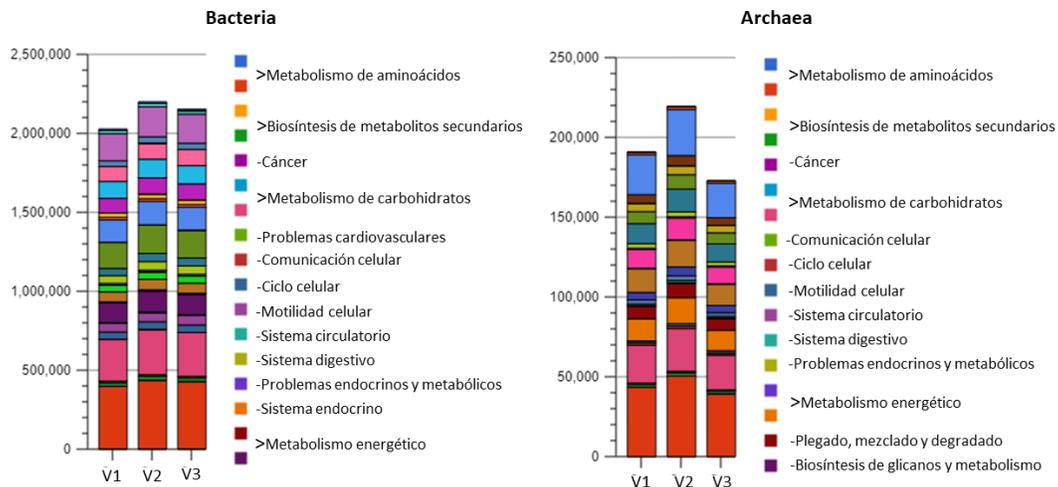


Figura 3. Comparativa en la distribución de las categorías funcionales encontradas mediante KO (KEGG Orthology) entre el dominio Archaea y Bacteria.

4. Discusión

De acuerdo con el INEGI (<http://www.org.mx>), la temperatura ambiente en el estado de Yucatán es de 26°C con una desviación máxima de 36°C. Estos datos coinciden con la temperatura determinada en la charca salina. La charca se presenta ligeramente alcalina con un pH de 7.87, pero también se ubica próxima a la neutralidad, permitiendo el desarrollo de especies neutrófilas y alcalófilas. Por otro lado, la conductividad encontrada, funge como indicador que clasifica el sitio de muestreo como halófilo moderado alto (DasSarma & DasSarma, 2017). Estas condiciones son similares a las encontradas en las charcas estudiadas en Guerrero Negro (Baja California, México), Shark Bay (Australia) y Cuatro Ciénegas (Coahuila, México), a excepción de un ligero aumento del pH (Nancy et al., 2021; Olin et al., 2019; Wong et al., 2017).

En este trabajo se observó la presencia de los filos bacterianos Proteobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia y Actinobacteria, los cuales son indicadores de un ambiente de salinidad moderada (Oueriaghli, 2014). La dominancia del filo Proteobacteria es consistente en la mayoría de los estudios relacionados con los tapetes microbianos halófilos, siendo integrado por microorganismos de fisiología y funciones metabólicas variables, entre las que podemos encontrar la fijación de nitrógeno y la reducción de sulfuro y sulfatos. (García-Maldonado et al., 2018; Mani et al., 2020).

El género *Salinibacter* constituye de un 5% al 25% de las especies en la mayoría de los ambientes hipersalinos y esto es asociado a un mecanismo adaptativo que se encarga de incluir iones inorgánicos a su sistema fisiológico. Este mecanismo, así como su gradiente iónico intracelular, es análogo a las

Archaeas de la clase Halobacteria (Mongodin et al., 2005; Oren, 2013). Las similitudes que presenta este género con las Archaeas se asocian a la integración de al menos 40 genes relacionados con procesos de transferencia horizontal derivada de Archaeas (Oren, 2013).

Se observó que a pesar de que el dominio Archaea es poco abundante en la muestra del tapete microbiano, presenta una alta diversidad. La mayor parte de las secuencias se asocian al filo Euryarchaeota, aunque también se observan secuencias asociadas a los filos Crenarchaeota, Thaumarchaeota y algunas sin clasificación (6.39%). Esta composición de filos se muestra consistente en los tapetes microbianos neutros de alta salinidad, siendo los mayor representativos Shark Bay, Hautz Plateaux (Algeria) y el Gran Lago Salado (Ogden) (Kemp et al., 2018; Menasria et al., 2018; Olin et al., 2019).

Si bien a nivel de filo, la distribución de la taxonomía es similar entre los análisis realizados con MG-RAST y MEGAN6, esta se pierde al ir disminuyendo el nivel taxonómico. La variación entre los resultados de MG-RAST y MEGAN6 es atribuible a el uso de diferentes bases de datos y algoritmos utilizados, más se mostró consistencia en las especies de mayor abundancia.

A nivel de género, *Halorubrum* y *Haloplanus*, se observan con alta abundancia en ambos resultados. Ambos géneros pertenecen al orden Haloferacales, el cual contiene organismos quimiorganotróficos, abundantes en pH neutro, cuya presencia se ha documentado con anterioridad en la península de Yucatán (Richardson et al., 2023). **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el**

origen de la referencia. Los géneros de Haloferacales pueden alimentarse por reducción de nitratos, fermentación de un azúcar específico, fotosíntesis, o catálisis de arginina; desplegando un alto potencial en vías metabólicas y actividad proteolítica. Con base en la población de bacteria encontrada (Rhodobacteria), es probable que ambos géneros hayan integrado rutas metabólicas desnitrificantes para participar en el ciclo de nitrógeno del tapete (Antunes et al., 2017; Cui & Dyll-Smith, 2021; Menasria et al., 2018; Oren, 2015).**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Otros géneros de Archaea encontrados son *Salinigranum*, *Natromonas*, *Haloterrigena*, *Halobacterium* y *Natronorubrum*. Dentro del género *Salinigranum* se observó la presencia de la especie *Salinigranum rubrum*, la cual es una Archaea aeróbica heterótrofa cuyas condiciones óptimas de crecimiento son temperaturas de 20°C a 50°C y un pH neutro lo que coincide con los datos fisicoquímicos asociados a este trabajo. *Salinigranum rubrum* es capaz de crecer de forma anaeróbica mediante la catálisis de arginina, y está involucrado en la reducción de nitratos a nitritos (Han et al., 2019). Con relación al género *Halobacterium*, las condiciones de vida son similares a las descritas para el género *Salinigranum* ya que es capaz de crecer en un rango de 25 a 55°C y un pH de 5.5 a 8.5. Este género, es quimiorganotrófico, mayormente compuesto de aerobios estrictos con algunas excepciones aeróbicas facultativas. La mayoría exhiben actividad proteolítica e integran vacuolas de gas, por lo que se encuentran cerca de la superficie de la charca (Grant, 2015).

Natromonas y *Natronorubrum* son géneros alcalófilos pertenecientes a la familia Haloarculaceae. El pH de la charca demuestra ser suficiente para el crecimiento de ambos géneros, más el pH óptimo de ambos es 8.5 y 8 respectivamente. Los dos géneros se relacionan con procesos de fijación de amoníaco, así como

un mecanismo de nutrición estrictamente aerobio mediante fotosíntesis por bacteriorrodopsina (Gonzalez et al., 2010; Kulkarni et al., 2019; Najjari et al., 2021). Por otro lado, el género *Haloterrigena* integra especies halófilas termófilas, siendo de 40 a 60 °C el rango de temperatura en los que se ha observado su presencia. Si bien, de acuerdo con la literatura, las condiciones de vida de estos géneros no son compatibles con las condiciones encontradas en esta charca, hay que tener en cuenta que los sitios de muestreo funcionan como evaporadores en el proceso de obtención de sal, por lo que es posible que las temperaturas sean mayores en diferentes épocas del año, y sean aptas para el desarrollo óptimo de este género (Chen et al., 2019).

Además de *Halobacterium* se notó la presencia de la clase Methanomicrobia, Las especies halófilas metanógenas pertenecen a la familia Methanosarcinaceae, siendo en su mayoría especies halófilas leves. Estos microorganismos poseen una función clave en el ciclo del carbono, degradando la materia orgánica del sedimento bajo condiciones anaeróbicas estrictas (Bueno de Mesquita et al., 2021). La abundancia de las clases Methanomicrobia y *Halobacterium* se encuentra estrechamente relacionada a la profundidad, debido a que una mayor profundidad implica una menor salinidad. Este tipo de Archaeas se ubican en las secciones inferiores de los tapetes donde la concentración de sales es menor (Cui & Dyll-Smith, 2021; García-Maldonado et al., 2018; Wong et al., 2020).

Finalmente, el análisis funcional demostró resultados similares en la distribución de ambos dominios. Las proteínas asociadas al transporte ABC destacan al involucrarse en procesos de percepción de cuórum, fotosíntesis, fijación de carbono, y transporte de solutos entre el ambiente y la membrana celular (Campbell et al., 2020), siendo procesos esenciales para su supervivencia en el medio hipersalino. De la misma forma, la

mayoría de los organismos halófilos poseen sistemas de degradación de aminoácidos (Bueno de Mesquita et al., 2021; DasSarma & DasSarma, 2017). Es muy probable que mediante un estudio más profundo se pueda encontrar una mayor diferencia en la distribución funcional de ambos dominios, permitiendo identificar potenciales usos en un futuro.

5. Conclusión

El análisis realizado en este artículo aporta una primera visualización en la composición del ecosistema de una charca hipersalina en Santa Clara, Yucatán. La distribución taxonómica se compone principalmente de organismos halófilos extremos, encontrándose el filo Proteobacteria del dominio Bacteria como el más abundante. La presencia del género *Salinibacter* también sugiere su importancia dentro del ecosistema. La mayoría de los géneros encontrados en la clase Halobacteria del dominio Archaea, tales como *Halorubrum*

y *Haloplanus* se han documentado como candidatos en la bioprospección de proteasas, celulasa, DNAsas, y lipasas funcionales a alta salinidad. Adicionalmente, se observó la presencia de géneros alcalófilos como *Natromonas* y *Natrorubrum* y termófilos como *Haloterrigena*, siendo candidatos contundentes para la búsqueda de extremozimas similares, así como vías metabólicas especializadas. Finalmente, el análisis funcional comparativo presenta resultados similares dentro de ambos dominios, sugiriendo nichos análogos o conjuntivos dentro del tapete microbiano. Este análisis propone una vista general del metagenoma, más corrobora la presencia de especies de Archaeas con potencial en la bioprospección de catalizadores y vías metabólicas innovadoras, siendo requerido un estudio a mayor profundidad para sugerir conclusiones más contundentes en la genómica y funcionalidad de estos organismos.

6. Referencias

- Ali Fazıl YENİDÜNYA Aydemir BARIŞ Betül AYDIN Cenk YÜCEL Meryem Burcu KÜLAHCI Nebahat Aytuna ÇERÇİ Neslihan BAL Özgür KEBABCI Pınar CAGLAYAN Serap ÇETİNKAYA, A. (2022). *DEPTHS OF SCIENCE EDITOR Cenk YÜCEL*. www.iksadyayinevi.com
- Antunes, A., Simões, M. F., Grötzinger, S. W., Eppinger, J., Bragança, J., & Bajic, V. B. (2017). *Bioprospecting Archaea: Focus on Extreme Halophiles*. 81–112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47935-4_5
- Baker, B. J., De Anda, V., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Santoro, A. E., & Lloyd, K. G. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nature Microbiology* 2020 5:7, 5(7), 887–900. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>
- Bueno de Mesquita, C. P., Zhou, J., Theroux, S. M., & Tringe, S. G. (2021). Methanogenesis and Salt Tolerance Genes of a Novel Halophilic Methanosarcinaceae Metagenome-Assembled Genome from a Former Solar Saltern. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 1609, 12(10), 1609. <https://doi.org/10.3390/GENES12101609>
- Campbell, M. A., Grice, K., Visscher, P. T., Morris, T., Wong, H. L., White, R. A., Burns, B. P., & Coolen, M. J. L. (2020). Functional Gene Expression in Shark Bay Hypersaline Microbial Mats: Adaptive Responses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2741. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.560336/BIBTEX>

- Castro-Fernandez, V., Zamora, R., Morande, A. H., Vallejos, G., Gonzalez-Ordenes, F., & Guixé, V. (2017). Evolution, Metabolism and Molecular Mechanisms Underlying Extreme Adaptation of Euryarchaeota and Its Biotechnological Potential. *Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.69943>
- Chao, A., Chiu, C.-H., Jost, L., Chao, A., Chiu, C.-H., & Jost, L. (2016). Phylogenetic Diversity Measures and Their Decomposition: A Framework Based on Hill Numbers. *Topics in Biodiversity and Conservation*, 14, 141–172. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22461-9_8
- Chen, S., Xu, Y., Sun, S., & Chen, F. (2019). Haloterrigena salifodinae sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean rock salt. *Antonie van Leeuwenhoek* 2019 112:9, 112(9), 1317–1329. <https://doi.org/10.1007/S10482-019-01264-W>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY560>
- Cui, H. L., & Dyall-Smith, M. L. (2021). Cultivation of halophilic archaea (class Halobacteria) from thalassohaline and athalassohaline environments. *Marine Life Science & Technology* 2021 3:2, 3(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/S42995-020-00087-3>
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2017). Halophiles. *ELS*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0000394.PUB4>
- Dombrowski, N., Lee, J. H., Williams, T. A., Offre, P., & Spang, A. (2019). Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2), 8. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNZ008>
- García-Maldonado, J. Q., Escobar-Zepeda, A., Raggi, · Luciana, Bebout, B. M., Sanchez-Flores, A., & Alejandro López-Cortés, ·. (2018). *Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporites, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments*. 22, 903–916. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1047-2>
- Gerba, C. P. (2015). Indicator Microorganisms. In *Environmental Microbiology: Third Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00023-5>
- Gonzalez, O., Oberwinkler, T., Mansueto, L., Pfeiffer, F., Mendoza, E., Zimmer, R., & Oesterhelt, D. (2010). Characterization of Growth and Metabolism of the Haloalkaliphile *Natronomonas pharaonis*. *PLOS Computational Biology*, 6(6), e1000799. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000799>
- Grant, W. D. (2015). Halobacterium. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM00482>
- Han, S. B., Hou, X. J., Wu, C., Zhao, Z., Ju, Z., Zhang, R., Cui, H. L., Keen, L. J., Xu, L., & Wu, M. (2019). Complete genome sequence of *Salinigranum rubrum* GX10T, an extremely halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *Marine Genomics*, 44, 57–60. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2018.09.004>
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H. J., & Tappu, R. (2016). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of

Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLOS Computational Biology*, 12(6), e1004957. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004957>

- Kemp, B. L., Tabish, E. M., Wolford, A. J., Jones, D. L., Butler, J. K., & Baxter, B. K. (2018). The Biogeography of Great Salt Lake Halophilic Archaea: Testing the Hypothesis of Avian Mechanical Carriers. *Diversity 2018, Vol. 10, Page 124, 10(4)*, 124. <https://doi.org/10.3390/D10040124>
- Kulkarni, S., Dhakar, K., & Joshi, A. (2019). Alkaliphiles: Diversity and Bioprospection. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 239–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00015-0>
- Lima, J., Manning, T., Rutherford, K. M., Baima, E. T., Dewhurst, R. J., Walsh, P., & Roehe, R. (2021). Taxonomic annotation of 16S rRNA sequences of pig intestinal samples using MG-RAST and QIIME2 generated different microbiota compositions. *Journal of Microbiological Methods*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106235>
- Littlechild, J. A. (2015). Archaeal Enzymes and Applications in Industrial Biocatalysts. *Archaea*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/147671>
- Mani, K., Taib, N., Hugoni, M., Bronner, G., Bragança, J. M., & Debroas, D. (2020). Transient dynamics of archaea and bacteria in sediments and brine across a salinity gradient in a solar saltern of Goa, India. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1891. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01891/BIBTEX>
- Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., Dekak, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research*, 207, 289–298. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2017.12.011>
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., & Schmitz, R. A. (2018). Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends in Microbiology*, 26(1), 70–85. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.07.004>
- Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D. A., Papke, R. T., Perez, G. S., Sharma, A. K., Nesbø, C. L., MacLeod, D., Baptiste, E., Doolittle, W. F., Charlebois, R. L., Legault, B., & Rodriguez-Valera, F. (2005). The genome of *Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18147–18152. https://doi.org/10.1073/PNAS.0509073102/SUPPL_FILE/09073TABLE1.PDF
- Najjari, A., Stathopoulou, P., Elmnasri, K., Hasnaoui, F., Zidi, I., Sghaier, H., Ouzari, H. I., Cherif, A., & Tsiamis, G. (2021). Assessment of 16s rna gene-based phylogenetic diversity of archaeal communities in halite-crystal salts processed from natural saharan saline systems of Southern Tunisia. *Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10050397>

- Nancy, D., Luna, C., & Xoxocotlán, S. C. (2021). *Identificación de bacterias y arqueas halófilas con capacidad para capturar NaCl in vitro*. http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/handle/LITER_CIIDIROAX/510
- Olin, M. C. N., Mariette, V. J., Gabriela, O. Á., Eguiarte Luis, E., Valeria, S., & Susana De La, T. Z. (2019). Diversity of Archaea Domain in Cuatro Ciénegas Basin: Archaeal Domes. *BioRxiv*, 766709. <https://doi.org/10.1101/766709>
- Oren, A. (2013). Salinibacter: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiology Letters*, 342(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12094>
- Oren, A. (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 119–124. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2015.02.005>
- Oueriaghli, N. (2014). *Estudio de la diversidad procariota en ambientes salinos empleando técnicas moleculares*. Editorial de la Universidad de Granada.
- Pinto, N. G. (2017). *FILOGENIA DE LOS SERES VIVOS: DOMINIO ARCHAEA*.
- Ramos-Barbero, M. D., Martín-Cuadrado, A. B., Viver, T., Santos, F., Martínez-García, M., & Antón, J. (2019). Recovering microbial genomes from metagenomes in hypersaline environments: The Good, the Bad and the Ugly. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(1), 30–40. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2018.11.001>
- Richardson, L., Allen, B., Baldi, G., Beracochea, M., Bileschi, M. L., Burdett, T., Burgin, J., Caballero-Pérez, J., Cochrane, G., Colwell, L. J., Curtis, T., Escobar-Zepeda, A., Gurbich, T. A., Kale, V., Korobeynikov, A., Raj, S., Rogers, A. B., Sakharova, E., Sanchez, S., ... Finn, R. D. (2023). MGnify: the microbiome sequence data analysis resource in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D753–D759. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1080>
- Rinke, C., Chuvochina, M., Mussig, A. J., Chaumeil, P. A., Davín, A. A., Waite, D. W., Whitman, W. B., Parks, D. H., & Hugenholtz, P. (2021). A standardized archaeal taxonomy for the Genome Taxonomy Database. *Nature Microbiology* 2021 6:7, 6(7), 946–959. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00918-8>
- Rojas-Herrera, R., Narváez-Zapata, J., Zamudio-Maya, M., & Mena-Martínez, M. E. (2008). A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology*, 40(1), 13–17. <https://doi.org/10.1007/S12033-008-9061-8/TABLES/3>
- Wong, H. L., MacLeod, F. I., White, R. A., Visscher, P. T., & Burns, B. P. (2020). Microbial dark matter filling the niche in hypersaline microbial mats. *Microbiome* 2020 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00910-0>
- Wong, H. L., Visscher, P. T., White, R. A., Smith, D. L., Patterson, M. M., & Burns, B. P. (2017). Dynamics of archaea at fine spatial scales in Shark Bay mat microbiomes. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep46160>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-019-1891-0>

Ximena, C., & Ortiz, R. (2016). Biology and population ecology of uncultured Archaea in natural environments analyzed by taxon-specific molecular markers = Biología y ecología poblacional de Archaeas no cultivadas en ambientes naturales analizadas mediante marcadores moleculares específicos. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*. <https://www.tdx.cat/handle/10803/386392>