

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Diversidad filogenómica y funcional de
procariotas de suelos hipersalinos**

Tesis Doctoral

Blanca Vera Gargallo

Sevilla, 2018



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

Memoria que presenta la Lcda. en Farmacia Blanca Vera Gargallo para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

La doctoranda:

Fdo.: Blanca Vera Gargallo



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

ANTONIO VENTOSA UCERO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Diversidad filogenómica y funcional de procariotas de suelos hipersalinos” presentada por la Licenciada en Farmacia D^a BLANCA VERA GARGALLO para optar al grado de Doctor ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos, bajo mi dirección.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Sevilla, a 15 de junio de 2018.

Fdo.: Antonio Ventosa Ucero



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

MIGUEL ÁNGEL CAVIEDES FORMENTO, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Diversidad filogenómica y funcional de procariotas de suelos hipersalinos” presentada por la Licenciada en Farmacia D^a BLANCA VERA GARGALLO para optar al grado de Doctor ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos, bajo la dirección del Doctor D. Antonio Ventosa Ucero.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Sevilla, a 15 de junio de 2018.

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada mediante los siguientes proyectos de investigación:

“Biodiversidad microbiana de suelos salinos: una aproximación molecular y metagenómica” (P10-CVI-6226) subvencionado por la Junta de Andalucía durante el período 2012-2016.

“De la metagenómica al cultivo puro: Spiribacter salinus” (CGL2013-46941-P), subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación durante el período 2014-2016.

“Microbiomas de ambientes hipersalinos: suelos versus salinas” (CGL2017-83385-P), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad durante el período 2018-2020.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Vera-Gargallo, B., Navarro-Sampedro, L., Carballo, M., Ventosa, A. (2018). **Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline soils of the Odiel Salt Marshes in Huelva, Southwestern Spain.** Genome Announcements. 6: e00140-18.

Vera-Gargallo, B., Ventosa, A. (2018). **Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel Saltmarshes (SW Spain).** Genes. 9:E15

Vera-Gargallo, B., RoyChowdhury, T., Brown, J., Fansler, SJ, Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro C., Bailey, V.L., Jansson J.K., Ventosa, A. **Factors governing the spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils.** Enviado a Scientific Reports.

Vera-Gargallo, B., Dumont, M.G., Hernández. M.T., Ventosa, A. **Light shapes prokaryotic community structure in hipersaline soils.** En preparación.

Y en las comunicaciones a congresos:

Vera-Gargallo, B., Ventosa, A. **Insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils.** ASM, 2018. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo, B., Ventosa, A. **Diversidad procariota de suelos hipersalinos de las Marismas del Odiel.** REDEX, 2018. Comunicación oral.

Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A. **Characterization of the microbial community form hypersaline soils and its metabolic potential.** FEMS-SEM, 2017. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo, B., RoyChowdhury, T., Brown, J., Sánchez-Porro, C., Bailey, V., Jansson, J.K. y Ventosa, A. **Factors influencing the microbial community structure of saline soils from the Odiel Saltmarshes.** FEMS-SEM, 2017. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A. **Prokaryotic community of hypersaline soils from Odiel saltmarshes unveiled through metagenomics.** 3rd Thünen Symposium on Soil Metagenomics, 2016. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A. **Insights into functional diversity of hypersaline soils.** 3rd Thünen Symposium on Soil Metagenomics, 2016. Comunicación en pan

Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. y Ventosa, A. **Metabolic diversity of hypersaline environments.** XI Reunión del Grupo Especializado de Microbiología Molecular, 2016. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo B, de la Haba RR, Sánchez-Porro C y Ventosa A. **New microbial taxon from hypersaline soils unveiled through metagenomics.** 11th International Meeting Halophiles, 2016. Comunicación en panel.

Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C y Ventosa A. **Análisis metagenómico de un suelo salino del Parque Natural Marismas del Odiel.** XXV Congreso Nacional de Microbiología, 2015. Comunicación oral.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 AMBIENTES EXTREMOS Y LA VIDA EN ELLOS.....	1
I.2 LA SALINIDAD COMO FACTOR LIMITANTE PARA LA VIDA.....	5
I.3 AMBIENTES HIPERSALINOS Y MICROORGANISMOS HALÓFILOS.....	6
<i>I.3.1 Tipos de ambientes hipersalinos</i>	<i>6</i>
<i>I.3.2 Microorganismos halófilos.....</i>	<i>13</i>
I.4 ESTUDIO DEL SUELO COMO SISTEMA BIOLÓGICO.....	39
<i>I.4.1 Particularidades del suelo como hábitat</i>	<i>39</i>
<i>I.4.2 Aproximaciones ómicas al estudio de la ecología microbiana de suelos.....</i>	<i>40</i>
II. OBJETIVOS.....	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
III.1 MUESTREOS Y ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS.....	47
<i>III.1.1 Toma de muestras</i>	<i>47</i>
<i>III.1.2 Análisis fisicoquímicos de las muestras</i>	<i>48</i>
III.2 MARCAJE CON ISÓTOPOS ESTABLES (H ₂ O ¹⁸)	49
<i>III.2.1 Tratamiento previo de las muestras.....</i>	<i>49</i>
<i>III.2.2 Diseño del experimento, marcaje con H₂O¹⁸ e incubación.....</i>	<i>49</i>
<i>III.2.3 Centrifugación isopícnica y separación/fraccionamiento de gradientes</i>	<i>49</i>
<i>III.2.4 qPCR en tiempo real.....</i>	<i>50</i>
III.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN METAGENÓMICO.....	52
III.4 DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD, CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL ADN.....	52
<i>III.4.1 Electroforesis en gel de agarosa.....</i>	<i>52</i>
<i>III.4.2 Espectrofotometría</i>	<i>53</i>
<i>III.4.3 Fluorimetría.....</i>	<i>54</i>
III.5 SECUENCIACIÓN DEL ADN METAGENÓMICO Y LIBRERÍAS DEL GEN ARNR 16S.....	54

III.6	BASES DE DATOS	54
III.6.1	<i>Metagenomas</i>	54
III.6.2	<i>Bases de datos de secuencias</i>	55
III.7	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS METAGENÓMICAS	57
III.7.1	<i>Control de calidad de las secuencias</i>	57
III.7.2	<i>Contenido en guanina más citosina (G + C) del ADN</i>	57
III.7.3	<i>Frecuencia de aminoácidos</i>	57
III.7.4	<i>Punto isoeléctrico</i>	58
III.7.5	<i>Anotación de secuencias metagenómicas</i>	58
III.7.6	<i>Ensamblado de secuencias metagenómicas</i>	59
III.7.7	<i>Extracción de genomas a partir de metagenomas</i>	61
III.7.8	<i>Estimación de la posición filogenética de los genomas extraídos</i>	62
III.7.9	<i>Anotación de los genomas extraídos</i>	62
III.7.10	<i>Reclutamiento de genomas</i>	62
III.7.11	<i>Análisis bioinformático de amplicones</i>	63
III.7.12	<i>Determinación de la diversidad</i>	64
III.7.13	<i>Análisis estadísticos</i>	65
III.7.14	<i>Depósito de las secuencias en bases de datos públicas</i>	67
IV.	RESULTADOS	68
IV.1	CAPÍTULO I.....	68
IV.1.1	<i>Caracterización fisicoquímica del suelo</i>	68
IV.1.2	<i>Características generales de las bases de datos metagenómicas</i>	69
IV.1.3	<i>Rasgos halofílicos de las bases de datos metagenómicas</i>	71
IV.1.4	<i>Estimaciones de alfa-diversidad</i>	74
IV.1.5	<i>Ensamblado de lecturas metagenómicas en contigs</i>	75
IV.1.6	<i>Diversidad filogenética de la comunidad microbiana</i>	77

IV.1.7	<i>Diversidad funcional.....</i>	<i>86</i>
IV.1.8	<i>Análisis metagenómico de resolución genómica.....</i>	<i>90</i>
IV.2	CAPÍTULO II.....	104
IV.2.1	<i>Propiedades fisicoquímicas del suelo.....</i>	<i>104</i>
IV.2.2	<i>Composición de la comunidad microbiana.....</i>	<i>104</i>
IV.2.3	<i>Relación entre las propiedades del suelo y la estructura de la comunidad microbiana.....</i>	<i>109</i>
IV.2.4	<i>Medidas de diversidad y correlación con las propiedades del suelo.....</i>	<i>114</i>
IV.3	CAPÍTULO III.....	115
IV.3.1	<i>Influencia de la luz sobre la comunidad procariota de suelos salinos.....</i>	<i>115</i>
V.	RESUMEN.....	126
VI.	SUMMARY.....	128
VII.	CONCLUSIONES.....	130
VIII.	CONCLUSIONS.....	132
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	133

Índice de tablas

Tabla 1. Categorías de microorganismos extremófilos y extremotolerantes según la naturaleza de su adaptación (adaptado de Rothschild y Mancinelli, 2001).	4
Tabla 2. Características de los muestreos realizados.	47
Tabla 3. Cebadores universales de bacterias (BAC) y arqueas (ARC) utilizados en la qPCR.	51
Tabla 4. Componentes y concentraciones de la reacción de qPCR.	51
Tabla 5. Bases de datos metagenómicas públicas utilizadas en esta Tesis Doctoral.	56
Tabla 6. Características fisicoquímicas de las dos muestras de suelo salino, designadas como SMO1 y SMO2.	70
Tabla 7. Características generales de las bases de datos de ambientes hipersalinos analizadas en este estudio.	71
Tabla 8. Porcentaje de lecturas ensambladas, número de contigs y valor de N50 del resultado del ensamblaje de las bases de datos metagenómicas de suelos salinos obtenidas en este estudio y las procedentes de salinas utilizadas como referencia.	77
Tabla 9. Afiliación taxonómica a nivel de phylum de los fragmentos del gen ARNr 16S identificados en las secuencias de las dos muestras de suelo salino, SMO1. Las secuencias asignadas poseen una identidad de más del 95 % a lo largo de al menos 100 pb con el hit mostrado. La categoría 'Otros' incluye los taxones representados por menos de un 1 % de las secuencias. El color corresponde al phylum al que pertenecen: Euryarchaeota – rojo, Bacteroidetes – verde, Gammaproteobacteria – celeste, Alphaproteobacteria – naranja, Actinobacteria – morado, Rhodothermaeota – gris y Balneolaeota – azul. Se muestra también el rango de salinidad y GC de los representantes de estos géneros.	81
Tabla 10. Afiliación taxonómica a nivel de phylum de los fragmentos del gen ARNr 16S identificados en las secuencias de las dos muestras de suelo salino, SMO2. Las secuencias asignadas poseen una identidad de más del 95 % a lo largo de al menos 100 pb con el hit mostrado. La categoría 'Otros' incluye los taxones representados por menos de un 1 % de las secuencias. El color corresponde al phylum al que pertenecen: Euryarchaeota – rojo, Bacteroidetes – verde, Gammaproteobacteria – celeste, Alphaproteobacteria – naranja, Actinobacteria – morado, Rhodothermaeota – gris y Balneolaeota – azul. Se muestra también el rango de salinidad y GC de los representantes de estos géneros.	82
Tabla 11. Fracción de secuencias anotadas como genes relacionados con osmoadaptación y rodopsinas de las bases de datos metagenómicas de suelos salinos obtenidos en este estudio y las procedentes de	

salinas solares. 'SMO' hace referencia a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelo salino, SMO1 y SMO2. _____ 90

Tabla 12. Resultados del análisis de los genomas ambientales recuperados con CheckM. _____ 91

Tabla 13. Valores de ANI (%) entre los genomas de las especies tipo del phylum Balneolaeota y el bin 1. _____ 92

Tabla 14. Resultados del test PERMANOVA para evaluar el efecto de los indicadores geoquímicos seleccionados en la comunidad procariota del suelo. _____ 113

Índice de figuras

Figura 1. Ejemplos de ambientes extremos. A , Glaciar en la Patagonia Argentina; B , Fuentes termales del parque Yellowstone (Wyoming, EE. UU.) y C , Río Tinto en Huelva, España. _____	1
Figura 3. Tasa de crecimiento de microorganismos no extremófilos, extremotolerantes y extremófilos en función de los valores de una determinada propiedad fisicoquímica limitante (adaptado de Cayol et al. 2004). _____	3
Figura 4. Ejemplos de ambientes acuáticos hipersalinos. A , el Gran Lago Salado, en Utah (EE. UU.); B , salina solar de Isla Cristina (Huelva); C , Mar Muerto (Israel/Jordania) y D , Mono Lake, en California (EE. UU.). _____	8
Figura 5. Ejemplos de suelos salinos. A , Suelo salino del saladar de Cordovilla (Albacete) y B , Suelos afectados por sal en India. _____	9
Figura 6. Esquema del Paraje Natural Marismas del Odiel en la provincia de Huelva, España. _____	13
Figura 7. Esquema de los distintos niveles de halofilia propuestos en la clasificación de Kushner y Kamekura (1988). _____	14
Figura 8. Ejemplos de microorganismos halófilos. A , El alga verde unicelular <i>Dunaliella salina</i> ; B , la arquea cuadrada <i>Haloquadratum walsbyi</i> . _____	18
Figura 9. Tipos de rodopsinas (Zhang y col. 2011). _____	20
Figura 10. Estructura de algunos solutos compatibles utilizados por microorganismos halófilos para balancear su equilibrio osmótico (Empadinhas & da Costa, 2008). _____	26
Figura 11. El suelo como hábitat a microescala (Vos et al. 2013) _____ ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 12. Puntos de muestreo en el Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva). _____	48
Figura 13. Material utilizado durante el marcaje con H_2O^{18} y posterior centrifugación isopícnica. _____	50
Figura 14. Ciclos de temperatura utilizados en la reacción de la qPCR en tiempo real. _____	52
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa. _____	53
Figura 16. Punto isoeléctrico del proteoma traducido a partir de las secuencias de las bases de datos metagenómicas de suelo y de referencia, mostrado como el porcentaje del total de secuencias. _____	72
Figura 17. Frecuencia de uso de aminoácidos determinada a partir del metaproteoma traducido de las bases de datos SMO1, SMO2, SS13, SS19, IC21, SS33 y SS37. _____	73

Figura 18. Perfil de contenido en GC de las secuencias de las bases de datos SMO1, SMO2, SS13, SS19, IC21, SS33 y SS37.	74
Figura 19A y B. Curvas de rarefacción basadas en A) la diversidad filogenética evaluada mediante el índice Chao 1, y B) la diversidad funcional en base al número de categorías COGs anotadas en las bases de datos metagenómicas estudiadas.	76
Figura 20. Diversidad procariota a nivel de phylum representada por los contigs mayores de 1 kb de las bases de datos de referencia junto a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelo SMO1 y SMO2 (SMO).	80
Figura 21. Mapa de calor que muestra la proporción de proteínas relacionadas con los subsistemas SEED en los contigs de las bases de datos estudiadas. SMO hace referencia a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelos, SMO1 y SMO2. Se ha aplicado una escala por filas.	89
Figura 22. Árbol filogenómico de los phyla Bacteroidetes y Balneolaeota basado en la concatenación de los genes marcadores del programa PhyloSift v1.0.1. La longitud de rama representa en número de sustituciones por sitio y el valor del nodo representa la confianza de dicha separación. <i>Chlorobium limicola</i> DSM 245T fue utilizado como outgroup.	101
Figura 23. Porcentaje e identidad de secuencias metagenómicas de diversos ambientes salinos con semejanza a la secuencia genómica del bin 1. Las bases de datos de ambientes hipersalinos acuáticos utilizadas fueron: ‘Chile’, que corresponde a la columna de agua de un cristalizador con 34 % de salinidad de la laguna Cahuil (Chile)(Plominsky et al., 2014), ‘San Diego’, resultado de la combinación de las bases de datos metagenómicas de la comunidad microbiana de las salinas de Guerrero Negro (Baja California Sur, México)(Dillon et al., 2013), ‘Santa Pola’, como la combinación de las bases de datos metagenómicas procedentes de la salina Bras del Port, localizada en Santa Pola (Alicante, España)(Fernández et al., 2014a; Ghai et al., 2011) e ‘IC21’, correspondiente a la columna de agua de un estanque concentrador de las salinas de Isla Cristina (Huelva, España)(Fernández et al., 2014c). DCM hace referencia a una muestra de agua marina del mar Mediterráneo con una concentración de sales del 3,5 % (Ghai et al., 2010). Las bases de datos metagenómicas de suelos incluidas corresponden a las obtenidas en esta Tesis Doctoral, SMO1 y SMO2 y ‘Gujarat’, la combinación de las bases de datos de suelos salinos localizados en el Great Rann of Kutch (Gujarat, India) (Pandit et al., 2015).	103
Figura 24. Abundancia relativa de los phyla detectados en las muestras de suelos salinos estudiados.	106
Figura 25. Mapa de calor de la abundancia relativa de los 20 géneros más representados en todas las muestras, evaluado a partir de la abundancia media en el conjunto de las bases de datos.	107
Figura 26. Distribución de los OTUs afiliados a los 20 géneros más abundantes.	110

- Figura 27.** Ordenación NMDS que muestra el agrupamiento de las secuencias de acuerdo con la medida de diversidad Bray-Curtis calculada a nivel de OTU. Los parámetros fisicoquímicos correlacionados significativamente con los ejes del gráfico de ordenación se encuentran representados en el mismo. _ 112
- Figura 28.** Medidas de alfa diversidad calculadas a nivel de OTU de cada sitio y profundidad muestreados. Los lugares de muestreo con diversidad significativamente diferentes se encuentran marcados con letras distintas. _____ 114
- Figura 29.** Gráfica de ordenación que muestra la agrupación de las muestras incubadas en luz y en oscuridad durante tres semanas en función del índice de disimilitud de Bray-Curtis calculado a nivel de OTU. _____ 116
- Figura 30.** Abundancia relativa del gen ARNr 16S en las fracciones de diferente densidad obtenidas mediante centrifugación isopícnica de las muestras incubadas con H_2O , H_2O^{18} , H_2O^{18} + DCMU en condiciones de luz. _____ 118
- Figura 31.** Abundancia relativa del gen ARNr 16S en las fracciones de diferente densidad obtenidas mediante centrifugación isopícnica de las muestras incubadas con H_2O , H_2O^{18} , H_2O^{18} + DCMU en condiciones de oscuridad. _____ 119
- Figura 32.** Gráficos de ordenación basados en Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B) y bacterias (C) de la fracción MP de las muestras incubadas con H_2O^{18} en luz y oscuridad. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado. ___ 122
- Figura 33.** Gráficos de ordenación basados en el índice Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B) y bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H_2O^{18} en luz con y sin DCMU. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado. _____ 123
- Figura 34.** Gráficos de ordenación basados en el índice Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B), y bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H_2O^{18} y DCMU en luz y oscuridad. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado. _____ 124
- Figura 35.** Gráficos de ordenación PCA basados en el índice Bray-Curtis de las comunidades procariotas (A), de arqueas (B) y de bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H_2O^{18} en oscuridad con y sin DCMU. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado. _____ 125

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Ambientes extremos y la vida en ellos

La vida en la Tierra está basada en la química del carbono y requiere de agua en estado líquido, que actúa como solvente intra- y extracelular y como reactivo en numerosas reacciones biológicas. Esto confiere unas características específicas a las biomoléculas y reacciones bioquímicas, que solo son estables y/o acontecen en un rango determinado de condiciones fisicoquímicas. Por ello, el desarrollo de la vida se encuentra muy limitado en aquellos ambientes que presentan parámetros fisicoquímicos alejados de los óptimos para los procesos biológicos, así como en aquellos otros expuestos a factores que interfieren con el metabolismo celular. En este sentido, se consideran ambientes extremos aquellos que presentan valores límite de uno o varios parámetros que afectan al funcionamiento celular, tales como temperatura, pH, radiaciones, concentración de nutrientes, oxígeno, metales pesados, toxinas y compuestos xenobióticos, presión hidrostática, potencial redox, actividad del agua o salinidad (Rodríguez-Valera, 1988; Rothschild & Mancinelli, 2001; Marion et al., 2003).



Figura 1. Ejemplos de ambientes extremos. **A**, Glaciar en la Patagonia Argentina; **B**, Fuentes termales del parque Yellowstone (Wyoming, EE. UU.) y **C**, Río Tinto en Huelva, España.

Otros autores estiman que los verdaderos ambientes extremos son aquellos cuyas características ambientales varían bruscamente y de manera impredecible, y en los que raramente se dan las condiciones óptimas para el desarrollo y propagación de un determinado taxón; en contraposición a ambientes con condiciones estables, aunque extremas, en los que ocurren variaciones estrechas de uno o varios parámetros fisicoquímicos (Gorbushina & Krumbein, 1999). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de ambientes extremos.

Dado que la vida en esas condiciones requiere de adaptaciones específicas, la diversidad en estos ambientes es menor que la encontrada en hábitats no extremos y solo un número limitado de grupos taxonómicos se encuentran bien adaptados a ellos (Brock, 1979; Ventosa, 2006). Se denominan microorganismos extremófilos a aquellos que pueden vivir o permanecer activos en condiciones consideradas límite para la vida. Cabe distinguir aquellos que toleran dichas condiciones aunque sus condiciones óptimas de crecimiento sean otras más moderadas, denominados extremotrofos o extremotolerantes, de los que requieren estas condiciones inusuales para su óptimo desarrollo, para los cuales se reserva el término de extremófilo en sentido estricto (Torsvik & Øvreås, 2008) (Figura 2). Además, reciben diferentes denominaciones en función de la propiedad fisicoquímica extrema a la que estén adaptados (Tabla 1). Así, los termófilos y termotolerantes son los organismos que pueden vivir a altas temperaturas, y los acidófilos y alcalófilos aquellos que habitan ambientes con bajos o altos valores de pH, respectivamente. Los organismos radio-resistentes o tolerantes, los metalo-resistentes o tolerantes soportan altas cantidades de radiaciones y metales pesados, respectivamente. Los organismos piezófilos y piezotolerantes se encuentran en ambientes con altas presiones. Los halófilos y xerófilos están adaptados a la vida en ambientes con altas concentraciones de sales y escasa cantidad de agua, respectivamente. Los organismos poiquilotrofos o poiquilotolerantes habitan ambientes con gran variabilidad de condiciones ambientales. Estos términos no son excluyentes, ya que existen microorganismos poliextremófilos que pueden vivir en ambientes con varias condiciones ambientales extremas, perteneciendo a más de una de las anteriores categorías (Mesbah & Wiegel, 2012). Así, por ejemplo, *Natronomonas pharaonis* es una arquea halófila y alcalófila con un pH de crecimiento óptimo de 8,5 y un requerimiento de sales mínimo de 2 M NaCl (Soliman & Trüper, 1982; Kamekura et al., 1997).

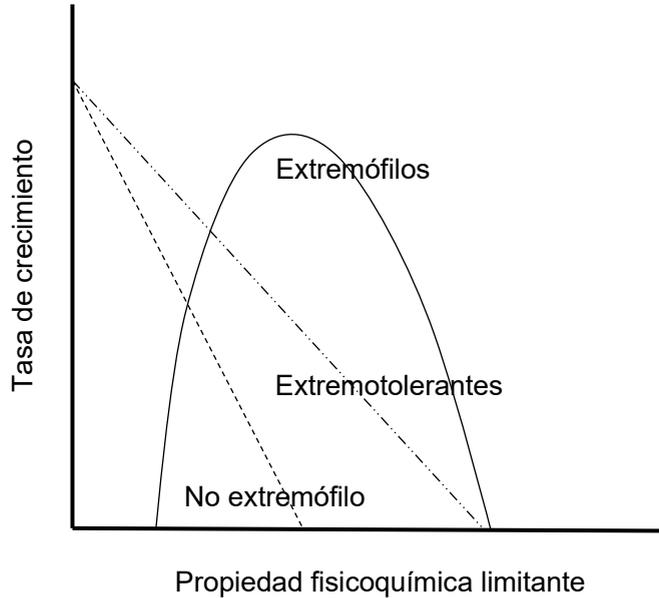


Figura 2. Tasa de crecimiento de microorganismos no extremófilos, extremotolerantes y extremófilos en función de los valores de una determinada propiedad fisicoquímica limitante (adaptado de Cayol et al. 2004).

Los microorganismos extremófilos han despertado gran interés en la comunidad científica, especialmente en el ámbito de la astrobiología, ya que su estudio permite dilucidar los límites de la vida en la Tierra, los mecanismos de adaptación que posibilitan el mantenimiento de la actividad metabólica en dichas condiciones extremas y el desarrollo de posibles estrategias de búsqueda de vida en otros sistemas exteriores a la Tierra donde las características ambientales son muy diferentes (Horikoshi et al., 2011; Cray et al., 2013; Fox-Powell et al., 2016; Pontefract et al., 2017). Además, dado que sus enzimas son activas en una amplia variedad de condiciones ambientales, estos organismos tienen un gran potencial biotecnológico (Horikoshi et al., 2011).

Tabla 1. Categorías de microorganismos extremófilos y extremotolerantes según la naturaleza de su adaptación (adaptado de Rothschild y Mancinelli, 2001).

Condición ambiental extrema	Denominación	Ejemplo
Temperatura	Baja	Psicrófilo, psicrotrofo o psicrotolerante <i>Moritella profunda</i> (Xu et al., 2003), <i>Psychrobacter aquaticus</i> (Shivaji et al., 2005)
	Alta	Termófilo, hipertermófilo <i>Pyrococcus furiosus</i> (Fiala & Stetter, 1986), <i>Thermus aquaticus</i> (Brock & Freeze, 1969)
pH	Ácido	Acidófilo <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Kelly & Wood, 2000), <i>Dunaliella acidophila</i> (Gimmler et al., 1989)
	Alcalino	Alcalófilo <i>Thiohalospira alkaliphila</i> (Sorokin et al., 2008a), <i>Natronomonas pharaonis</i> (Soliman & Trüper, 1982; Kamekura et al., 1997)
Radiación	Radio-resistente/ radio-tolerante	<i>Deinococcus radiodurans</i> (Anderson et al., 1956), <i>Thermococcus gammatolerans</i> (Jolivet et al., 2003)
Metales pesados	Metalo-resistentes/ metalo-tolerante	<i>Ferroplasma cupricumulans</i> (Hawkes et al., 2006), <i>Cupriavidus metallidurans</i> (Goris et al., 2001)
Alta presión hidrostática	Piezófilos o piezotolerantes	<i>Pyrococcus yayanosii</i> (Birrien et al., 2011), <i>Psychromonas hadalis</i> (Nogi et al., 2007)
Salinidad	Halófilo, halotolerante	<i>Haloquadratum walsbyi</i> (Burns et al., 2007), <i>Spiribacter salinus</i> (León et al., 2014)
Deseccación	Xerófilo, xerotolerante	<i>Xeromyces bisporus</i> (Leong et al., 2011), <i>Chrysosporium xerophilum</i> (Pitt, 1966)
Oscilaciones bruscas de condiciones fisicoquímicas	Poiqilotrofos, poiqilotolerantes	<i>Microcoleus sp.</i> , <i>Chroococciopsis sp.</i> (Gorbushina & Krumbein, 1999)

1.2 La salinidad como factor limitante para la vida

El término *salinidad* hace referencia a la presencia de los principales solutos inorgánicos (esencialmente Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , CO_3^{2-}) en disolución (Rhoades et al., 1999). La salinidad ejerce su acción limitante para la vida por medio de una disminución de la disponibilidad de agua y la presencia de una alta concentración de iones.

La presencia de solutos disueltos provoca una disminución del potencial de agua o actividad de agua, que son medidas de la disponibilidad de agua, con respecto a la del agua pura. A mayor concentración de soluto disuelto, menor es el valor del potencial de agua. De manera general, en el potencial de agua, además del término osmótico dependiente de la cantidad de solutos disueltos, intervienen también el potencial mátrico, consecuencia de las fuerzas de atracción entre fases sólidas y líquidas, y el potencial gravitacional (Papendick & Camprell, 1981):

$$\psi_s = \psi_m + \psi_o + \psi_g$$

Donde ψ_s =potencial de agua total (Mpa), ψ_m = potencial mátrico (Mpa), ψ_o =potencial osmótico (Mpa), y ψ_g =potencial gravitacional (Mpa).

Aunque el potencial osmótico es el principal componente determinante de la actividad de agua en ambientes hipersalinos, el potencial mátrico es relevante en hábitats de sustrato sólido como suelos, donde esta propiedad permite retener agua en contra de los procesos de gravedad, evaporación o toma de agua por las plantas.

Dado que las membranas biológicas son permeables al agua y ésta tiende a fluir de compartimentos con mayor potencial a otros donde existe menor potencial de agua hasta alcanzar el equilibrio, los organismos sometidos a condiciones de bajo potencial de agua externo como las que se dan en ambientes hipersalinos sufrirían plasmólisis y deshidratación si no dispusieran de estrategias para mantener la cantidad de agua intracelular necesaria para sus funciones vitales (Kempf & Bremer, 1998; Martin et al., 1999; Czech & Bremer, 2018; Gunde-Cimerman et al., 2018).

El impacto negativo de la salinidad sobre el desarrollo de los organismos no depende únicamente de la disminución del potencial de agua debido a la presencia de solutos en disolución. Así, se han observado ambientes hipersalinos sujetos a la misma presión osmótica que muestran un grado de desarrollo biológico distinto (Javor, 1989a). Además de la concentración absoluta de iones disueltos, sus cantidades relativas y las propiedades específicas de los mismos también influyen sobre la biota de estos ambientes (Park, 2012; Podell et al., 2014). Por ejemplo, una alta proporción de iones multivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y SO_4^{2-} da lugar a una alta fuerza iónica limitante para la vida (Fox-Powell et al., 2016) y un desequilibrio entre aquellos iones con propiedades caotrópicas y cosmotrópicas supone una importante restricción para el desarrollo de la misma en ciertos ambientes hipersalinos (Hallsworth et al., 2003; 2007; Williams & Hallsworth, 2009; Cray et al., 2013).

El efecto de la salinidad depende de la concentración de sales presentes, por lo que su determinación es esencial en los hábitats afectados (Abrol et al., 1988). Aunque la evaluación fiable de la salinidad conlleva la realización de un análisis químico completo (Rhoades, 1982), este método es caro y tedioso por lo que comúnmente se usan métodos indirectos que consisten en la medida de una propiedad física relacionada con la salinidad total, como el índice de refracción o la conductividad eléctrica. El uso de patrones y relaciones empíricas permite calcular la salinidad a partir de estas medidas. Sin embargo, debido a la diferencia en pesos y conductividades equivalentes, así como proporciones de los diversos solutos encontrados en muestras salinas, estas relaciones son aproximadas (Rhoades et al., 1999). Dado que la mayoría de los ambientes hipersalinos estudiados están dominados por cloruro sódico (Fox-Powell et al., 2016), estas medidas son comparables entre ellas en la mayoría de los casos.

I.3 Ambientes hipersalinos y microorganismos halófilos

Los ambientes hipersalinos están representados principalmente por sistemas acuáticos, como los estanques de las salinas solares, los lagos salados naturales o las cuencas marinas anóxicas hipersalinas, así como por los sedimentos de dichos ecosistemas acuáticos hipersalinos y los suelos con alto contenido en sales (Ventosa et al., 2008). También constituyen ambientes hipersalinos las minas y depósitos de sal, el interior de algunas plantas del desierto, pieles curtidas con soluciones salinas, y una variedad de productos en salmuera, salazón o fermentados (Grant et al., 1998; Ventosa, 2006).

I.3.1 Tipos de ambientes hipersalinos

I.3.1.1 Ambientes hipersalinos acuáticos

Un sistema acuático es considerado hipersalino cuando posee una concentración de sales superior a la del agua de mar, esto es, 3,5 % (p/v) (Edgerton & Brimblecombe, 1981; Rodríguez-Valera, 1988). El origen de las sales presentes en estos ambientes determina su composición iónica. Así, encontramos ambientes hipersalinos acuáticos talasosalinos, con una composición iónica similar a la del agua del mar, y atalasalinos, que poseen una composición relativa de sales diferente a las marinas. En los sistemas talasosalinos predominan los iones cloruro y sodio, aunque también están presentes en menor proporción otros iones como magnesio, sulfato, calcio, bicarbonato, bromuro y fluoruro (Ventosa & Arahal, 2002). Las salinas solares, de donde se obtiene sal común por evaporación de agua de mar en sucesivos estanques, son un ejemplo típico de este tipo de ambientes, y constituyen un excelente modelo para el estudio de la biodiversidad microbiana y ecología en hábitats con salinidades crecientes. Por ello, en la literatura podemos encontrar un gran número de estudios de diversidad llevados a cabo en salinas de distintos puntos del planeta (Pašić et al., 2007; 2005; Baati et al., 2008; 2011; Oh et al., 2010; Trigui et al., 2011; Boujelben et al., 2012a; 2012b; Zhaxybayeva et al., 2013; Dillon et al., 2013; Plominsky et al., 2014; Fernández et al., 2014a; Ballav et al., 2015; Di Meglio et al., 2016), aunque son las salinas “Bras del Port”, localizadas en Santa Pola (Alicante), las mejor estudiadas desde el punto de vista microbiológico (Rodríguez-Valera et al., 1981; 1985; Ventosa et al., 1982; 2014; Quesada et al., 1985; Benlloch et al., 1995; 1996; 2001; 2002; Guixa-Boixareu et al., 1996; Antón et al., 1999; 2000; Pedrós-Alió et

al., 2000; Casamayor et al., 2000; 2002; Papke et al., 2004; Estrada et al., 2004; Santos et al., 2010; Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a; Gomariz et al., 2015). Las mayoría de las cuencas hipersalinas de los fondos marinos, como las denominadas Medee, Bannock o l'Atalante en el Mediterráneo oriental y Atlantis II Deep y Discovery Deep en el Mar Rojo, así como de los lagos salinos de la Antártida son también hábitats talasosalinos (Antunes et al., 2011; Ferrer et al., 2012; Stock et al., 2012; Bougouffa et al., 2013; Yakimov et al., 2013; Laybourn-Parry & Wadham, 2014; Oren, 2015a). El Gran Lago Salado (Utah, EE. UU.), el lago Tyrrell (Australia) y los lagos Urmía y Aran-Bidgol (Irán) se consideran también ambientes acuáticos hipersalinos de este tipo ya que la composición relativa de sus sales es similar a la del agua del mar (Alipour, 2006; Jones et al., 2009; Makhdoumi-Kakhki et al., 2012a; Podell et al., 2014). Los ambientes hipersalinos dominados por cloruro sódico son los predominantes en la Tierra (Fox-Powell et al., 2016).

Por otro lado, las sales de los sistemas atalasalinos provienen principalmente de la disolución de depósitos minerales de origen continental. Dada la diversidad geológica y ambiental de cada uno de estos hábitats, los ambientes atalasalinos conforman un conjunto de sistemas con composiciones iónicas más diversas que los talasosalinos. Algunos contienen mayoritariamente cationes divalentes, como magnesio y calcio, mientras que en otros predominan los aniones carbonato y cloruro, dando lugar a masas de agua alcalinas con valores de pH superiores a 8 (Grant & Tindall, 1986). El Mar Muerto constituye el ejemplo mejor conocido de ambiente atalasalino (Volcani, 1940; Nissenbaum, 1975; Oren, 2015a; 1983; 1988; 2006a; 2007; Arahal et al., 1996; Arahal, 1997; Bodaker et al., 2010; 2012; Romanovskaia et al., 2013; Jacob et al., 2017), aunque también han sido estudiados otros sistemas de este tipo como los lagos Vanda y Don Juan, en la Antártida (Siegel et al., 1979; Dickson et al., 2013; Laybourn-Parry & Wadham, 2014; Sumner et al., 2016), y los lagos salinos y alcalinos Mono, Big Soda y Soap en Estados Unidos (Javor, 1989b; Jones et al., 1998; Hawley & Hess, 2014), Magadi en Kenia (Grant & Tindall, 1986; Kambura et al., 2016), Natron en Tanzania (Yakimov et al., 2001), los lagos del Wadi Natrun en Egipto (Imhoff et al., 1979; Jones et al., 1998; Mesbah & Wiegel, 2009), o algunos otros de India (Upasani & Desai, 1990; Antony et al., 2013; Paul et al., 2016), China (Pagaling et al., 2007; 2009; Cao et al., 2008; 2010; Gutiérrez et al., 2008; Grant et al., 2011) y Rusia (Banciu et al., 2008; Vavourakis et al., 2016).



Figura 3. Ejemplos de ambientes acuáticos hipersalinos. **A**, el Gran Lago Salado, en Utah (EE. UU.); **B**, salina solar de Isla Cristina (Huelva); **C**, Mar Muerto (Israel/Jordania) y **D**, Mono Lake, en California (EE. UU.).

1.3.1.2 Sedimentos y suelos salinos

Aunque sedimentos y suelos se agrupan comúnmente debido a la naturaleza sólida de su sustrato, y las funciones biológicas que en ellos se llevan a cabo, se trata de entidades distintas (Schmidt & Schaechter, 2012). Los sedimentos son el resultado de la acumulación de biomasa y material terrígeno por sedimentación desde la columna de agua que soportan y se encuentran constantemente saturados, lo que da lugar a condiciones de anoxia (Schmidt & Schaechter, 2012). La sal existente en estos sistemas tiene el mismo origen que la de la columna de agua con la que se encuentran estrechamente relacionados. Se ha estudiado la microbiota de sedimentos hipersalinos de estanques de salinas (Garabito et al., 1998; Mora-Ruiz et al., 2018), lagos salados (Mesbah et al., 2007; Valenzuela-Encinas et al., 2008; Alcántara-Hernández et al., 2009; Swan et al., 2010; Xiong et al., 2012; Navarro-Noya et al., 2015b; Liu et al., 2016; 2018; Yang et al., 2016) y zonas transitoriamente inundadas por influencia marina, como áreas intermareales en marismas (Munson et al., 1997; Hollister et al., 2010a), o por surgencias de aguas subterráneas con alta concentración de sales (Walsh et al., 2005; Luque et al., 2012b; 2014; Oueriaghli et al., 2013; 2014).

Por su parte, los suelos son sistemas subaéreos desarrollados a partir de roca y material sedimentario por acciones físicas, químicas y biológicas (Schmidt & Schaechter, 2012; Soil

Survey Staff, 2014). Su estructura física es heterogénea y comprende fases sólida, líquida y gaseosa (Groffman & Bohlen, 1999). Están influenciados por el clima, sufriendo continuos ciclos de desecación y humectación, por lo que sus características fisicoquímicas son variables en el tiempo y el espacio (Schmidt & Schaechter, 2012). Las sales presentes en suelos salinos pueden provenir del propio material geológico original, ser resultado de un insuficiente drenaje, tasas de evaporación que superan a las precipitaciones en climas áridos, o bien ser resultado de la influencia mareal en zonas costeras. En contraposición a la salinización primaria, el acúmulo de sales en suelos también puede ser consecuencia de acciones antropogénicas (salinización secundaria), tales como malas prácticas de riego, de fertilización o modificación de los niveles freáticos (Abrol et al., 1988). Debido a la gran diversidad de procesos que contribuyen a la salinización de los suelos, la composición salina de los mismos es variable.



Figura 4. Ejemplos de suelos salinos. **A**, Suelo salino del saladar de Cordovilla (Albacete) y **B**, Suelos afectados por sal en India.

La evaluación de la naturaleza salina de un suelo requiere la determinación de la salinidad del mismo. La salinidad de un suelo corresponde a la cantidad de sal existente en la solución contenida en él. Sin embargo, la obtención de esta solución es compleja, especialmente en aquellos suelos con bajo contenido en agua como es frecuentemente el caso de los suelos salinos (Abrol et al., 1988; Rhoades et al., 1999). Por ello, los parámetros asociados con la salinidad del suelo suelen medirse en un extracto acuoso de suelo. Aunque el extracto utilizado en las clasificaciones de suelos salinos es el denominado pasta saturada o extracto de saturación de suelo (Richards, 1954; Rhoades et al., 1999), otros extractos se usan habitualmente por su mayor facilidad e independencia de la experiencia del ejecutor. El límite de conductividad eléctrica en pasta saturada (CE_e) de 4 dSm^{-1} para definir un suelo salino fue establecido por el US Soil Laboratory en base a los efectos de este parámetro sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (Richards, 1954) y adoptado también por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en su boletín sobre el manejo de suelos afectados por sales (Abrol et al., 1988). Sin embargo, el efecto tóxico de la salinidad para los seres vivos es progresivo. El punto crítico difiere para cada organismo y, por lo tanto, el límite propuesto es arbitrario (Rhoades et al., 1999; Rengasamy, 2006). Por otro lado, atendiendo a criterios pedológicos y edafológicos se han establecido otros valores límite. La Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (WRB), que se usa como estándar internacional para la clasificación de

suelos, sitúa el límite para considerar un horizonte como salino en 15 dS m^{-1} en algún momento durante al año, o bien 8 dS m^{-1} si el $\text{pH} > 8,5$; y el sistema de clasificación taxonómica de suelos coordinado por el Ministerio de Agricultura de Estados Unidos (USDA) lo fija en 30 dS m^{-1} . Existe, pues, diversidad de límites y criterios para definir un suelo como salino. Algunas de estas clasificaciones subdividen los suelos salinos en distintas categorías en función del grado de salinidad (Richards, 1954; Abrol et al., 1988; IUSS Working Group WRB. World reference base for soil resources 2006, first update, 2007).

En cualquier caso, las elevadas concentraciones de sales en los suelo salinos afectan a las propiedades físicoquímicas del mismo y limitan su productividad (Canfora et al., 2014). A pesar de la importancia económica y ecológica, y el creciente aumento de los suelos con problemas de salinidad (Rengasamy, 2006; Smith et al., 2016), los estudios de la microbiota de estos ambientes son escasos (Ventosa et al., 2008; Oren, 2011a) y solo recientemente, durante los últimos meses de esta Tesis Doctoral, ha suscitado un mayor interés en la comunidad científica. Hasta la fecha, se ha abordado el estudio de la comunidad microbiana presente en suelos salinos costeros de España (Quesada et al., 1982; 1983; Garabito et al., 1998), China (Zhao et al., 2018) e Italia (Canfora et al., 2014; 2015), suelos salinos y alcalinos del antiguo lago Texcoco, en México (Valenzuela-Encinas et al., 2008; 2009; Navarro-Noya et al., 2015b), y de Rusia, Egipto y Mongolia (Sorokin et al., 2008c) así como otros suelos interiores naturalmente salinos como Rambla Salada en Murcia (España) (Luque et al., 2012b; 2014; Oueriaghli et al., 2013; 2014), Great Salt Plains (Oklahoma, EE. UU.) (Caton et al., 2004; 2009; Walsh et al., 2005), La Sal del Rey (Texas, EE. UU.) (Hollister et al., 2010a), suelos salinos de la región China de Qarhan Salt Lake (Xie et al., 2017) y los desiertos salinos del Kutch en la India (Pandit et al., 2015; Patel et al., 2015; Narayan et al., 2018).

I.3.1.2.1 Suelos salinos en sistemas de marismas

Las marismas costeras, frecuentemente asociadas a estuarios, constituyen áreas de transición entre ambientes acuáticos y terrestres de alto valor ecológico donde pueden encontrarse una amplia variedad de suelos salinos. Los regímenes de mareas modelan los procesos físicos, químicos y biológicos de estos ecosistemas, dando lugar a hábitats con diferente oxigenación y salinidad según el grado de elevación y frecuencia de inundación (Mitsch & Gosselink, 2007; Moffett et al., 2010). En las elevaciones más bajas se encuentran sedimentos y suelos que se inundan frecuentemente y permanecen saturados durante los períodos de exposición aérea. Su salinidad es similar a la del agua que inunda el sistema. En el otro extremo, la zona más elevada con influencia mareal tan solo se inunda durante mareas vivas equinocciales (Mitsch & Gosselink, 2007; Shen et al., 2018). En estas zonas, la capa de agua subterránea puede caer a profundidades variables por debajo de la superficie en función del balance entre evotranspiración y precipitaciones, dando lugar en climas áridos a condiciones de elevada salinidad que impiden el desarrollo de plantas (Shen et al., 2018). Se generan, así, parches desprovistos de vegetación entre masas de vegetación halófila, que en ocasiones de denominan salitres y donde se encuentran suelos análogos a los localizados en zonas de saladares.

Paraje Natural Marismas del Odiel

El Paraje Natural de las Marismas del Odiel es un espacio natural de marismas mareales situado en el estuario de los ríos Tinto y Odiel en la provincia de Huelva (España). Engloba las Reservas Naturales de la Isla de Enmedio y la Marisma del Burro, que constituyen los núcleos de la Reserva de la Biosfera declarada en 1983. Se trata, además, de una Zona de Especial Conservación para las Aves (ZEPA) y Zona Húmeda de Importancia Internacional (Convenio de Ramsar), siendo, por la diversidad de especies inventariadas en ella, la segunda zona húmeda española más importante para las aves acuáticas, tras las marismas de Doñana (Ficha informativa de los Humedales de Ramsar en Andalucía. Sitio Ramsar Marismas del Odiel, 2007). Más allá de su relevancia ecológica y natural, en este Paraje se llevan a cabo actividades productivas tales como la explotación salinera, la acuicultura, la pesca y el marisqueo, además de la actividad turística. Dado su potencial económico y su localización estratégica, este espacio parece haber sido explotado desde tiempos antiguos ya que se han encontrado yacimientos arqueológicos islámicos y romanos en la isla de Saltés y alrededores (Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Paraje Natural Marismas del Odiel y de las Reservas Naturales Isla de Enmedio y Marisma de El Burro, 2017). Actualmente, los municipios de Huelva, Aljaraque, Gibraleón y Punta Umbría, donde se concentra casi la mitad de la población de la provincia de Huelva, se sitúan alrededor de la Reserva. Con una extensión de 7.184 hectáreas, tuvo su origen en los procesos sedimentarios que se produjeron al inicio de la transgresión Flandriense (Holoceno) (Ruiz et al., 1998; López-González et al., 2006), que dieron lugar al conjunto de islas naturales, canales, caños y esteros que conforman un complejo sistema estuarino con un intrincado sistema de drenaje de tipo dendrítico que permite la redistribución de materia orgánica y nutrientes por todo el área de la marisma. Acciones antropogénicas en las marismas, como la construcción del dique Juan Carlos I en la desembocadura y los dragados del canal de acceso al puerto, han modificado la hidrodinámica de las mismas, registrándose pérdidas de grandes extensiones de las mismas debidas a la erosión en los bordes de los esteros y canales de la zona central del estuario (Castillo et al., 2002; Ramirez-Juidias, 2014).

El paraje posee un clima mediterráneo suavizado por la acción del mar, con unas precipitaciones medias de 506 mm concentradas en otoño e invierno. De mayo a septiembre el área sufre un déficit en el balance hídrico. Los inviernos son suaves y las temperaturas máximas absolutas en verano no superan los 40 grados. El rango mareal medio es de 2,10 m, y se alcanzan casi los 4 m sobre el cero hidrográfico en las mareas altas primaverales (Castellanos et al., 1994; Rubio-Casal et al., 2001). Los ciclos mareales han dado lugar a la creación de distintos hábitats de marismas en este paraje: marisma baja que se inunda periódicamente, marisma media que se inunda con menor regularidad y marisma alta o madura cuyos aportes de agua provienen principalmente de procesos de precipitación, inundándose solamente durante las mareas vivas equinociales (Castellanos et al., 1994). Las mareas también condicionan la distribución espacial (zonación) y temporal (sucesión) de los organismos presentes en la marisma. La vegetación en las Marismas del Odiel se compone principalmente de especies halófitas como *Spartina densiflora*, *Salicornia ramossisima* y *Sarcocornia* (Castellanos et al., 1994), aunque en las zonas de marisma alta también existen algunos cordones boscosos de pino piñonero y

sabina (Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Paraje Natural Marismas del Odiel y de las Reservas Naturales Isla de Enmedio y Marisma de El Burro, 2017).

Este sistema natural tiene una larga historia de contaminación por dos fuentes principales. Por un lado, los ríos Tinto y Odiel discurren a través de la Faja Pirítica Ibérica, que es rica en yacimientos de sulfuros masivos (Davis Jr. et al., 2000; Adamides, 2013). La explotación de estos recursos mineros durante casi 5.000 años (Nocete et al., 2005; Olías & Nieto, 2015) y el impacto de la minería en los ríos Tinto y Odiel ha dado lugar a vertidos ácidos cargados de metales procedentes de drenajes ácidos de las minas que han ido a parar a las cuencas de los ríos Tinto y Odiel (Olías & Nieto, 2015). Consecuentemente, se han detectado descensos de pH y una alta carga de los metales pesados Al, Zn, Fe, Mn, Cu, Co, Cd, Pb, Cr, Ni y de otros elementos como As en las aguas y sedimentos de diferentes tramos de estos ríos (Davis Jr. et al., 2000; Morillo et al., 2002; Olías et al., 2006; Nieto et al., 2007; Cánovas et al., 2008; Ruiz et al., 2009; Sarmiento et al., 2009; Hierro et al., 2014), así como en su estuario (Ruiz et al., 1998; Davis Jr. et al., 2000; Leblanc et al., 2000; Borrego et al., 2002; Montes-Botella & Tenorio, 2003; Sainz et al., 2004; López-González et al., 2006; Nieto et al., 2007; Hierro et al., 2014). Estos elementos también han sido detectados en sedimentos de las Marismas del Odiel y de la Ría de Huelva (Luque et al., 1998; Santos-Bermejo et al., 2003; Morillo et al., 2008; Beltrán et al., 2010), lugares donde precipitan al mezclarse el contenido fluvial con el agua de mar (Nieto et al., 2007; Carro et al., 2011; Hierro et al., 2014). Es así como estos elementos entran en la cadena trófica. Varios autores han descrito la acumulación de metales pesados en halófitas de estas marismas (Luque et al., 1999; Cambrollé et al., 2008; 2011).

La segunda fuente de contaminación del paraje ha sido la actividad industrial del Polo Químico de Huelva (Luque et al., 1999; 2015; Davis Jr. et al., 2000; Bolívar et al., 2002; Morillo et al., 2002), establecido en los años 1960, cuyos residuos fueron vertidos sin control a la ría de Huelva hasta la creación del Plan Corrector de Vertidos (Luque et al., 1998). En los últimos años, se está produciendo una mejora del ecosistema estuarino debido a la disminución de los vertidos industriales a la Ría (Olías et al., 2006; Ruiz et al., 2009; Hierro et al., 2014). Sin embargo, a pesar del cese de actividad de casi todas las minas de las cuencas de los ríos Tinto y Odiel, los aportes contaminantes mineros siguen siendo importantes (Olías et al., 2006; Olías & Nieto, 2015).

La flora de esta zona ha despertado gran interés científico y se han realizado un elevado número de estudios sobre su distribución y dinámica poblacional (Castellanos, 1992; Nieva et al., 2001; Redondo-Gómez et al., 2007), fisiología y ecología (Nieva, 1996; Castillo, 2001; Redondo et al., 2004; Redondo-Gómez et al., 2006; Castillo & Figueroa, 2009a), capacidad para la bioacumulación de metales y su uso en fitorremediación (Cambrollé et al., 2008; 2011; Castillo & Figueroa, 2009b; Curado et al., 2014a; 2014b).

Aunque una amplia diversidad de estudios han tratado las comunidades microbianas de las aguas ácidas del Tinto (Fernández-Remolar et al., 2008; Palacios et al., 2008; Souza-Egipsy et al., 2008; Garbayo et al., 2012; García-Moyano et al., 2012; Oggerin et al., 2014; Sánchez-Román et al., 2014; Amils, 2016), la información disponible sobre la microbiota de los distintos hábitats

de las Marismas del Odiel se reduce a los recientes trabajos de aislamiento y caracterización de rizobacterias de *Spartina maritima* con potencial para biorremediación (Paredes-Páliz et al., 2016) y arqueas y bacterias halófilas de la salinas de Bacuta y Aragonesas (actualmente Salinas del Odiel S.L.) (Marquez et al., 1987; Infante-Domínguez et al., 2015; León et al., 2015; de la Vega et al., 2016; López-Hermoso et al., 2017a; 2017b).

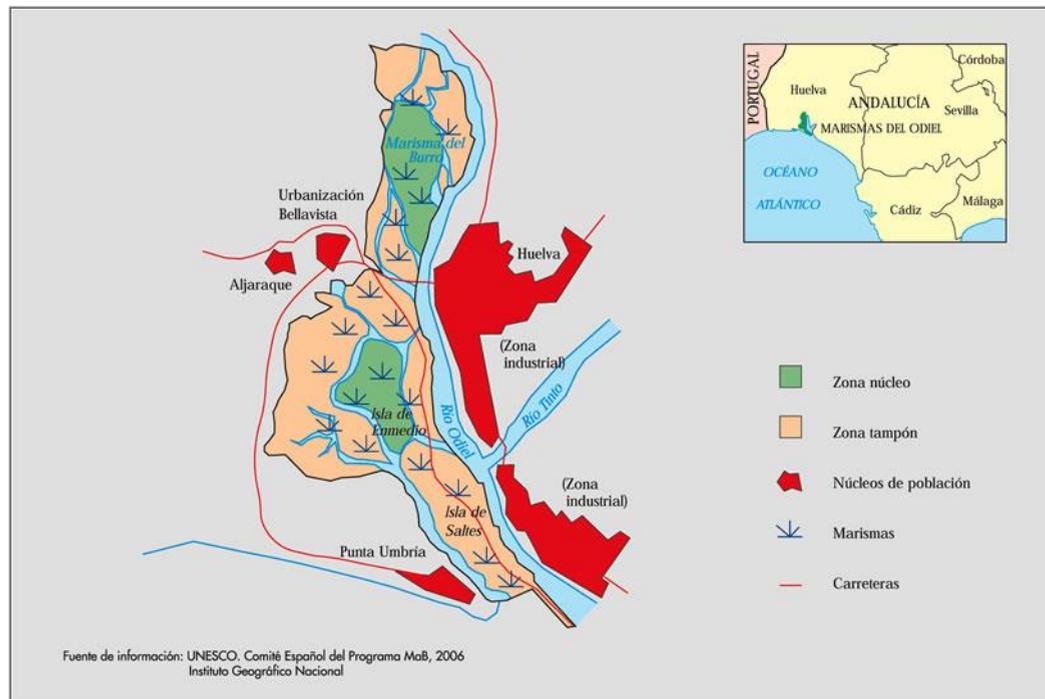


Figura 5. Esquema del Paraje Natural Marismas del Odiel en la provincia de Huelva, España.

1.3.2 Microorganismos halófilos

1.3.2.1 Concepto y clasificación

Se ha acuñado el término halófilo, que significa “amigo de la sal” en griego (de *hals*, sal, y *phil*, amor o amigo), para describir a aquellos organismos que requieren altas concentraciones de sales para crecer óptimamente. También se han descrito seres vivos halotolerantes que pueden vivir en ambientes hipersalinos, soportando altas concentraciones de sales, aunque no requieran altas cantidades de estas sustancias para su óptimo crecimiento.

Las sales constituyen nutrientes esenciales para los seres vivos, ya que son fuente de cationes y aniones que intervienen como cofactores en reacciones enzimáticas vitales. Además, el estudio de las relaciones con la sal de diferentes organismos revela un continuo de comportamientos con respecto a la salinidad del medio (observando óptimos de crecimiento, así como concentraciones mínimas requeridas y máximos tolerados en todo el rango salino), por lo que la delineación de los límites de crecimiento de los microorganismos halófilos y las diferentes categorías de éstos no son estancas (Oren, 2008). Aunque se han propuesto varias clasificaciones (Trüper & Galinski, 1986; Vreeland, 1987; Ramos-Cormenzana, 1989), la más

ampliamente utilizada es la propuesta por Kushner y Kamekura en 1988 (Kushner & Kamekura, 1988). Ésta divide a los microorganismos en grupos según la concentración de NaCl requerida para su óptimo crecimiento:

- **Microorganismos no halófilos.** Éstos se desarrollan óptimamente en medios con menos del 1 % p/v de NaCl (0,2 M, aproximadamente). Aquellos que pueden tolerar altas concentraciones de sal son conocidos como halotolerantes. En caso de que éstos soporten concentraciones de NaCl superiores al 15 % p/v (aproximadamente 2,5 M) se denominan halotolerantes extremos.
- **Halófilos débiles.** Crecen óptimamente en medios con un contenido en sales del 1 al 3 % p/v (0,2-0,5 M) de NaCl. Éste es el caso de los microorganismos marinos.
- **Halófilos moderados.** Su crecimiento es óptimo en medios con 3-15 % p/v de NaCl (0,5 a 2,5 M).
- **Halófilos extremos.** Crecen más favorablemente en medios que contienen del 15 % a saturación de sales, alrededor de 32 % p/v (2,5-5,2 M) de NaCl.

Aunque los niveles de halofilia propuestos por Kushner y Kamekura (1988) se establecen en función de los requerimientos óptimos y tolerancias al cloruro sódico, la sal más abundante en la mayoría de los ambientes hipersalinos de la tierra (Fox-Powell et al., 2016), otras sales e iones pueden ser requeridas y/o toleradas para el crecimiento óptimo de un microorganismo (Arahal et al., 2007; Kim et al., 2015). Algunos organismos necesitan iones específicos para su crecimiento, como el Na^+ (Sánchez-Porro et al., 2009), el Mg^{2+} (Valderrama et al., 1991; Savage et al., 2007) o el Cl^- (Roefßler & Müller, 1998; Müller & Oren, 2003). Además, el requerimiento de sales para crecer puede variar en una misma especie en función de otras condiciones como la temperatura de incubación (Post, 1977) o la concentración de nutrientes en el medio (Forsyth & Kushner, 1970).

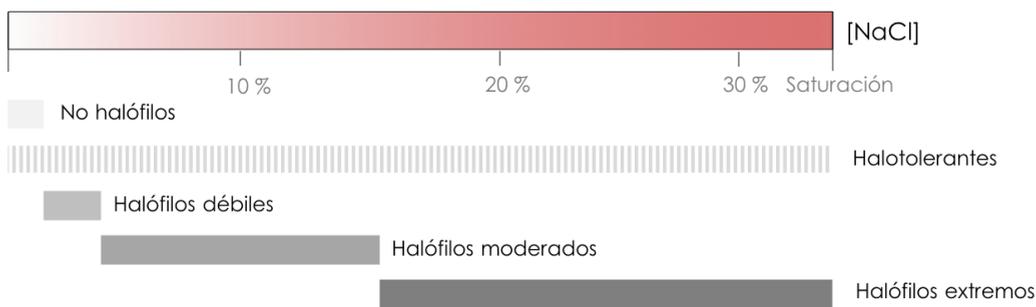


Figura 6. Esquema de los distintos niveles de halofilia propuestos en la clasificación de Kushner y Kamekura (1988).

1.3.2.2 Diversidad filogenética

A pesar de las extremas condiciones de estrés osmótico frecuentemente combinadas con altas temperaturas, radiación solar, presiones y bajas concentraciones de oxígeno que se dan en los ambientes hipersalinos, la diversidad microbiana presente en éstos incluye representantes de los tres dominios del árbol de la vida (Oren, 2008).

Aunque no solo los microorganismos son capaces de sobrevivir en ambientes hipersalinos (el crustáceo *Artemia salina* y las larvas de la mosca del género *Ephydra* pueden observarse fácilmente en ambientes acuáticos talasosalinos con salinidades de hasta 15-20 %), se trata de los organismos que mejor soportan estas condiciones y nos centraremos en ellos.

1.3.2.2.1 Arqueas

Todas las arqueas halófilas obtenidas en cultivo puro hasta el momento pertenecen al phylum *Euryarchaeota*. En este phylum se encuadran las arqueas halófilas extremas principalmente aerobias, conocidas como haloarqueas, que conforman la clase *Halobacteria*, y un número reducido de arqueas metanógenas halófilas. Mientras que las arqueas metanógenas halotolerantes o halófilas descritas hasta la fecha se circunscriben a cinco géneros de las clases *Methanomicrobia* (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus* y *Methanosalsum* del orden *Methanosarcinales* y *Methanocalculus* del orden *Methanomicrobiales*) y "*Methanonatronarchaea*" ("*Methanonatronarchaeum thermophilum*") (de la Haba et al., 2011; Sorokin et al., 2017), la clase *Halobacteria* es extensa y en la última revisión disponible constaba de 177 especies agrupadas en 48 géneros distintos (de la Haba et al., 2011; Parte, 2014; Gupta et al., 2015). Una reciente reclasificación distingue tres órdenes dentro de la clase *Halobacteria*: *Natrialbales*, *Haloferacales* y *Halobacteriales*, cada uno de ellos con una familia: *Natrialbaceae*, *Haloferacaceae* y *Halobacteriaceae*, respectivamente (Gupta et al., 2015). Las haloarqueas han sido consideradas tradicionalmente como los microorganismos halófilos extremos por excelencia dado su requerimiento de sales para crecer en el laboratorio y la dominancia de la comunidad microbiana en sistemas con concentraciones superiores al 20 %. De hecho, sus bacteriorrubéricas y derivados, que son pigmentos carotenoides de 50 átomos de carbono abundantes en la membrana de la mayoría de las haloarqueas, son los principales responsables de la coloración roja-rosada de muchos ambientes hipersalinos con altas concentraciones de sales. Sin embargo, se han aislado y descrito arqueas halófilas moderadas e incluso algunas capaces de crecer en ambientes con bajas concentraciones de sales, por lo que este paradigma está cambiando (Oren, 2008).

El estudio de diversos ambientes hipersalinos por métodos independientes de cultivo ha puesto de manifiesto la existencia de un grupo abundante de arqueas halófilas relacionadas con la clase *Halobacteria*. Las primeras secuencias relacionadas con este grupo fueron detectadas en el lago alcalino hipersalino Magadi, en Kenya, en 1999 (Grant et al., 1999). Posteriormente, Casanueva y colaboradores observaron la presencia de arqueas de pequeño tamaño no solo en ambientes hipertermófilos donde habitaban las nanoarqueas conocidas hasta la fecha, sino también en ambientes hipersalinos como la columna de agua de una salina en Mongolia Interior (China) y sedimentos de una salina localizada en Sudáfrica (Casanueva et al., 2008); y Ghai y

colaboradores detectaron este grupo en estanque concentradores de las salinas Bras del Port (Santa Pola, Alicante) (Ghai et al., 2011). Desde entonces, estas arqueas de tamaño $\sim 0,6 \mu\text{m}$ han sido detectadas en diversos ambientes alrededor del planeta con salinidades comprendidas entre el 19 % y 40 % (Zhaxybayeva et al., 2013; Baricz et al., 2014a; Martínez-García et al., 2014; Gomariz et al., 2015; Di Meglio et al., 2016; Vavourakis et al., 2016; dC Rubin et al., 2017; Finstad et al., 2017; Vogt et al., 2018) y 18 genomas relacionados con las mismas han sido reconstruidos (Narasingarao et al., 2012; Martínez-García et al., 2014; Vavourakis et al., 2016; Finstad et al., 2017). En base a los análisis filogenéticos realizados mediante comparación de las secuencias del gen ARNr 16S procedentes de hábitats hipersalinos y alcalinos, las nanohaloarqueas fueron inicialmente reconocidas como un grupo del phylum *Euryarchaeota* lejanamente emparentado con las arqueas de la clase *Halobacteria* (Narasingarao et al., 2012; Oren, 2014a). Recientes reconstrucciones genómicas han permitido proponer un nuevo phylum candidato, "*Nanohaloarchaeota*", dentro del superphylum "DPANN" para alojar a estos nuevos microorganismos (Rinke et al., 2013; Castelle et al., 2015). A pesar del carácter elusivo de estos microorganismos, que no han podido ser obtenidos en cultivo puro hasta la fecha, y de su disputada filogenia, la reconstrucción de diversos genomas de este grupo de arqueas de bajo GC están permitiendo conocer el potencial fisiológico y metabólico de "*Nanohaloarchaeota*". Se trata de microorganismos heterótrofos cuya relación con el oxígeno no está clara: aunque Narasingarao y colaboradores propusieron para este grupo un metabolismo predominantemente aeróbico, Vavourakis y colaboradores no encontraron oxidasa terminal de aerobiosis en los genomas reconstruidos relacionados con este grupo que contenían, sin embargo, genes relacionados con un modo de vida fermentativo (Narasingarao et al., 2012; Vavourakis et al., 2016). A pesar de su prevalencia y abundancia en ambientes hipersalinos, el grado de halofilia de este último grupo de arqueas no ha podido ser determinado, ya que ninguno de sus representantes ha sido aislado en cultivo puro ni por tanto caracterizado.

1.3.2.2.2 Bacterias

La tolerancia y adaptación a una salinidad ambiental elevada son características muy extendidas en el dominio *Bacteria*. El grupo contiene desde microorganismos halotolerantes hasta halófilos extremos englobados en diferentes ramas filogenéticas: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Thermotogae* y *Verrucomicrobia* (De La Haba et al., 2010). Estos grupos no contienen únicamente especies halófilas, por lo que es frecuente encontrar en el árbol de la vida microorganismos halófilos estrechamente relacionados con otros no halófilos y, además, muchos géneros, familias y órdenes contienen representantes con una gran variedad de requerimientos y tolerancia a la sal. Si bien el rasgo halofílico se encuentra repartido en diferentes ramas filogenéticas, el orden *Halanaerobiales* alberga exclusivamente microorganismos halófilos. A excepción del género *Zymobacter*, las bacterias de la familia *Halomonadaceae* son todas halófilas también. Como las haloarqueas, los miembros de la familia *Halomonadaceae* son heterótrofos y aerobios, con limitadas posibilidades de crecimiento anaeróbico. Por su parte, el orden *Halanaerobiales* contiene bacterias con un estilo de vida anaerobio fermentativo con azúcares como principales sustratos (Oren, 2008). El metabolismo

de las bacterias halófilas es muy diverso, incluyendo desde microorganismos aerobios a anaerobios estrictos, así como fotótrofos y heterótrofos.

Aunque la mayoría de las bacterias halófilas toleran o están adaptadas a salinidades bajas o moderadas (10-20 % NaCl), se han descrito bacterias con requerimientos más extremos de sales, como *Actinopolyspora halophila* (*Actinobacteria*) (Gochnauer et al., 1975), *Halorhodospira halophila* (actualmente *Ectothiorhodospira halophila*) (Hirschler-Rea et al., 2003), *Ectothiorhodospira halochloris* (Imhoff & Trüper 1977), *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (Sorokin et al. 2006) pertenecientes a *Gammaproteobacteria*, *Halanaerobium lacusrosei* (*Firmicutes*) (Cayol et al. 1995), *Acetohalobium arabaticum* (Zhilina & Zavarzin 1990), *Halobacteroides lacunaris* (Zhilina et al. 1991) y los miembros descritos de los géneros *Salinibacter* y *Salinivenuus* (*Rhodothermaeota*) (Oren, 2002; Ventosa, 2006; Murrain et al. 2006; Muñoz et al. 2016; Viver et al. 2017). Los representantes de este último género, que contiene actualmente dos especies (Antón et al., 2002; Makhdoumi-Kakhki et al., 2012b; Viver et al., 2018), crecen óptimamente en una concentración de 3-4 M NaCl, requieren un mínimo de 15 % de sales totales y conviven con haloarqueas en ambientes hipersalinos extremos como los estanques cristalizadores de las salinas (Antón et al., 2002; 2008; Oren et al., 2004b; Ghai et al., 2011; Oren, 2013a). Por sus peculiares características y abundancia en estos sistemas, estas bacterias han suscitado el interés en la comunidad científica y se ha estudiado en profundidad su distribución, abundancia, diversidad, fisiología, metabolismo y mecanismos de adaptación, entre otros (Antón et al., 2002; 2008; 2013; Oren, 2002; 2013a; Mongodin et al., 2005; Rosselló-Mora et al., 2008; Lattanzio et al., 2009; Pašić et al., 2009; Peña et al., 2010; Brito-Echeverría et al., 2011; Sudo et al., 2014; Viver et al., 2018).

1.3.2.2.3 Eucariotas

Si bien los procariotas son los principales habitantes de los ambientes hipersalinos, también existen representantes del dominio *Eukarya* capaces de vivir en condiciones salinas, especialmente cuando la salinidad no es muy elevada (Ventosa, 2006). El eucariota halófilo mejor estudiado es sin duda *Dunaliella salina*. Este alga, que se encuentra hasta en salinidades del 30 % de sales totales, es el principal productor primario de los ambientes hipersalinos acuáticos estudiados (Stephens & Gillespie, 1976; Post, 1977; Rodríguez-Valera et al., 1985; Javor, 1989b; Oren, 2005; 2014b; Elevi Bardavid et al., 2008). *Dunaliella* puede acumular grandes cantidades de betacarotenos, lo cual contribuye al color rojizo de los ambientes acuáticos donde predomina, además de proporcionarle valor biotecnológico (Oren, 2005). Aunque en menor proporción, otros eucariotas pueden formar parte de la microbiota de los ambientes hipersalinos: el alga flagelada fotosintética *Asteromonas gracilis*, hongos filamentosos de los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Gymnascella*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* y *Wallemia*; levaduras halófilas y halotolerantes como *Aureobasidium pullulans*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hortea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodospiridium sphaerocarpum*, *Rhodospiridium babjevae*, *Rhodotorula laringes*, *Trimmatostroma salinum* y *Yarrowia lipolytica*, así como varios tipos de protozoos ciliados y flagelados (Butinar et al., 2005a; 2005b; 2005c; Cho, 2005; Ventosa, 2006; Triadó-Margarit &

Casamayor, 2013). Aún no se conoce la contribución de los hongos halófilos a la actividad heterotrófica en estos sistemas. Los protozoos, por su parte, contribuyen a la cadena trófica controlando la densidad de la comunidad procariota heterotrófica en estanques de salinidad intermedia (10-15 %) (Pedrós-Alió et al., 2000).

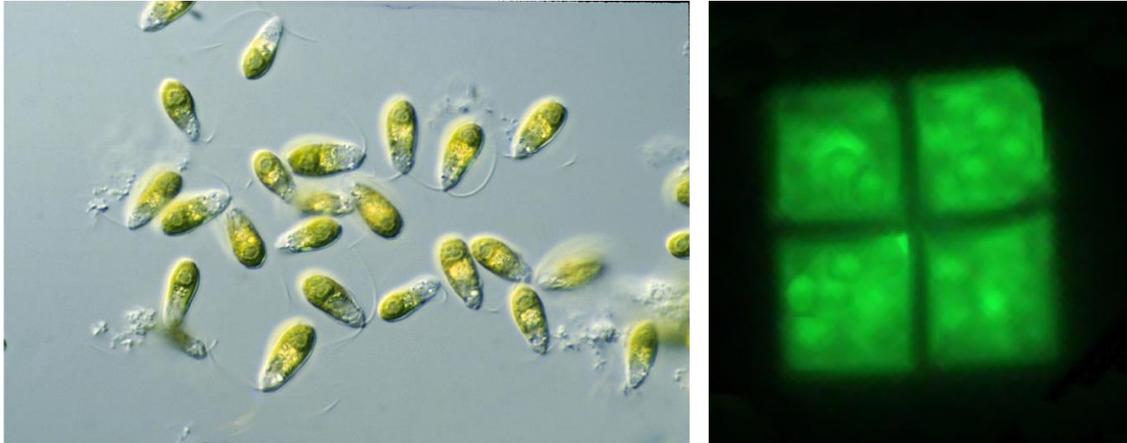


Figura 7. Ejemplos de microorganismos halófilos. **A,** El alga verde unicelular *Dunaliella salina*; **B,** la arquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi*.

I.3.2.2.4 Virus

Con 10^9 partículas virales por mililitro, los ambientes hipersalinos son los sistemas acuáticos estudiados con mayor densidad vírica (Atanasova et al., 2015). La población vírica en estos ambientes aumenta a medida que lo hace la salinidad, correlacionándose con el número de procariotas (Santos et al., 2012). Además, se ha propuesto que éstos son frecuentemente los responsables del control de la población microbiana presente en ambientes hipersalinos extremos, ya que los protozoos depredadores suelen estar ausentes a partir de concentraciones salinas del 25 % (Guixa-Boixareu et al., 1996; Pedrós-Alió et al., 2000; Santos et al., 2012). El material genético de todos los virus halófilos descritos hasta la fecha es ADN, pudiendo ser atenuados o virulentos, y presentando diversas morfologías: se conocen myovirus, siphovirus, podovirus, virus icosaédricos con membrana interna, pleomórficos y con forma de limón, siendo los dos últimos morfotipos actualmente específicos de virus de arqueas (Atanasova et al., 2015; 2018).

A pesar de su abundancia, solo se conoce una pequeña parte de la diversidad vírica existente en ambientes hipersalinos. Hasta la fecha se han descrito 90 halovirus de arqueas, frente a tan solo diez que infectan bacterias halófilas (Atanasova et al., 2015). Todos los virus de haloarqueas aislados infectan a miembros del phylum *Euryarchaeota* (Prangishvili, 2013), aunque también se han descrito por métodos independientes de cultivo virus de nanohaloarqueas (García-Heredia et al., 2012; Martínez-García et al., 2014). Por su parte, todos los halovirus de bacterias conocidos infectan a especies pertenecientes a géneros frecuentemente aisladas en el laboratorio a partir de ambientes hipersalinos: *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Salicola*, *Salinivibrio* y *Salisaeta*. Los únicos halovirus de eucariotas aislados infectan a la ameba halotolerante *Acanthamoeba polyphaga* (Boughalmi et al., 2013). No se

conocen virus que infecten al alga *Dunaliella salina* o a hongos halófilos. Sin embargo, se han detectado por métodos independientes de cultivo un gran número de phycodnavirus de algas fototróficas así como virofagos atacando a esos mismos virus en lagos hipersalinos de la Antártida (Yau et al., 2011).

1.3.2.3 Diversidad metabólica

Dada la gran diversidad filogenética del mundo halófilo, no es raro que los procesos por los que estos microorganismos obtienen carbono y energía sean también muy diversos.

La luz es un recurso abundante en muchos ambientes hipersalinos, por lo que una variedad de halófilos y halotolerantes son capaces de obtener energía a partir de ella. Así, se han descrito microorganismos fotosintéticos oxigénicos en todo el rango de salinidad. Aunque algunos microorganismos marinos como las diatomeas pueden soportar concentraciones de sal de hasta 10-15 %, a concentraciones superiores este proceso es únicamente llevado a cabo por cianobacterias (unicelulares, como *Aphanothece halophytica*, y filamentosas, como *Phormidium* spp., o *Halospirulina tapeticola*) y algas verdes unicelulares del género *Dunaliella*. A partir del 20-25 % de salinidad, solo *Dunaliella* es capaz de realizar la fotosíntesis oxigénica (Oren, 2011a).

La fotosíntesis en ambientes salinos también puede tener lugar con el sulfuro como donador de electrones. Los microorganismos con este metabolismo son comunes en los tapetes microbianos, donde pueden observarse formando una capa de color morado. Las bacterias halófilas fotótroficas del azufre incluyen a los géneros *Halochromatium*, *Thiohalocaspa*, *Ectothiorhodospira* o *Halorhodospira*. Este proceso puede ocurrir a altas concentraciones de sal, e incluso en ambientes con condiciones concomitantes de alto pH (Ollivier 1994). También se han descrito bacterias púrpura del azufre de metabolismo fotoheterótrofo, como son las especies *Rhodovibrio salinarum*, *Rhodospirillum sodomense* y *Rhodothalassium salexigens*, cuyo rango de crecimiento se extiende hasta el 20-24 % de sales (Oren, 2011a).

Otro mecanismo por el que los microorganismos halófilos obtienen energía a partir de la luz en un amplio rango de salinidades consiste en la utilización de pigmentos basados en retinal, las rodopsinas (Oren, 2011a; Pinhassi et al., 2016). Las rodopsinas microbianas, descritas por primera vez en la haloarquea *Halobacterium salinarum*, se encuentran en los tres dominios del árbol de la vida, así como en virus (Grote, 2011; Ernst et al., 2014; Pushkarev & Béjà, 2016). Estas rodopsinas pueden funcionar como bombas de protones (bacteriorrodopsinas, proteorrodopsinas, xanthorrodopsinas y actinorrodopsinas), bomba de iones cloruros (halorrodopsinas de arqueas y rodopsinas de cloruros de bacterias) y de sodio (en bacterias), como canales menos específicos (“channelrhodopsins”), así como sensores de luz (tipos I y II, que actúan como sensores fototáxicos positivos y negativos, respectivamente, y las rodopsinas sensoriales de tipo III) (Pinhassi et al., 2016; Pushkarev & Béjà, 2016). Mientras que las proteorrodopsinas son abundantes en la superficie del océano y se han descrito en diversos miembros de los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Euryarchaeota* marinos (Béjà et al., 2001; Pinhassi et al., 2016), otros tipos de rodopsinas son exclusivos de microorganismos halófilos:

se trata de las bacteriorrodopsinas y rodopsinas sensoriales de tipo II de haloarqueas y las halorrodopsinas y rodopsinas sensoriales tipo I, que únicamente se han descrito en haloarqueas y en la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Pinhassi et al., 2016). Así, por ejemplo, los microorganismos halófilos extremos *Halobacterium salinarum* y *Salinibacter ruber* poseen varios tipos de rodopsinas: el primero posee una halorrodopsina, una bacteriorrodopsina y dos rodopsinas sensoriales (SRI y SRII), mientras que *S. ruber* posee una halorrodopsina, una xantorrodopsina y dos rodopsinas sensoriales de tipo I (Bryant & Frigaard, 2006). Diversos estudios han demostrado que el gradiente de protones generado por rodopsinas contribuye al *pool* energético celular y puede emplearse en diversos procesos. Se ha demostrado que en algunos microorganismos este proceso es responsable del aumento de la supervivencia en células en condiciones de estrés nutricional, y/o estimulación del crecimiento cuando una fuente de luz está presente (Oren, 2011a; Pinhassi et al., 2016). Así, Hartmann y colaboradores comprobaron que *Halobacterium salinarum* puede crecer anaeróbicamente en presencia de luz gracias a sus bacteriorrodopsinas (Hartmann 1990). Sin embargo, no se ha demostrado crecimiento autótrofo en microorganismos con estos pigmentos (Andrei et al., 2012; Pinhassi et al., 2016).

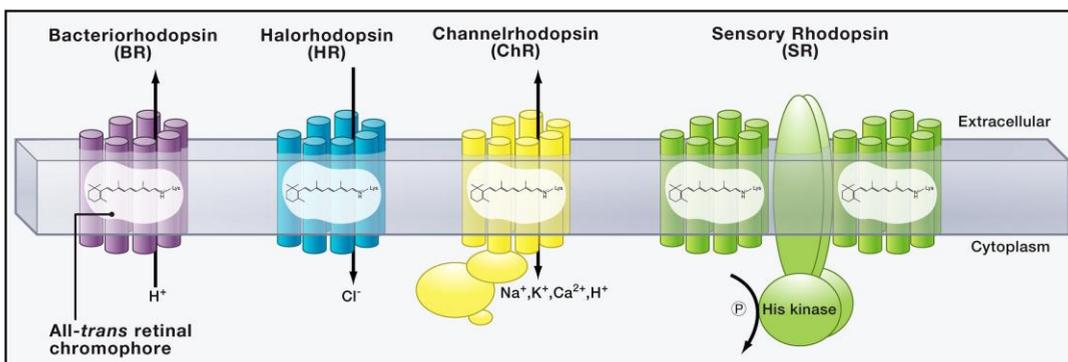


Figura 8. Tipos de rodopsinas (Zhang y col. 2011).

También se han observado procesos quimioautótrofos en ambientes salinos. Algunos de estos procesos pueden darse a concentraciones altas de sal, mientras otros parecen estar restringidos a un rango salino más bajo. La oxidación del amonio a nitrato via nitrito (nitrificación) de forma autótrofa ocurre en sistemas marinos, pero no ha sido detectado en ambientes con salinidades superiores al 15 % (Oren, 2011a). *Nitrosomonas europaea* (Betaproteobacteria) y "*Nitrosococcus halophilus*" (Gammaproteobacteria) pueden llevar a cabo estos procesos a concentraciones de sal inferiores al 9 % (Koops et al., 1990; Ward et al., 2000). Por otro lado, la información sobre el uso de nitrito como donador de electrones para el crecimiento autótrofo en ambientes hipersalinos es muy reducida.

Se han descrito microorganismos halófilos capaces de oxidar compuestos de azufre y crecer quimioautotróficamente hasta a concentraciones de sal del 29 %. *Halothiobacillus halophilus* y *Thiohalorhabdus denitrificans* (Gammaproteobacteria), –el cual también puede crecer en anaerobiosis usando nitrato como aceptor final de electrones–, además de las especies alcalófilas *Thiohalospira halophila*, *Thiohalospira alkaliphila* y *Thioalkalivibrio halophilus*

(*Ectothiorhodospira*; *Gammaproteobacteria*), pueden llevar a cabo este proceso (Banciu et al., 2004; Sorokin & Kuenen, 2005; Sorokin et al., 2008b).

Se conocen halófilos capaces de crecer autotróficamente a partir de la oxidación del arsenito As (III) a arseniato As (V), utilizando oxígeno o nitrato como aceptor de electrones. *Alkalilimnicola ehrlichii* (*Gammaproteobacteria*) puede crecer como un quimioautótrofo mediante este proceso hasta 19 % de sales, aunque también es capaz de crecer heterotróficamente (Hoeft et al., 2007).

Aunque algunos metanotrofos con moderada halotolerancia se han aislado de lagos salinos, su crecimiento óptimo ocurre a tan solo un 2 % de sales (Trotsenko & Khmelenina, 2002).

La gran mayoría de microorganismos halófilos y halotolerantes descritos son heterótrofos y aerobios. A concentraciones de sal inferiores a 20-25 %, los representantes del dominio *Bacteria*, como aquellos de la familia *Halomonadaceae*, son los principales responsables de la actividad heterotrófica, y pueden crecer a partir de un amplio rango de sustratos (Arahal & Ventosa, 2006). La variedad de sustratos a partir de los que es posible el crecimiento a altas concentraciones de sal es más reducida. Los grupos de heterótrofos aeróbicos que habitan salinidades más altas pertenecen a la clase *Halobacteria* (*Archaea*) y al género *Salinibacter* (*Bacteria*) (Oren, 2008). Los principales sustratos utilizados por las haloarqueas y *Salinibacter* como fuente de carbono y energía son aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos (Antón et al., 2017; Oren et al., 2017). Se estima que el glicerol, el soluto compatible acumulado por *Dunaliella*, es uno de los principales sustratos disponibles para la comunidad procariota heterótrofa de estos hábitats (Oren, 2011b; Williams et al., 2016). Aunque unas 50 haloarqueas, y miembros del género *Salinibacter*, han mostrado la capacidad de crecer en este sustrato, y la actividad respiratoria de la comunidad microbiana del Mar Muerto y estanques cristalizadores de salinas en Eilat (Israel) era estimulada por la adición de este compuesto (Oren, 1995; 2016), la monitorización *in situ* de su uso por la comunidad procariota de un estanque cristalizador de una salina solar en Santa Pola, Alicante reveló que ni *Haloquadratum* ni *Salinibacter* incorporaban este compuesto (Rosselló-Mora et al., 2003). Por otro lado, el uso de piruvato como sustrato en medios de cultivo ha permitido el aislamiento de microorganismos abundantes en salinas solares pero de difícil cultivo, como *Haloquadratum* o *Spiribacter* (Oren, 2015b). El conocimiento del papel de estos dos sustratos en la ecología de procariotas de sistemas hipersalinos es aún escaso (Oren, 2015b).

El oxígeno tiene una limitada solubilidad en soluciones con altas concentraciones de sales y, por ello, puede actuar como factor limitante para el crecimiento de halófilos aerobios. Por ello, algunos microorganismos halófilos son capaces de utilizar aceptores de electrones diferentes al oxígeno o fermentar compuestos orgánicos, así como de llevar a cabo procesos estrictamente anaeróbicos como son la metanogénesis y homoacetogénesis (Oren, 2011a).

Algunos microorganismos halófilos son capaces de utilizar otros aceptores finales de electrones alternativos al oxígeno como nitrato, sulfato, selenato y arseniato (Oren, 2008; Andrei et al., 2012). Una gran variedad de microorganismos halotolerantes y halófilos pueden utilizar el nitrato como aceptor final de electrones. Éstos son los miembros de la familia *Halomonadaceae*

y algunas arqueas halófilas de la clase *Halobacteria* (*Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*) (Mancinelli & Hochstein, 1986; Ventosa et al., 1998). Teniendo en cuenta las bajas concentraciones de nitrato generalmente encontradas en los ambientes hipersalinos, y la aparente ausencia del proceso regenerativo del mismo (nitrificación) a altas concentraciones salinas, la reducción de nitrato como respiración anaeróbica parece ser limitada en la naturaleza (Oren, 1994).

La capacidad de reducir dimetilsulfóxido, trimetil-N-óxido o fumarato está también bastante extendida (Andrei et al., 2012). La reducción desasimilatoria del sulfato se ha observado en ambientes anaerobios hipersalinos, incluso en aquellos con altos valores de pH (Oren, 2011a). Sin embargo, todos los microorganismos halófilos y halotolerantes extremos descritos hasta la fecha son incapaces de llevar a cabo oxidaciones completas de sus sustratos mediante este proceso (Oren, 1999a), que tan solo se han descrito a concentraciones salinas inferiores al 13 % por *Desulfobacter halotolerans* (*Deltaproteobacteria*) (Brandt & Ingvorsen, 1997). *Desulfohalobium retbaense*, otra deltaproteobacteria, crece óptimamente al 10 % y tolera hasta 24 % de sales y es el aislado capaz de llevar a cabo la reducción desasimilatoria del sulfato a mayores concentraciones de sal (Ollivier et al., 1991). El uso de arseniato y selenato como aceptores finales de electrones es menos común. En el lago hipersalino alcalino Searles Lake (California), donde la concentración de arsénico alcanza 3,9 mM, puede observarse un ciclo biogeoquímico del arsénico en el que los microorganismos halófilos quimioautótrofos oxidan el As (III) a As (V), mientras que el As (V) es reducido a As (III) en procesos de respiración anaeróbica (Oremland et al., 2005). *Halarsenatibacter silvermanii* (*Halanaerobiales*), con óptimo de pH y salinidad de 9,4 y 35 %, puede crecer de manera quimioautótrofa oxidando sulfuro con arseniato como aceptor de electrones. Este microorganismo puede también utilizar Fe (III) o azufre elemental en la respiración anaeróbica, y crecer heterotróficamente usando un amplio rango de aceptores de electrones orgánicos (Blum et al., 2009). Con respecto a uso del selenato en la respiración anaeróbica, *Selenihalanaerobacter shriftii*, otro miembro del orden *Halanaerobiales*, puede reducir este compuesto a una mezcla de Se (III) y Se (0) (Switzer Blum et al., 2001).

Se han detectado procesos fermentativos en todo el rango salino. Algunas especies del género *Halobacterium* (*Halobacteria*) pueden crecer anaeróticamente obteniendo energía a partir de la fermentación de la arginina, dando lugar a ornitina, amonio y dióxido de carbono (Oren, 2006b). Es probable que la haloarquea *Halorhabdus tiamatea*, aislada de una de las cuencas hipersalinas del fondo del mar Rojo, pueda también crecer a partir de procesos fermentativos (Antunes et al., 2008b). En el dominio *Bacteria*, la mayoría de los miembros del orden *Halanaerobiales*, que son halófilos anaerobios estrictos que crecen entre el 10 y 20 % de sal, obtienen energía para crecer a partir de la fermentación de azúcares simples. Otros halófilos fermentadores son *Clostridium halophilum* (*Firmicutes*) y *Haloplasma contractile* (*Haloplasmatales*) (Antunes et al., 2008a; Oren, 2011a).

La metanogénesis a partir de dióxido de carbono e hidrógeno (hidrogenotrófica) y a partir de acetato (acetoclástica) se ha demostrado a bajas concentraciones de sales como las encontradas en Mono Lake, California (~9 % de sales) (Oremland & King, 1989). El metanógeno más

halotolerante que utiliza dióxido de carbono e hidrógeno, *Methanocalculus halotolerans*, no crece por encima de un 12 % de sal (Ollivier et al., 1997). A altas concentraciones salinas, la metanogénesis es de tipo metilotrófica (a partir de compuestos C1/monocarbonados metilados), ocurre a partir de aminas metiladas como la trimetilamina, formadas a partir de osmoprotectores como la glicina betaína y, en ocasiones, también a partir de dimetilsulfuro (Oren, 2011a; Andrei et al., 2012). *Methanohalophilus evestigatum* y *M. portucalensis* (orden *Methanosarcinales*; *Archaea*) poseen este tipo de metabolismo y crecen hasta 24-25 % de sal (Zhilina & Zavarzin, 1987). El metano es únicamente uno de los productos principales de la degradación anaeróbica microbiana en ausencia de grandes cantidades de productos como sulfato, nitrato, Mn (IV) o Fe (III). La presencia de estas sustancias en el medio permite a otros tipos metabólicos superar a los metanógenos, principalmente por razones termodinámicas (Andrei et al., 2012).

Otro proceso anaeróbico que ocurre a altas salinidades es la producción de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono por medio de bacterias homoacetogénicas. *Acetohalobium arabaticum* (*Halanaerobiales*), capaz de este proceso, puede crecer hasta el 25 % de sales (Zavarzin et al., 1994).

A pesar de la gran diversidad filogenética de los microorganismos halófilos y los diversos mecanismos para obtener energía y carbono que utilizan, ciertos procesos metabólicos como la nitrificación, la metanogénesis a partir del hidrógeno y dióxido de carbono o a partir de acetato y la oxidación del metano no se han observado a concentraciones de sales superiores a 10-15 %. Se ha propuesto que no son factibles a estas salinidades, dado el coste energético de la vida en estas condiciones (Oren, 1999a; 2011a).

1.3.2.4 Mecanismos de osmoadaptación

Los microorganismos que viven en ambientes hipersalinos se encuentran expuestos, principalmente, a un alto potencial osmótico, cuya magnitud puede variar en el tiempo en función de las condiciones ambientales, por lo que han desarrollado mecanismos de osmoadaptación que les permiten resistir altas concentraciones de sales en su medio y adaptarse rápidamente a oscilaciones en ellas. Estos organismos mantienen su homeostasis modulando activamente la concentración intracelular de (i) iones o (ii) solutos orgánicos en función de la osmolaridad del medio externo; estrategias que se han denominado *salt-in* y *salt-out*, respectivamente (Galinski & Trüper, 1994).

La estrategia *salt-in* consiste en la modulación del contenido en sales inorgánicas del interior celular. Este mecanismo ha sido demostrado en varias especies modelo de la clase *Halobacteria* como *Halobacterium salinarum*, *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii*, *Haloferax mediterranei*, *Haloferax gibbonsii*, *Halorubrum saccharovororum* y *Halorubrum trapanicum* (Youssef et al., 2014). Además, la clase de arqueas metanógenas recientemente propuesta "*Methanonatronarchaea*", así como las bacterias pertenecientes al orden *Halanaerobiales*, al género *Salinibacter* y la especie *Halorhodospira halophila* utilizan esta misma estrategia (Raymond & Siström, 1969; Antón et al., 2002; Elevi Bardavid & Oren, 2012a; Deole et al., 2013;

Sorokin et al., 2017; Gunde-Cimerman et al., 2018). Al enfrentarse a incrementos en la concentración externa de sales, estos microorganismos aumentan el contenido en iones de su citoplasma. Acumulan mayoritariamente el catión K^+ , excluyendo el Na^+ , ya que resulta tóxico para la célula en grandes cantidades (Carden et al., 2003; Munns & Tester, 2008). El principal anión transportado al interior celular es el Cl^- . Mientras que en los procariotas no halófilos las concentraciones citosólicas de K^+ se estiman entre 300 y 500 mM, en microorganismos que viven en ambientes hipersalinos estas concentraciones puede ser superiores a 1 M (Epstein, 2003; Gunde-Cimerman et al., 2018). El contenido intracelular de Na^+ , por su parte, se reduce hasta a un tercio de la concentración externa (Gunde-Cimerman et al., 2018). El mantenimiento de este gradiente iónico requiere de mecanismos de transporte activo. La energía necesaria para estos procesos proviene del gradiente de protones generado por la cadena respiratoria o bien son llevados a cabo por unas proteínas que actúan como bomba de protones activadas por luz solar (bacteriorrodopsinas). Aunque la membrana es permeable al K^+ y, por lo tanto, estos iones pueden atravesar la membrana por transporte pasivo a través de canales a favor de gradiente eléctrico de membrana, se han detectado sistemas de transporte de K^+ dependientes de energía, que funcionan cuando las concentraciones externas de este catión son bajas. El sodio es extruido de las células mediante sistemas de antiporte Na^+/H^+ . El ion cloruro puede ser acumulado bien por cotransporte con Na^+ o mediante la proteína halorrodopsina, un canal de cloruros que emplea luz solar para importar este ion al interior celular (Gunde-Cimerman et al., 2018). Cuando los niveles de salinidad externa disminuyen, estos organismos expulsan las sales acumuladas.

Este mecanismo de osmoadaptación requiere la adecuación de la maquinaria enzimática y los componentes estructurales intracelulares para mantener su conformación y actividad en presencia de las altas concentraciones de iones que se acumulan en el citoplasma (Lanyi, 1974; Oren, 2008). Se ha encontrado que las proteínas de microorganismos halófilos con estrategia *salt-in* de los grupos *Halobacteria*, *Salinibacter* y *Halorhodospira* contienen una mayor proporción de aminoácidos cargados negativamente (aspartato, glutamato), así como de aminoácidos hidrofóbicos (fenilalanina, isoleucina, leucina), frente a los básicos lisina y arginina, y los menos hidrofóbicos glicina, alanina, serina y treonina (Kastiritis et al., 2007; DasSarma & DasSarma, 2015). Aunque la mayor proporción de residuos ácidos en la superficie de las proteínas ha sido sugerido como mecanismo para neutralizar la alta concentración de cargas positivas en el interior celular de estos organismos (Lanyi, 1974; Eisenberg & Wachtel, 1987; Danson & Hough, 1997; Vauclare et al., 2015), las bacterias del orden *Halanaerobiales* utilizan esta estrategia de osmoadaptación en ausencia de un proteoma ácido (Oren, 2013b; Gunde-Cimerman et al., 2018), por lo que los motivos del sesgo en el uso de aminoácidos no están claros. Por otro lado, las extensas modificaciones de las estructuras celulares de estos microorganismos para mantenerlas estables a altas concentraciones de sales podrían limitar el rango salino en el que pueden sobrevivir (Oren, 2008; Deole et al., 2013), confiriéndoles un carácter de halófilos obligados (Lanyi, 1974; Danson & Hough, 1997; Madern et al., 2000; Britton et al., 2006; Ortega et al., 2011). De hecho, la mayoría de los microorganismos con estrategia *salt-in* son halófilos extremos estrictos, esto es, crecen óptimamente en medios con salinidades superiores al 15 % y tienen limitada adaptabilidad a concentraciones salinas inferiores (Oren, 2008; 2011a; Gunde-Cimerman et al., 2018). La excepción es *Halorhodospira*

halophila, una proteobacteria fotosintética halófila extrema con proteoma ácido que puede vivir en medios ligeramente salinos, donde mantiene una cantidad intracelular de K⁺ baja, lo que parece indicar que su maquinaria celular se mantiene activa en ausencia de elevadas cantidades de cationes. Es más, un proteoma ácido no es exclusivo de los microorganismos con estrategia *salt-in*, sino que también se ha descrito, aunque en menor medida, en organismos halófilos que utilizan la estrategia de osmoadaptación *salt-out* (Elevi Bardavid & Oren, 2012b) e incluso en bacterias marinas (Oren, 2013b). Por todo ello, la relación del proteoma ácido con los mecanismos de osmoadaptación y el grado de halofilia debe ser revisado (Oren, 2013b; Czech & Bremer, 2018).

Por su parte, los microorganismos con estrategia *salt-out* responden a un incremento en la salinidad del medio externo acumulando unos compuestos orgánicos denominados solutos compatibles que aumentan el potencial osmótico intracelular sin interferir con la maquinaria celular. Estos organismos también acumulan iones K⁺ transitoriamente en etapas iniciales del proceso de osmoadaptación (Kempf & Bremer, 1998; Spanheimer & Müller, 2008; Czech & Bremer, 2018). Además, deben exportar iones Na⁺, que pueden entrar al interior celular por cotransporte con solutos compatibles, para mantener su citoplasma en condiciones de baja fuerza iónica (Czech & Bremer, 2018). Este mecanismo de osmoadaptación confiere gran versatilidad en cuanto al rango salino al que permite adaptarse y, a pesar de que probablemente supone un mayor coste energético que la estrategia *salt-in* (Oren, 1999b), es el más extendido en el árbol de la vida (Oren, 2008). Los microorganismos eucariotas halófilos y la mayoría de las bacterias utilizan esta estrategia, siendo el mecanismo de adaptación principal de microorganismos halófilos moderados y halotolerantes. La acumulación de estos osmolitos también se ha detectado en algunas arqueas.

Se conoce una amplia diversidad de solutos compatibles. Se trata de moléculas orgánicas de bajo peso molecular altamente solubles en agua cuyas propiedades fisicoquímicas las hacen compatibles con la bioquímica y fisiología celular (Wood, 2011). Son principalmente moléculas sin carga o zwitteriónicas. La mayoría están basados en aminoácidos o sus derivados, como la glicina betaína y la ectoína y su 5-hidroxi-derivado, azúcares simples como la sacarosa y la trehalosa, o alcoholes como el glicerol. Un mismo microorganismo puede acumular diferentes solutos compatibles y usar uno u otro dependiendo de las condiciones externas (Oren et al., 2009; Czech & Bremer, 2018). La acumulación de estos compuestos en función del grado de estrés osmótico al que se encuentra sometida la célula puede ser resultado de la síntesis *de novo* o bien del transporte desde el exterior por medio de proteínas específicas de alta afinidad (Nau-Wagner et al., 1999; Hoffmann et al., 2013). Cuando la salinidad del medio externo baja, estos osmolitos son catabolizados (usados como fuente de carbono y/o energía) o transportados al exterior (Czech & Bremer, 2018; Czech et al., 2018).

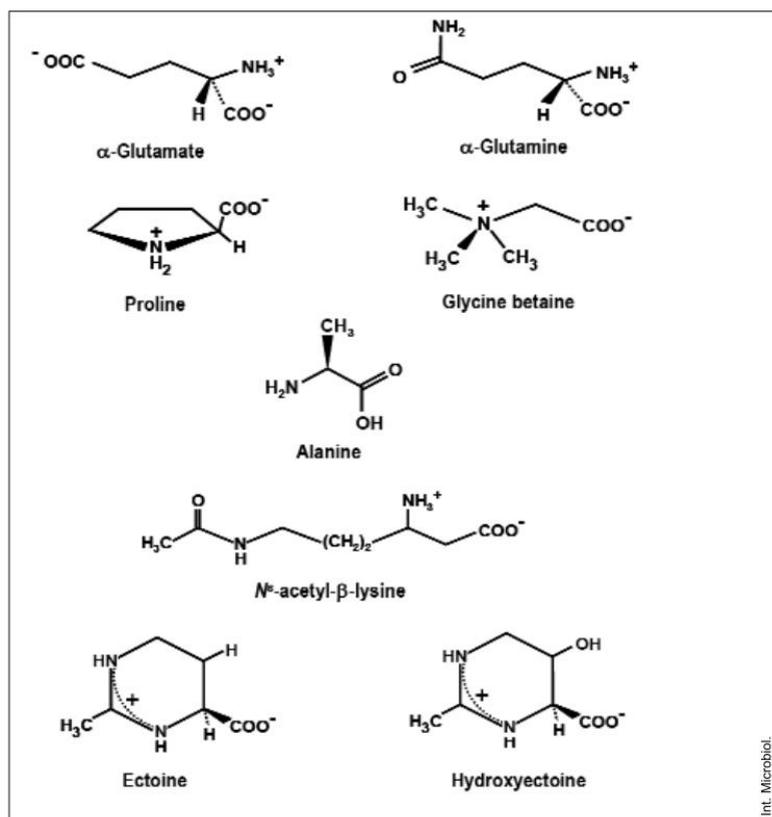


Figura 9. Estructura de algunos solutos compatibles utilizados por microorganismos halófilos para balancear su equilibrio osmótico (Empadinhas & da Costa, 2008).

El glicerol y otros polioles son principalmente utilizados por protistas, algas y hongos (Gunde-Cimerman et al., 2018). Los solutos compatibles más ampliamente utilizados en el dominio *Bacteria* son la ectoína, que es sintetizada por un gran número de bacterias, y la glicina betaína, que, aunque es sintetizada casi exclusivamente por bacterias fotosintéticas, es transportada desde el medio externo por muchos organismos heterótrofos. También se han detectado solutos compatibles en el dominio *Archaea*. Los halófilos metanógenos como las especies de *Methanohalophilus* contienen, además de glicina betaína, osmolitos raramente empleados por otros grupos de procariontes como la β-glutamina, el β-glutamato, y la N-acetil-β-lisina (Oren, 2008). Aunque la clase *Halobacteria* ha sido considerada tradicionalmente como un grupo coherente de halófilos extremos con estrategia *salt-in* como mecanismo de osmoadaptación, se ha descrito la acumulación de solutos compatibles en diversas haloarqueas (Desmarais et al., 1997; Goh et al., 2011; Youssef et al., 2014). Mientras que la sulfotrehalosa se acumula en cantidades considerables (hasta 1 M), junto al KCl, a medida que aumenta la salinidad externa en miembros alcalófilos de la clase *Halobacteria* (*Natronococcus occultus*, *Natronobacterium gregoryi*, *Natrialba magadii*, y *Natronomonas pharaonis*) (Desmarais et al., 1997; Oren, 2008; Gunde-Cimerman et al., 2018), Goh y colaboradores demostraron que la haloarquea *Halococcus hamelinensis*, aislada de estromatolitos, no acumula K⁺ en respuesta a incrementos de salinidad en su medio externo, sino que transporta al interior celular solutos compatibles como la glicina betaína (Goh et al., 2011). Por su parte, Youssef y colaboradores mostraron que *Haladaptatus*

paucihalophilus, que puede crecer hasta en concentraciones de sal tan bajas como 0,5 M (Savage et al., 2007), sintetizaba trehalosa y transportaba glicina betaína del exterior al ser sometido a un choque hiperosmótico (Youssef et al., 2014). Otras haloarqueas han sido detectadas y/o aisladas de ambientes con concentraciones bajas o variables de sales (Rodríguez-Valera et al., 1979; Ventosa et al., 1984; Munson et al., 1997; Bowman et al., 2000; Takai et al., 2001; Elshahed et al., 2004; Purdy et al., 2004; Perreault et al., 2007; Ellis et al., 2008; Inoue et al., 2011; Youssef et al., 2012; Mani et al., 2012; Xiao et al., 2013), donde no parece factible que su mecanismo de osmoadaptación dependa, al menos únicamente, de la estrategia *salt-in* (Youssef et al., 2014). Es más, el potencial para la síntesis de trehalosa y el transporte de glicina betaína, ectoína y prolina en representantes de la clase *Halobacteria* ha sido demostrado por varios autores (Becker et al., 2014; Youssef et al., 2014). Sin embargo, la capacidad de transporte de solutos compatibles al interior celular no implica el uso de la estrategia *salt-out* de osmoadaptación, ya que estos compuestos también pueden ser utilizados como fuente de carbono (Orellana et al., 2013) y nitrógeno o como termoprotectores (Holtmann & Bremer, 2004; Tschapek et al., 2011).

También se han descrito microorganismos capaces de utilizar estrategias híbridas de osmoadaptación. *Halobacillus halophilus* (*Firmicutes*), aislado a partir de suelos de unas marismas situadas en la costa alemana del Mar del Norte, es un halófilo débil que crece óptimamente en presencia de 3-5 % de NaCl y 0,5 % MgCl₂ (Claus et al., 1983) que combina la acumulación de solutos compatibles como glutamato, glutamina, prolina y ectoína (en función de la salinidad externa y la fase de crecimiento) con concentraciones molares de iones Cl⁻, que además son esenciales para ciertas funciones vitales y estimulan la síntesis de ectoína (Roeßler & Müller, 1998; Saum & Müller, 2008a; 2008b; Gunde-Cimerman et al., 2018).

La composición de la membrana lipídica también varía en respuesta a un incremento de salinidad del medio externo. En bacterias halófilas y halotolerantes, se produce principalmente un incremento de la cantidad de lípidos aniónicos, como fosfatidilglicerol y/o cardiolipinas en detrimento de aquellos neutros como la fosfatidiletanolamina (Russell & Kogut, 1985; Russell, 1989; Sutton et al., 1991; Gunde-Cimerman et al., 2018). Los estudios dedicados a caracterizar el cambio en la envoltura celular de haloarqueas con la salinidad son menos numerosos. Se ha descrito que, cuando esas células se someten a un choque hiposmótico, aumenta la proporción de cardiolipinas a expensas de fosfatidilglicerol, se observa una disminución del contenido en los ésteres de metilo de fosfatidilglicerol fosfato y un incremento del contenido en lípidos C25,C20 en detrimento de los C20, C20 (Gunde-Cimerman et al., 2018).

1.3.2.5 Interés biotecnológico

Algunos de los procesos en los que intervienen microorganismos halófilos se conocen desde la antigüedad. La obtención de sal común en sistemas de salinas solares es uno de ellos. Los microorganismos halófilos que se encuentran en estanques cristalizadores contribuyen al aumento de la temperatura del agua por medio de sus pigmentos carotenoides, que absorben energía solar y, por lo tanto, contribuyen al proceso de evaporación del agua y consecuentemente, a la precipitación de la sal. La producción de alimentos fermentados, como las salsas de pescado o de soja típicas de países asiáticos como la salsa de pescado o la de soja,

así como de productos característicos españoles como las aceitunas de mesa dependen también de la actividad de un consorcio de microorganismos halófilos y halotolerantes (Sinsuwan et al., 2008; Oren, 2010; Abriouel et al., 2011; Lucena-Padrós & Ruiz-Barba, 2016; Medina et al., 2016).

Recientemente, se ha revisado el gran potencial biotecnológico de los microorganismos halófilos (Oren, 2010; Amoozegar et al., 2017). Por un lado, la halotolerancia de enzimas derivadas de estos organismos puede ser explotada en transformaciones enzimáticas en condiciones de baja actividad de agua. Por otro, algunos solutos compatibles producidos por los microorganismos halófilos han resultado tener aplicaciones interesantes. Además, algunos microorganismos halófilos pueden producir compuestos de alto valor añadido que también son producidos por organismos no halófilos, pero la producción por parte de los primeros tiene ventajas desde el punto de vista biotecnológico (Oren, 2002).

Se ha caracterizado una gran diversidad de enzimas de bacterias y arqueas halófilas, incluyendo amilasas, proteasas, lipasas y nucleasas con aplicaciones potencialmente interesantes (Oren, 2002). A pesar de la resistencia de las proteínas halotolerantes a diversas condiciones extremas, como es el caso de la amilasa de *Haloarcula* sp., que funciona óptimamente en condiciones de alta salinidad, temperatura y presencia de compuestos aromáticos como benceno, tolueno y cloroformo (Fukushima et al., 2005), su uso en procesos industriales aún no se ha desarrollado por completo y es muy limitado. Una de las enzimas halófilas utilizadas en procesos industriales actualmente es la nucleasa H producida por *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*, que se emplea en la producción del ácido guanílico, un aditivo alimentario (Kamekura et al., 1982).

La producción de β -caroteno, usado como antioxidante, fuente de provitamina A (retinol) y colorante alimentario, y de ectoína, como estabilizador de enzimas y en productos cosméticos (Graf et al., 2008), a partir de microorganismos halófilos son utilizados en la industria actualmente (Ma'Or et al., 2000; Oren, 2002; Amoozegar et al., 2017; Czech et al., 2018). Mientras que *Dunaliella salina* es la mejor fuente natural de β -caroteno (Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009), la ectoína se obtiene a partir de las bacterias halófilas moderadas *Halomonas elongata* y *Marinococcus* (Oren, 2002). Otras aplicaciones de la ectoína están siendo investigadas. Se ha propuesto que este compuesto contrarresta el efecto de la radiación ultravioleta sobre la piel (Buenger & Driller, 2004), que inhibe la agregación y neurotoxicidad de las placas β -amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Kanapathipillai et al., 2005) y es probablemente beneficioso en patologías por mal plegamiento de proteínas (Furusko et al., 2005), y que podría mejorar la eficiencia de procesos de biología molecular como PCRs y *microarrays* de ADN (Mascellani et al., 2007). Además, se han realizado ensayos clínicos para el tratamiento de la dermatitis atópica leve o moderada con ectoína (Marini et al., 2014).

Los microorganismos halófilos producen polímeros de interés económico, como los exopolisacáridos y los poli- β -hidroxialcanoatos. Los exopolisacáridos se utilizan como agentes gelificantes o emulsionantes. Dado que varios microorganismos halófilos como *Haloferax mediterranei*, varias especies de *Halomonas* y la cianobacteria *Aphanothece halopytica*

producen estos compuestos en grandes cantidades, se ha considerado su explotación comercial (Béjar et al., 1998; Arias et al., 2003; Llamas et al., 2006; Oren, 2010). Actualmente, la empresa LIPOTEC utiliza exopolisacáridos producidos por bacterias halófilas moderadas para desarrollar productos cosméticos (comunicación en la XI reunión de la Red de Microorganismos Extremófilos). Algunos de los exopolisacáridos compuestos producidos por microorganismos halófilos han demostrado propiedades inmunomoduladoras (Zheng et al., 2006). Los poli- β -hidroxialcanoatos son polímeros que se emplean en la síntesis de plásticos biodegradables. Algunas bacterias y arqueas halófilas, como *Halomonas boliviensis* y *Haloferax*, han demostrado ser excelentes productores de dichos bioplásticos (Fernandez-Castillo et al., 1986; Lillo & Rodriguez-Valera, 1990; Lu et al., 2008; Quillaguamán et al., 2010), pero este proceso aún no se utiliza industrialmente (Ma et al., 2010; Oren, 2010).

Otras potenciales aplicaciones de los microorganismos halófilos, sus procesos o componentes celulares, incluyen el tratamiento biológico de aguas salinas residuales, su uso en procesos de biorremediación, como fuente de nuevos antibióticos y otros metabolitos secundarios, la producción de biofuel y la aplicación de sus bacteriorrodopsinas en optoelectrónica (Ma et al., 2010; Oren, 2010).

1.3.2.6 Ecología y diversidad

1.3.2.6.1 Diversidad en ambientes hipersalinos acuáticos

Una gran diversidad de ambientes hipersalinos han sido estudiados desde el punto de vista microbiológico utilizando las técnicas disponibles en cada momento. Las recientes técnicas de secuenciación de alto rendimiento han permitido ampliar enormemente el conocimiento sobre estos ambientes y sus habitantes (Oren, 2015a; Ventosa et al., 2015). Las salinas solares y el Mar Muerto constituyen tal vez los sistemas salinos que más atención han recibido, aunque actualmente se ha caracterizado la microbiota de una amplia variedad de otros ambientes salinos.

En el Mar Muerto, donde la salinidad actual se sitúa en el ~ 35 % con predominancia de iones divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} (Jacob et al., 2017), las condiciones son muy extremas como para permitir la existencia de una gran diversidad microbiana. Allí, la actividad celular es limitada y los recuentos celulares indican que existen unas 5×10^5 células por mililitro, correspondiendo la mayoría de ellas, además, a miembros no cultivados de haloarqueas (Bodaker et al., 2010; Rhodes et al., 2012; Jacob et al., 2017). Tan solo cuando la salinidad disminuye como consecuencia de abundantes precipitaciones se observa una proliferación del alga *Dunaliella* y diferentes representantes de la clase *Halobacteria* (principalmente *Natronococcus* y *Halosarcina*). *Halorhabdus*, *Natronomonas* y *Haloplanus* son los géneros de arqueas conocidos más representados en las aguas de este lago salino en la actualidad. Aunque Rhodes y colaboradores encontraron que la población bacteriana constituía menos del 0,5 % de la comunidad residual en septiembre de 1992 y marzo de 2007 (Rhodes et al., 2012); los estudios de Jacob y colaboradores muestran que, en junio de 2015, el 45 % de las secuencias recuperadas se afiliaban al dominio *Bacteria*, agrupándose mayoritariamente con aquellas de los géneros *Acinetobacter* (*Proteobacteria*) y *Bacillus* (*Firmicutes*) (Jacob et al., 2017). La programada

construcción de un canal que conecte el Mar Rojo con el Mar Muerto con el fin de que el segundo no desaparezca propiciará cambios en la comunidad microbiana (Oren et al., 2004a).

También se conoce la comunidad procariota de los dos brazos del Gran Lago Salado (Utah, EE. UU.). En la zona norte, donde la salinidad alcanza el 30 % p/v, todas las secuencias de arqueas obtenidas en el estudio de Tazi y colaboradores correspondían al phylum *Euryarchaeota*, siendo los géneros principalmente representados *Natronomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Haloquadratum*, *Haloferax*, *Halogeometricum* y *Haloarcula*. La comunidad microbiana estaba constituida mayoritariamente por proteobacterias relacionadas con los géneros *Shewanella*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* y *Marinobacter* (Tazi et al., 2014). La comunidad de productores primarios está constituida por cianobacterias en las áreas de menos salinidad y por *Dunaliella* spp. en las de concentraciones salinas superiores (Larson & Belovsky, 2013).

Makhdoumi-Kakhki y colaboradores, en su estudio de la comunidad microbiana del lago Aran-Bidgol, situado en Irán, encontraron que, mientras que los aislados obtenidos de este ambiente podían afiliarse principalmente a los géneros *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Salinibacter*, *Salicola* y *Rhodovibrio*, el 63 % de los clones secuenciados de este sistema no estaban relacionados con ningún taxón descrito. *Halorhabdus* y *Salinibacter* eran los géneros conocidos más representados por estos clones ambientales. También han sido detectadas en este hábitat secuencias relacionadas con los géneros *Haloquadratum*, *Halanaerobium*, *Haloarcula*, *Halorhodopsina*, así como de cianobacterias (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012a).

Los estudios metagenómicos llevados a cabo en el lago Tyrrell (Australia), sistema que sufre grandes cambios estacionales de temperatura, pH, radiación solar, concentración de oxígeno y salinidad (Macumber, 1992; Williams, 2001), permitieron la caracterización de un nuevo grupo taxonómico no cultivado: las nanohaloarqueas. (Narasingarao et al., 2012). En este sistema también se encuentran presentes miembros de los géneros *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Halonotius*, *Halorhabdus*, *Halobaculum*, *Haloarcula* (*Euryarchaeota*) y *Salinibacter* (*Rhodothermaeota*) (Narasingarao et al., 2012; Emerson et al., 2013; Podell et al., 2013; 2014). La proporción de estos grupos varía estacionalmente, y se ha relacionado con el cambio en las concentraciones iónicas: en verano abundan los géneros de bajo G+C *Haloquadratum* y *Nanohaloarchaeota* mientras que en invierno son los miembros de *Halorubrum* y *Haloarcula* los predominantes (Emerson et al., 2013; Podell et al., 2014).

También han sido objeto de estudios independientes de cultivo diversos lagos hipersalinos localizados en varias regiones de la Antártida: Ekho Lake (Bowman et al., 2000), Organic Lake (Bowman et al., 2000; Yau et al., 2011; 2013) y Deep Lake (Bowman et al., 2000; DeMaere et al., 2013; Williams et al., 2014; Tschitschko et al., 2016) en Vestfold Hills; Lake Bonney (Glatz et al., 2006) y Lake Vida (Mosier et al., 2007; Murray et al., 2012) en McMurdo Dry Valleys; Lake Suribati Ike (Naganuma et al., 2005; Matsuzaki et al., 2006), en Droning Maud Coast; Don Juan Pond (Siegel et al., 1979; Dickson et al., 2013) y Lake Vanda (Sumner et al., 2016), en Wright Valley. Aunque por lo general, la sal principal de estos lagos hipersalinos de la Antártida es el

NaCl (observándose hasta 35 %, en el caso de Organic Lake), los dos últimos están dominados por CaCl₂.

Otros lagos hipersalinos cuya comunidad procariota ha sido caracterizada recientemente por métodos moleculares comprenden algunos de Mongolia interior (Grant et al., 2011), el lago Ursu (Máthé et al., 2014) y Ocnei (Baricz et al., 2014a), en Rumanía, Salton Sea (CA, EE. UU.) (Hawley et al., 2014), el alcalino Lonar (Paul et al., 2016), los lagos Magadi (Kenia) (Kambura 2016) y los de la región de Kulunda Steppe (Altai, Rusia) (Vavourakis et al., 2016), así como el Hot Lake (Washington, EE. UU.), que está dominado por MgSO₄ (Lindemann et al., 2013; Kilmer et al., 2014).

Las cuencas hipersalinas descubiertas en los fondos marinos del Golfo de México, el Mar Rojo y el mar Mediterráneo constituyen ambientes salinos sujetos a condiciones reductoras, ausencia de oxígeno y luz y altas presiones (Mapelli et al., 2012). El agua hipersalina de estos sistemas no se mezcla con el agua del mar dadas las diferencias de salinidad y temperatura, sino que se observan quimioclinas de varios metros de espesor, donde las propiedades fisicoquímicas varían en el espacio drásticamente (Mapelli et al., 2012). A pesar de sus condiciones extremas, estos ambientes sustentan una diversa y activa comunidad procariota (Danovaro et al., 2005; Van Der Wielen et al., 2005; Daffonchio et al., 2006; Van Der Wielen & Heijs, 2007; Alexander et al., 2009; Borin et al., 2009; Edgcomb et al., 2009; La Cono et al., 2011; Ferrer et al., 2012; Stock et al., 2012), que contiene un gran número de representantes de taxones no cultivados como aquellos de la división MSBL1, que son las arqueas predominantes en la mayoría de las cuencas estudiadas (Ferrer et al., 2012; Oren, 2015a; Ventosa et al., 2015).

Los sistemas de salinas solares constituyen otro de los ambientes hipersalinos más ampliamente estudiados. Las salinas de estanque múltiple son excelentes modelos para el estudio de la biodiversidad y ecología de microorganismos a diferentes concentraciones de sales, ya que constan de estanques de diferentes concentraciones, desde aquellos con menor salinidad (concentradores) a los estanques donde precipita la sal por evaporación del agua del mar (cristalizadores). Se ha caracterizado la comunidad microbiana de un gran número de sistemas de salinas solares alrededor del planeta (Benlloch et al., 1996; 2001; Sandaa et al., 2003; Pašić et al., 2005; Pedrós-Alió, 2005; Baati et al., 2008; Oh et al., 2010; Ghai et al., 2011; Dillon et al., 2013; Plominsky et al., 2014; Fernández et al., 2014c; Ballav et al., 2015; Ventosa et al., 2015; Gomariz et al., 2015; Mora-Ruiz et al., 2018). La mayoría de los estudios de la microbiota de estos ambientes se ha realizado en los estanques cristalizadores (Antón et al., 1999; 2000; Benlloch et al., 2001; Legault et al., 2006; Oh et al., 2010), aunque en los últimos años también se han investigado estanques de salinidades intermedias (Ghai et al., 2011; Boujelben et al., 2012a; Fernández et al., 2014a; 2014c).

Quizás las salinas solares “Bras del Port”, en Santa Pola (Alicante), sean las mejor conocidas desde el punto de vista microbiológico (Ventosa et al., 2014). Se trata de un sistema de estanque múltiple, donde la concentración de sales de los distintos estanques se mantiene muy constante a lo largo del tiempo. Los numerosos estudios dependientes de cultivo llevados a cabo en esta salina han permitido la caracterización de un número elevado de géneros y arqueas y bacterias

halófilas (Ventosa et al., 2014), entre los que destacan la arquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* (Bolhuis et al., 2006; Burns et al., 2007) y la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Antón et al., 2002). Las técnicas moleculares de PCR, DGGE y FISH permitieron caracterizar la comunidad microbiana *in situ*. Estos estudios mostraron que la diversidad microbiana en los estanques cristalizadores era limitada y que la mayor parte de la comunidad estaba formada por arqueas de la clase *Halobacteria* como *Haloquadratum walsbyi* (Benlloch et al., 1996; 2001; Anton et al., 1999; Antón et al., 2000). Los miembros de esta comunidad frecuentemente aislados en el laboratorio, representaban una proporción muy pequeña de los organismos allí presentes (Anton et al., 1999). Estudios posteriores de la comunidad microbiana de estanques de salinidades intermedias mediante estas técnicas mostraron que ésta estaba dominada por representantes de la clase *Gammaproteobacteria*, del phylum *Bacteroidetes* y de la familia *Halobacteriaceae*, además de existir un grupo de secuencias no relacionadas con ningún microorganismo cultivado (Benlloch et al., 2002; Casamayor et al., 2002).

La aplicación de las técnicas metagenómicas al estudio de las comunidades microbianas de los estanques de estas salinas supuso el análisis de su microbiota con una mayor profundidad y la corroboración de estudios anteriores. La población microbiana de un estanque cristalizador con un 37 % de sales (SS37) estaba dominada por *Haloquadratum* (79 %) y *Salinibacter* (9 %) (Ghai et al., 2011). Diferentes miembros de la clase *Halobacteria*, como *Halorubrum*, *Halorhabdus*, *Haloferax*, *Halosimplex* y *Halobacterium*, eran también componentes minoritarios de la misma (Ghai et al., 2011). El análisis de las bases de datos metagenómicas de estanques concentradores de salinidades 13, 19 y 33 % mostró que la diversidad taxonómica en ellos era mucho mayor que la detectada en el cristalizador de esta misma salina. En los estanques con 13 y 19 % de salinidad podían encontrarse representantes de 7 phyla distintos (*Euryarchaeota*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y *Betaproteobacteria*). La proporción de *Haloquadratum* y *Salinibacter*, aunque presentes en todas las bases de datos analizadas, aumentaba en los estanques de mayor salinidad (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a). Cabe destacar que la porción de secuencias relacionadas con el gen ARNr 16S que no pudieron relacionarse con microorganismos descritos a nivel de género aumentaba al disminuir la salinidad, como consecuencia de los abundantes estudios realizados previamente en los estanques de mayor salinidad. Los géneros *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natrialba* y *Halobacterium*, que se aíslan con facilidad de estanques con salinidades intermedias (Arahal et al., 2001a; 2001b; Arenas et al., 2009) no parecían constituir una parte importante de la comunidad. Estos estudios revelaron la presencia de nuevos y abundantes grupos de microorganismos no relacionados con otros cultivados: un grupo perteneciente a la clase *Actinobacteria* con bajo contenido en G+C, una *Gammaproteobacteria* relacionada con los géneros *Alkalilimnicola* y *Nitrococcus* y dos grupos de euriarqueas, uno de alto contenido en G+C y otro de bajo contenido en G+C, correspondiente al phylum candidato "*Nanohaloarchaeota*" (Ghai et al., 2011). Intensos esfuerzos encaminados hacia la recuperación de estos grupos en cultivo puro dieron lugar al aislamiento del nuevo género *Spiribacter*, que correspondía con las secuencias de gammaproteobacteria, y que constituye una parte importante de la comunidad en los estanques de salinidad intermedia (López-Pérez et al., 2013; León et al., 2014).

Las técnicas metagenómicas también han sido aplicadas a un estanque de concentración de sales del 21 % p/v de una salina de Isla Cristina, en Huelva. Este sistema de salinas solares de Isla Cristina fue construido en 1955 sobre las marismas del río Carreras (León, 2015). Aunque han sido objeto de un menor número de estudios, a partir de esta salina se han aislado diversas especies de bacterias y arqueas halófilas (Mota et al., 1997; Moreno et al., 2010; León et al., 2014; 2015; 2016; 2017; López-Hermoso et al., 2017b). El estudio metagenómico llevado a cabo en esta salina mostró que la comunidad de la columna de agua del estanque estudiado (21 % NaCl) difería de la encontrada en el estanque de la salina “Bras del Port” de Santa Pola con salinidad cercana (19 % NaCl). Ésta estaba dominada, al igual que el estanque con salinidad del 33 % de “Bras del Port”, por miembros del phylum *Euryarchaeota*, pero el género predominante era *Halorubrum*. El principal phylum bacteriano hallado fue *Bacteroidetes*, que comprendía un 33 % de la población y estaba representando principalmente por los géneros *Salinibacter* y *Psychroflexus* (Fernández et al., 2014c). Estos resultados mostraron que, a pesar del papel esencial de la salinidad en la estructuración de la comunidad procariota (Lozupone & Knight, 2007), estanques de salinidades muy cercanas albergaban comunidades diferentes, lo que sugiere que otros factores adicionales influyen en dicha estructuración.

1.3.2.6.2 Diversidad procariota en suelos y sedimentos salinos

Una gran parte de la literatura referente a la comunidad microbiana de ambientes terrestres considera sedimentos de masas de aguas salinas o hipersalinas. Otros, combinan muestras de suelo y sedimentos, mientras que los menos comunes son los dedicados únicamente a la caracterización de las comunidades microbianas de suelos salinos. Estos ambientes hipersalinos terrestres han recibido menor atención que los acuáticos, y la mayoría de los estudios existentes han aparecido en el último año (Xie et al., 2017; Liu et al., 2018; Mora-Ruiz et al., 2018; Narayan et al., 2018; Yang et al., 2018; Zhao et al., 2018). Con frecuencia, en ellos la comunidad de bacterias y arqueas es tratada de manera independiente.

En los estudios pioneros de Quesada y colaboradores se utilizan técnicas de cultivo para caracterizar la diversidad procariota de un suelo hipersalino (5-10,7 % NaCl) localizado en un sistema de salinas solares abandonadas de la costa alicantina (Quesada et al., 1982; 1983). La mayoría de los microorganismos aislados fueron bacterias halófilas cuyo crecimiento ocurría óptimamente en salinidades comprendidas entre el 5 y 15 %, mientras que tan solo un 1 % de los aislados poseían características de halófilos extremos. Además, la mayor parte de estos aislados podían crecer a concentraciones de sal tan bajas como 0,9 %. Se trataba principalmente de proteobacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio* (actualmente *Salinivibrio*), *Acinetobacter*, así como de *Flavobacterium* (*Bacteroidetes*), *Bacillus*, *Marinococcus*, *Staphylococcus* (*Firmicutes*) y actinobacterias como *Micrococcus* (actual *Nesterenkonia*), *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia* y *Actinomyces*. Cabe destacar que la mayoría de los aislados asignados en este estudio a los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* se encuadrarían probablemente en el género *Halomonas* en la actualidad (Ventosa et al., 2008). Las arqueas halófilas extremas aisladas de este suelo fueron estaban relacionadas con el género *Halobacterium*. Los autores propusieron que el marcado carácter heterogéneo y dinámico del suelo, donde la salinidad varía en tiempo y espacio,

favorecía el desarrollo principal de microorganismos halófilos capaces de soportar amplios rangos salinos (esto es, más eurihalinos), en contra de los excesivamente especializados (Quesada et al., 1982; Ventosa et al., 2008).

Investigaciones posteriores corroboraron que las bacterias Gram negativas con características de halófilos moderados y halotolerantes extremos de los géneros *Planococcus* (*Marinococcus*), *Sporosarcina* (*Halobacillus*) y *Bacillus*, se aislaban abundantemente de diversos suelos y sedimentos salinos (Miller et al., 1983; Ventosa et al., 1983; Miller & Leschine, 1984; Nicolaus et al., 1992; Garabito et al., 1998). Caton y colaboradores (2004) describieron la comunidad de bacterias aerobias heterótrofas de suelos de Great Salt Plains (Oklahoma, EE. UU.), donde la salinidad del suelo variaba de 0,3 a 27 % y el pH de 7,34 a 9,23. En estos suelos predominaban las gammaproteobacterias como *Halomonas* y los microorganismos Gram positivos de bajo G+C del género *Bacillus* (Caton et al., 2004). Estos autores también destacan el amplio rango de tolerancia a la sal de los aislados obtenidos, que podían crecer de 0,1 a 20 % de salinidad, así como su resistencia a otros factores como pH y alta radiación UV (Caton et al., 2004; Litzner et al., 2006). *Bacillus* y *Halomonas* fueron también los géneros más frecuentemente aislados en los estudios de suelos salinos alcalinos (3 dS/m y pH 10,45) de la provincia china de Heilongjiang. Entre los aislados se detectan tanto halófilos estrictos como halotolerantes (Shi et al., 2012). El estudio de la comunidad bacteriana de los suelos y sedimentos acuosos salinos de Rambla Salada (Murcia) (1,2-8,3 % NaCl) revelaron que los grupos mayoritarios cultivables eran *Proteobacteria* (principalmente *Gammaproteobacteria*), seguido de *Firmicutes*, *Actinobacteria*, y *Bacteroidetes*. Los géneros más aislados fueron *Halomonas* (41,2 %), *Marinobacter* (12,9 %) y *Bacillus* (12,6 %). En este análisis, Luque y colaboradores obtuvieron en cultivo puro aislados cuyas secuencias del gen ARNr 16S tenían una semejanza inferior al 97 % a las de los representantes disponibles en las bases de datos (Luque et al., 2012a). Schneegurt y colaboradores, en su estudio de la halotolerancia de la comunidad bacteriana de suelos salinos de Great Salt Plains (Oklahoma, EE. UU.) (0-7,5 % de salinidad) describieron una menor proporción de aislados capaces de crecer a 20-30 % de salinidad que a concentraciones más bajas, encontrando, además, que los obtenidos de suelos más salinos presentaban un mayor carácter eurihalino (Schneegurt, 2013). En los estudios de la microbiota presente en suelos costeros de varias regiones de Korea, los organismos obtenidos en cultivo puro también eran mayoritariamente halófilos débiles (con una concentración óptima de crecimiento de 3-5 % NaCl) pertenecientes a *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*, con *Bacillus*, *Halomonas* y *Shewanella* como géneros mayoritarios (Irshad et al., 2014).

La diversidad de arqueas en ambientes terrestres hipersalinos también ha sido caracterizada. Los estudios clásicos basados en técnicas de cultivo de Great Salt Plains revelaron que los aislados estaban principalmente relacionados con los géneros *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* y *Natrinema* (Caton et al., 2009). Todos ellos requerían una concentración mínima de NaCl del 15 % para crecer. En contra del carácter estenohalino de los microorganismos del estudio de Caton y colaboradores, otras arqueas aisladas de sedimentos de marismas del Reino Unido con una concentración salina similar a la del mar mostraron un comportamiento con respecto a la sal similar al observado en el dominio *Bacteria* en los estudios antes citados, pudiendo crecer lentamente incluso a una concentración de sales del

2,5 % (Purdy et al., 2004). La relación de las bacterias y arqueas halófilas aisladas de suelos puede consultarse en una revisión realizada por Ventosa y colaboradores (2008).

Los avances en las técnicas de estudio de las comunidades microbianas han permitido obtener una visión más completa y detallada de los microorganismos de este tipo de suelos y su diversidad. Los estudios independientes de cultivo mostraron que el ADN presente en suelos y sedimentos salinos pertenecía a una amplia diversidad de organismos. Los suelos y sedimentos se encuentran entre los ambientes con mayor diversidad microbiana, y se estima que contienen al menos un orden de magnitud más que los sistemas acuáticos (Curtis et al., 2002; Torsvik et al., 2002), probablemente debido a la alta heterogeneidad espacial y temporal de los ambientes terrestres (Walsh et al., 2005; Carson et al., 2010; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013). Además, este tipo de estudios ha permitido determinar la abundancia en condiciones ambientales de los principales grupos de aislados descritos con anterioridad, y correlacionarla con las propiedades fisicoquímicas encontradas en los diferentes ambientes.

Los grupos bacterianos principalmente detectados mediante estas técnicas incluyen los identificados por estudios clásicos de cultivo (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) además de *Cyanobacteria* (Lay et al., 2013; Pandit et al., 2015; Mora-Ruiz et al., 2018) y *Acidobacteria* (Valenzuela-Encinas et al., 2009; Canfora et al., 2014) en varios casos. *Verrucomicrobia*, y *Gemmatimonadetes* mostraron ser abundantes en los estudios de Canfora y colaboradores (2014) y Xie y colaboradores (2017), respectivamente. La mayor profundidad de análisis de la comunidad microbiana que poseen los estudios independientes de cultivo y en particular los que aplican secuenciación masiva, permitió mostrar la gran diversidad microbiana presente en suelos y sedimentos salinos. Mientras que tan solo se han descrito especies de bacterias halófilas pertenecientes a 9 phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes* y *Verrucomicrobia*) (de la Haba et al., 2011), las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas de suelos salinos en las bases de datos públicas en 2013 podían afiliarse a 24 phyla distintos (Ma & Gong, 2013). En el estudio de Liu y colaboradores (2018) se detectaron 74 phyla diferentes en los suelos salinos estudiados. Aunque los grupos antes citados engloban la mayor parte de los microorganismos detectados en estos ambientes hipersalinos, también se observan de manera persistente una serie de phyla minoritarios entre los que se encuentran *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Spirochaeta* y *Deinococcus* (Valenzuela-Encinas et al., 2009; Swan et al., 2010; Xiong et al., 2012; Pandit et al., 2015; Yang et al., 2016; Xie et al., 2017; Liu et al., 2018; Zhao et al., 2018). Mora-Ruiz y colaboradores (2018) detectaron "*Nanohaloarchaeota*" en sedimentos salinos. Otros taxones identificados con menos frecuencia en ambientes terrestres salinos son *Chlorobi*, *BRC1*, *Deferribacteres*, *Nitrospira*, *Tenericutes*, *WS3*, *Thermi*, *Chlamydiae*, *Thermogotae*, SR1, OP11, *Chrysiogenetes*, *Candidatus* "Parcubacteria" y *Candidatus* "Saccharibacteria" (Mesbah et al., 2007; Hollister et al., 2010a; Xiong et al., 2012; Canfora et al., 2014; Pandit et al., 2015; Yang et al., 2016; Liu et al., 2018; Mora-Ruiz et al., 2018).

A nivel de género, Oueriaghli y colaboradores (2014) estudiaron la diversidad y abundancia del género *Halomonas* en suelos y sedimentos salinos de Rambla Salada (Murcia), donde encontraron que constituía entre un 4,4-5,7 % de la comunidad microbiana, sin grandes

diferencias entre los dos tipos de muestras. En el metagenoma de un suelo salino de la India (Little Rann of Kutch), la mayoría de las secuencias de bacterias pertenecían al género *Marinobacter* (48 %), constituyendo más del 1 % de la población bacteriana también los géneros *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Shewanella* y *Pseudomonas*. Además, una gran proporción de secuencias afiliadas a este dominio no pudieron ser clasificadas a nivel de género en este estudio (Patel et al., 2015). Las investigaciones de Pandit y colaboradores (2015) sobre las comunidades microbianas del desierto del Kutch (Great Rann of Kutch) revelaron que los géneros *Marinobacter* (*Gammaproteobacteria*) *Roseibacter* (*Alphaproteobacteria*), *Burkholderia* (*Betaproteobacteria*), *Geobacter* y *Desulfobacteria* (*Deltaproteobacteria*) eran abundantes en todos los suelos estudiados. *Salinibacter* y *Rhodothermus* eran los géneros dominantes del phylum *Bacteroidetes*, constituyendo un 0,7-13,8 % y 0,7-1,7 % de la población total, respectivamente. En este hábitat, *Bacillus* era el principal representante del phylum *Firmicutes* y *Rubrobacter* de *Actinobacteria*. La comunidad bacteriana de los suelos salinos de otra región de la India (Rann of Kachchh, Gujarat), estaba constituida principalmente por *Bacillus* (10,8-37,9 %), *Pseudomonas* (1,7-4,5 %) y *Halomonas* (1,1-4 %). *Salinibacter* constituía el 1,5 y 2 % de la comunidad en dos de las tres estaciones en las que se estudió el suelo. *Streptomyces*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Nocardioides* y *Acinetobacter* fueron los siguientes géneros más representados, aunque su abundancia variaba estacionalmente (Narayan et al., 2018).

Igualmente, la diversidad de arqueas detectadas en suelos y sedimentos salinos por medio de estudios moleculares se ha incrementado con respecto a la hallada mediante técnicas clásicas de cultivo. No solo se detectan euriarqueotas de la clase *Halobacteria*, sino que también se observan arqueas metanógenas de las clases *Methanobacteria* y *Methanomicrobia* y representantes de la clase *Archaeoglobi* (Narayan et al., 2018), así como miembros de *Thermoplasmatales* y *Crenarchaeota* en suelos y sedimentos y *Thaumarchaeota* (Lay et al., 2013; Yang et al., 2018), *Bathyarchaeota* y *Woesearchaeota* en sedimentos (Yang et al., 2018).

Las secuencias relacionadas con la actual clase *Halobacteria* que pudieron ser asignadas a taxones conocidos en el estudio de un suelo transitoriamente salino (7-18 %) en Salt Spring (Columbia británica, Canadá), se relacionaban los géneros *Haloarubrum*, *Natrinema*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena* y *Natronococcus* (Walsh et al., 2005). Por su parte, la caracterización de la comunidad de arqueas de Rambla Salada (Murcia) reveló que las secuencias obtenidas estaban principalmente relacionadas con los géneros *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Halobacterium* y *Halosimplex* (Oueriaghli et al., 2013). Narayan y colaboradores (2018) detectaron *Haloferax* como las haloarqueas mayoritarias en su estudio de las fluctuaciones estacionales de la comunidad microbiana en suelos salinos del Rann of Kachchh (India). *Halobacterium* y *Haloarcula* fueron las más abundantes de los suelos salinos del Little Rann of Kutch (Patel et al., 2015). En el estudio de Pandit y colaboradores (2015) sobre la diversidad procariota en suelos salinos del Great Rann of Kutch, la mayor parte de las arqueas presentes podían afiliarse a los géneros *Haloarcula*, *Halogeometricum*, *Natronomonas* y *Halobacterium*. Este es el único estudio hasta el momento que ha detectado la presencia de secuencias relacionadas con la arquea cuadrada *Haloquadratum*, que abunda en ambientes hipersalinos acuáticos saturados de NaCl como los cristalizadores de las salinas solares de

Santa Pola (Ghai et al., 2011). En suelos salinos alcalinos (con CE_e entre 0,7 y 157,2 y pH entre 8,5 y 10,5) del antiguo lago Texcoco estudiados por Navarro-Noya y colaboradores (2015), los géneros representados por más del 0,5 % de los OTUs fueron *Halobiforma*, *Halorhabdus*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natronococcus* y *Natronomonas*. Valenzuela-Encinas y colaboradores (2008), que caracterizaron la comunidad de arqueas de un suelo salino de esta misma localización con pH 11,75 detectaron principalmente secuencias relacionadas con *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronobacterium*, *Natrinema*, *Natronomonas*, *Halovivax* y *Halalkalicoccus*, además de otras relacionadas con grupos no caracterizados. Las secuencias relacionadas con *Halobacteria* detectadas en los sedimentos del lago alcalino Wadi An Natrum en Egipto con más similitud a las presentes en las bases de datos, se parecían en un 92-96 % a *Natronomonas*, mientras que el resto no estaban relacionadas con ningún taxón conocido (Mesbah et al., 2007). Wang y colaboradores identificaron secuencias afiliadas a los géneros *Haloferax* y *Natronomonas* en suelos salinos contaminados de un yacimiento petrolífero en China (Wang et al., 2011).

Las secuencias de arqueas detectadas en sedimentos del Salton Sea (con 5-11,8 % de sales) pertenecían principalmente a *Halalkalicoccus* (Swan et al., 2010). En los sedimentos salinos de diversas localizaciones de Europa, África y Sudamérica con salinidades comprendidas entre 25 y 43 %, los representantes mayoritarios eran miembros de los géneros *Halorhabdus*, *Halobacterium*, *Halorubrum* y *Natronomonas*, aunque ninguno de ellos resultó ubicuo a todas las muestras. Youssef y colaboradores (2012), en su estudio de sedimentos salinos (1-10 % de sales), encontraron que los géneros representados por más del 5 % de las secuencias fueron *Halogranum*, *Halolamina*, *Haloplanus*, *Halosarcina*, *Halorientalis*, *Halorubrum*, *Haloferax* y *Halobacterium*. *Halorubrum* y *Natronomonas* fueron los géneros principales de la clase *Halobacteria* encontrados por Liu y colaboradores (2016) en diversas muestras de suelos salinos de la meseta del Tíbet.

Con respecto a las arqueas metanógenas, mientras que las secuencias de éstas detectadas por Narayan y colaboradores (2018) se asociaban a la clase *Methanobacteria*, diversos estudios han constatado la presencia de representantes de la clase *Methanomicrobia* en ambientes hipersalinos terrestres. En concreto, se detectaron los géneros *Methanolobus* (Walsh et al., 2005; Mesbah et al., 2007; Navarro-Noya et al., 2015b), *Methanohalophilus* (Walsh et al., 2005), *Methanococcoides* (Munson et al., 1997; Xie et al., 2014) *Methanosaeta* (Munson et al., 1997; Navarro-Noya et al., 2015b) y *Methanosarcina* (Navarro-Noya et al., 2015b) del orden *Methanosarcinales* así como *Methanoculleus* (Swan et al., 2010), *Methanogenium* (Swan et al., 2010), y *Methanospirillum* (Navarro-Noya et al., 2015b) del orden *Methanomicrobiales*.

Otros grupos no cultivados de euriarqueotas, como MGII (Marine Group II) y MBG-D (Marine Benthic Group D), se observan en estudios moleculares de suelos y sedimentos salinos (Munson et al., 1997; Walsh et al., 2005; Swan et al., 2010). Igualmente, se han detectado secuencias relacionadas con representantes no cultivados de la clase *Thermoplasmata* (Walsh et al., 2005; Oueriaghli et al., 2013; Navarro-Noya et al., 2015b; Narayan et al., 2018).

En cuanto a las secuencias relacionadas con *Crenarchaeota*, todas ellas estaban relacionadas con otras ambientales, algunas marinas, y eran más abundantes en muestras con salinidades bajas e intermedias (Munson et al., 1997; Walsh et al., 2005; Swan et al., 2010; Lay et al., 2013; Oueriaghli et al., 2013; Xie et al., 2014; Navarro-Noya et al., 2015b; Liu et al., 2016).

La proporción de arqueas y bacterias en los trabajos moleculares que consideran ambos dominios varía. En el suelo ártico estudiado por Lay y colaboradores (2013) con un 24 % de sales, el rango de suelos y sedimentos de La Sal del Rey analizados por Hollister y colaboradores (2010) (CE_e de 34-123 dS/m), así como los suelos salinos de distintas regiones de la India con salinidades comprendidas entre 4 y 31 % se observa una dominancia de arqueas (Pandit et al., 2015; Patel et al., 2015; Narayan et al., 2018). Por otro lado, en los sedimentos del Salton Sea (California) (5,0-11,5 % de salinidad), la proporción de arqueas varía entre el 64 y 99 % (Swan et al., 2010) y en las 29 muestras de suelos del Qarhan Salt Lake (China) ($EC_{1:5}$ de 0,2-148 dS/m, pH de 7,39) analizadas por Xie y colaboradores (2017) las arqueas constituyen del ~15 al 85 % de la comunidad. Como se ha descrito con anterioridad, aunque los grupos principales se mantienen en la mayoría de las ocasiones y existen algunas similitudes entre los géneros principales que aparecen en estos ambientes terrestres salinos estudiados, sus proporciones y representantes varían de una muestra a otra, incluso en aquellos de una misma localización geográfica. Algunos autores han tratado de relacionar los cambios en la comunidad microbiana con factores edáficos y climáticos. Diversos estudios ponen de manifiesto que la abundancia y diversidad de la comunidad bacteriana disminuye con la salinidad (Swan et al., 2010; Pandit et al., 2015; Mora-Ruiz et al., 2018; Zhao et al., 2018). En cuanto a la abundancia y diversidad de arqueas, en ciertas investigaciones se ha encontrado una correlación significativamente positiva con la salinidad (Walsh et al., 2005; Hollister et al., 2010a; Liu et al., 2016; Mora-Ruiz et al., 2018), mientras que en otros no se encuentra correlación de la comunidad de arqueas con el citado parámetro (Pandit et al., 2015). Otros parámetros relacionados con la estructuración de la comunidad y/o diversidad de bacterias en estos artículos sedimentos y/o suelos son el pH (Valenzuela-Encinas et al., 2009; Zhao et al., 2018) el contenido en nitritos y bromo (Mora-Ruiz et al., 2018). Por su parte, la comunidad de arqueas varía con el contenido en carbono (Hollister et al., 2010a; Swan et al., 2010), en agua y fósforo (Hollister et al., 2010a; Mora-Ruiz et al., 2018), magnesio y nitritos (Mora-Ruiz et al., 2018), y en sodio (Hollister et al., 2010a).

También se han descrito relaciones con parámetros fisicoquímicos a niveles taxonómicos más finos. *Euryarchaeota* y *Halobacteria* se correlacionan positivamente con la salinidad (Oueriaghli et al., 2013; Yang et al., 2018), mientras que *Thermoplasmatales* se relaciona negativamente con este factor y con el pH, y positivamente con la temperatura y la cantidad de oxígeno en los estudios de Oueriaghli y colaboradores (2013). Pandit y colaboradores (2015) encontraron una correlación negativa entre la comunidad de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Verrucomicrobia* con el contenido en sales, mientras que la proporción de *Actinobacterias*, *Chloroflexi* y *Spirochaetae* era máxima en concentraciones intermedias de salinidad. Una relación negativa con la salinidad para *Gammaproteobacteria* y positiva para betaproteobacterias se encontró en estudios de suelos y sedimentos salinos (Swan et al., 2010; Zhao et al., 2018). Otros trabajos han relacionado *Firmicutes* positivamente con la salinidad, mientras que la comunidad de *Actinobacteria* no parecía ser afectada por este parámetro (Zhao et al., 2018). A nivel de género,

la proporción de secuencias afiliadas al género *Salinibacter* aumentaba con la salinidad (Pandit et al., 2015).

La salinidad es uno de los parámetros principales que influyen en la estructuración de la comunidad microbiana. Los estudios de Auguet y colaboradores (2010) y Jeffries y colaboradores (2011) muestran que también es importante el tipo de sustrato (sólido o líquido). Sin embargo, pocos autores han comparado la estructura de la comunidad procariota de suelos y sedimentos y sus relaciones con los parámetros fisicoquímicos con la de aguas hipersalinas. Mora-Ruiz y colaboradores (2018), encontraron que los sedimentos poseían mayor diversidad microbiana que las muestras acuáticas y que existía un gran solapamiento entre los grupos detectados en ambos tipos de muestras. Los grupos específicos de sedimentos (*Rhodobacteraceae*, *Caulobacteraceae* y *Thermotogaceae*) constituían únicamente el 2,8 % de las secuencias totales (Mora-Ruiz et al., 2018). Otros autores no incluyen ambos tipos de muestras, pero discuten la comunidad microbiana detectada en los ambientes terrestres que estudian en el contexto de las comunidades procariotas de ambientes hipersalinos acuáticos ampliamente estudiados, sugiriendo que éstas son distintas en uno y otro caso (Quesada et al., 1983; Youssef et al., 2012).

En las citadas publicaciones es frecuente la detección de una proporción de secuencias relacionadas con microorganismos no cultivados, así como otras que no pueden ser clasificadas a nivel de género. La diversidad procariota de suelos salinos que aún no se conoce queda constatada en la revisión de Ma y Gong (2013), donde se analizan todas las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas de suelos salinos (bien ambientales o procedentes de aislados en cultivo puro) existentes en las bases de datos públicas GenBank y RDP (Ribosomal Database Project). Sus análisis de rarefacción mostraron que tan solo se conoce el 25 % de la diversidad bacteriana y el 50 % de la de arqueas presente en estos ambientes. El conocimiento de la diversidad, fisiología y metabolismo de esta porción de microorganismos desconocidos solo será posible mediante la intensificación de los esfuerzos para su aislamiento, y el desarrollo de estrategias metagenómicas que permitan el ensamblaje de genomas de los microorganismos más abundantes en estos ambientes.

I.4 Estudio del suelo como sistema biológico

I.4.1 Particularidades del suelo como hábitat

El suelo es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo en el cual la fase sólida prevalece sobre la líquida y la gaseosa. Se trata de un sistema con características peculiares.

El suelo constituye uno de los hábitats microbianos más extensos y diverso (Whitman et al., 1998; Quince et al., 2008). Contiene una gran cantidad de biomasa, y una gran diversidad microbiana. Se estima que el número de células microbianas por gramo de suelo varía de 10^8 a 10^{10} , perteneciendo a cientos o incluso millones de especies microbianas (Nannipieri et al., 2014). De esta manera, se estima que la cantidad de información genética contenida en un gramo de suelo corresponde a 4000 genomas humanos (Schloter, 2012), mientras que la

cantidad de carbono y nitrógeno encerrado en la biomasa microbiana es mayor que la biomasa de las plantas (Whitman et al., 1998).

La heterogeneidad del suelo se ha propuesto como una de las causas de la gran biodiversidad presente en los mismos (Treves et al., 2003; Walsh et al., 2005; Carson et al., 2010; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013). El hábitat del suelo se caracteriza por heterogeneidades en todas las escalas medidas, desde nanómetros hasta kilómetros, que difieren en características químicas, físicas y biológicas en el espacio y el tiempo (Voroney, 2007). Las variaciones en las propiedades del suelo a microescala dan como resultado una gran variedad de microhábitats donde viven los microorganismos (Figura 10). Esta situación limita las interacciones entre microorganismos que habitan un mismo suelo (Nunan, 2017), ya que, en función del contenido en agua del suelo, los microhábitats pueden estar conectados entre ellos o no (Carson et al., 2010). Dado que las interacciones microbianas y sus funciones no pueden entenderse sin conocer las propiedades biológicas y fisicoquímicas del ambiente en el que viven (Nunan, 2017), y la dificultad de realizar mediciones de estos factores a escalas tan pequeñas, los estudios de ecología microbiana del suelo tienen que lidiar frecuentemente con el problema de interpretación derivado de medir las características de un ambiente a escalas mucho mayores que las relevantes para los microorganismos objeto de estudio (Vos et al., 2013). Además, se ha propuesto que el espacio ocupado por los organismos del suelo es muy pequeño, constituyendo del 0,1 al 5 % del total del volumen disponible. Solo algunos microhábitats del suelo poseen las condiciones adecuadas para el desarrollo microbiano por lo que las poblaciones microbianas del suelo se concentran en determinados lugares como la rizosfera, alrededor de partículas de materia orgánica, o películas de agua (Nannipieri et al., 2003).

Diversos tipos de moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos pueden ser adsorbidas a las partículas del suelo o sustancias húmicas. Este hecho tiene diversas implicaciones para los procesos microbianos. Estas partículas adsorbidas están por lo general protegidas de la acción de proteasas o nucleasas, por lo que se mantienen activas (en el caso de las proteínas) y viables para la transformación bacteriana (en el caso de los ácidos nucleicos) (Nannipieri et al., 2014). Los sustratos orgánicos también pueden permanecer adheridos a las partículas del suelo, o bien localizarse en el interior de microagregados, lo que dificulta su degradación microbiana (Ladd et al., 1996).

Los microorganismos del suelo juegan papeles esenciales en una gran variedad de funciones del mismo. Juegan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos, en el desarrollo de las plantas, la purificación del agua, el almacenamiento de carbono o el mantenimiento de la estructura del suelo (Van Der Heijden et al., 2008; Vos et al., 2013).

I.4.2 Aproximaciones ómicas al estudio de la ecología microbiana de suelos

Se denominan técnicas ómicas a aquellas que permiten el estudio del conjunto o la totalidad de alguna propiedad o característica (genes, lípidos, proteínas, transcritos, etc.) de un sistema. Así, por ejemplo, la genómica y proteómica son las técnicas que permiten el estudio del conjunto de genes y proteínas de un organismo, respectivamente. Cuando las técnicas ómicas se aplican al estudio de todos los organismos presentes en un ecosistema, hablamos de meta-ómicas:

metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica, etc. Las meta-ómicas más desarrolladas son la metagenómica, que permite el estudio del conjunto de genes de una comunidad, o la metaproteómica, que se encarga del estudio de las proteínas expresadas por los organismos de una comunidad en un momento determinado. La secuenciación de amplicones no se considera una técnica meta-ómica, sino metagenética, dado que se trata de una librería de un solo gen (como el ARNr 16S), y no de todos los presentes.

El desarrollo de este tipo de técnicas junto con los avances bioinformáticos para la interpretación de sus resultados ha supuesto una revolución en el estudio de los sistemas microbianos, superando los sesgos de las técnicas clásicas de cultivo y molecular de PCR y por lo tanto aumentando la resolución con la que es posible describir la comunidad microbiana, incluyendo la biogeografía, potencial metabólico y diversidad, mecanismos de adaptación, filogenia y evolución (Cardenas & Tiedje, 2008).

Entre los avances más importantes que estas técnicas han permitido destaca el aumento exponencial de la descripción de nuevos grupos microbianos (Castelle et al., 2015; Hug et al., 2016; Nesme et al., 2016; Parks et al., 2017; Solden & Wrighton, 2017) que se ejemplifica en la reciente actualización del árbol de la vida por Parks y colaboradores (2017), en la que incluyeron casi 8000 genomas nuevos reconstruidos a partir de metagenomas de diferentes ambientes naturales, lo que aumentó en un 30 % la diversidad de bacterias y arqueas conocida hasta el momento (Castelle & Banfield, 2018). El análisis de datos meta-ómicos no solo ha permitido avanzar en nuestro conocimiento de la biodiversidad filogenética en la Tierra, sino que ha posibilitado nuevos estudios sobre la vida y la aparición de ciertos rasgos como la respiración aeróbica o la fotosíntesis (Soo et al., 2014; Castelle & Banfield, 2018), así como el papel de estos microorganismos no cultivados en los ciclos biogeoquímicos (Spang et al., 2015; Hu et al., 2016; Adam et al., 2017) o el cambio climático (Mackelprang et al., 2016; Wallace et al., 2017). Estas técnicas no solo han evolucionado la ecología microbiana, sino también el campo de la seguridad alimentaria (Cocolin et al., 2017) o la medicina (Virgin & Todd, 2011; Valles-Colomer et al., 2016), entre otros muchos. La completa integración de estas técnicas con otras complementarias (otras ómicas, técnicas de aislamiento en cultivo puro o marcaje con isótopos estables, por ejemplo) dará lugar sin duda a nuevos avances en la ecología microbiana (Jansson & Baker, 2016; Nesme et al., 2016; Starr et al., 2017; Gutleben et al., 2018).

El conocimiento microbiano del suelo, considerado la última frontera de la Microbiología (Van Elsas et al., 2007) también se ha beneficiado de estos avances en las técnicas de estudio de la ecología microbiana. La introducción de las técnicas ómicas, como la metagenómica, en el estudio de la ecología microbiana de suelos ha permitido el estudio a gran escala de la “mayoría no cultivada” de microorganismos (Howe et al., 2014; Delmont et al., 2015; White et al., 2016), y el establecimiento de patrones de cambio de la comunidad microbiana con parámetros fisicoquímicos ambientales o derivados de la acción antropogénica (Lupwayi et al., 1998; Kowalchuk et al., 2002; Ge et al., 2008; Cruz-Martínez et al., 2009; Lauber et al., 2009; Griffiths et al., 2011; Fierer et al., 2012).

Sin embargo, aún existen varios retos para el aprovechamiento máximo de las técnicas ómicas en el estudio de la ecología microbiana de suelos (Nesme et al., 2016). Por un lado, los diferentes métodos de extracción de ADN/ARN empleados poseen diferentes sesgos y, dada la ausencia de un suelo de referencia con el que evaluar la eficiencia de extracción de ADN, no es posible determinar la representatividad del ADN obtenido con respecto al de la microbiota del suelo. Además, aunque han aparecido técnicas para tratar de solventar este problema (como MDA, *multiple displacement amplification*), la cantidad de muestra de partida necesaria para obtener las cantidades de ácidos nucleicos requeridos en estudios ómicos sigue siendo la principal limitación para su uso en ambientes con baja biomasa, o en análisis a pequeña escala de muchos otros hábitats con un mayor contenido en biomasa. La preparación de la muestra para secuenciar y la propia tecnología de secuenciación elegida introducen nuevos sesgos que impiden la comparación de distintos estudios. Por otro, el análisis de la gran cantidad de datos obtenidos mediante estas técnicas es abrumador, computacionalmente costoso y no estandarizado. Por ello, pueden obtenerse diferentes resultados a partir de una misma base de datos ómica en función de los métodos usados para eliminar las secuencias de baja calidad, relacionar secuencias con aquellas más parecidas en las bases de datos (anotación), ensamblar secuencias cortas en otras más largas o *contigs* (ensamblaje) y agrupar dichos *contigs* en grupos relacionados filogenéticamente para obtener genomas completos (*binning*). Las indeterminaciones de la eficiencia y fidelidad de los métodos de extracción de ADN y análisis bioinformáticos utilizados, así como la variabilidad fruto del uso de diferentes métodos en cada una de las etapas, dificulta la interpretación de los datos ómicos, determinación de correlaciones veraces, cuya relación causal, en cualquier caso, necesita ser comprobadas en el laboratorio (Vestergaard et al., 2017).

La aplicación de la metagenómica al estudio de la ecología de suelos presenta dificultades adicionales. Algunas de ellas son comunes a cualquier método aplicado al estudio de la biología del suelo, como las derivadas de la gran heterogeneidad de la estructura del suelo y de la alta diversidad de organismos presentes en el mismo (Lombard et al., 2011; Myrold & Nannipieri, 2014) y otras características de los métodos que se basan en la extracción de ácidos nucleicos del suelo, como la adsorción de las moléculas de ADN a las partículas del suelo, así como la estabilidad del ADN extracelular en este ambiente (Nesme et al., 2016; Vestergaard et al., 2017).

Los suelos se encuentran entre los ecosistemas con mayor diversidad de microorganismos (Lozupone & Knight, 2007). Para capturar toda la diversidad presente en un suelo se requiere una secuenciación profunda que no siempre es alcanzable, por lo que, en la mayoría de los casos, además de ignorar el papel de las especies menos abundantes, la determinación de las relaciones entre microorganismos y con los parámetros ambientales puede ser incompleta y confusa. Además, la alta diversidad existente dificulta los procesos de ensamblaje (Vestergaard et al., 2017) y, por tanto, de obtención de genomas a partir de secuencias individuales a partir de donde realizar análisis ecológicos y evolutivos (Hugerth et al., 2015). Por otra parte, solo se ha conseguido aislar en cultivo puro y caracterizar una parte minoritaria de la biodiversidad existente en los suelos (Janssen et al., 2002; Schoenborn et al., 2004; Burmølle et al., 2009; Vartoukian et al., 2010; Choi et al., 2016; Pham & Kim, 2018), por lo que las bases de datos con las que se comparan estos metagenomas no contienen suficientes referencias adecuadas para

la anotación correcta de las secuencias de las bases de datos metagenómicas de suelos (Choi et al., 2016), lo que resulta en una alta proporción de secuencias sin anotar (Delmont et al., 2012; Fierer et al., 2012; Choi et al., 2016).

La alta heterogeneidad de la matriz del suelo dificulta la extracción de conclusiones reproducibles y válidas en la escala en la que se producen los procesos e interacciones microbianos, dada la dificultad de obtener réplicas biológicas representativas en la escala de los procesos microbianos que se desea estudiar (Vestergaard et al., 2017). En ciencia, la reproducibilidad de un resultado determina su veracidad (Prosser, 2010). La reproducibilidad de una medida física, química o biológica de un suelo viene determinada por el grado de heterogeneidad del mismo y nuestra capacidad para medir dichas propiedades en la escala de los micronichos con diferentes condiciones que alberga el suelo estudiado (Ranjard et al., 2000; Smalla & van Elsas, 2010; Vos et al., 2013; Constancias et al., 2014; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015; Vestergaard et al., 2017). Estos micronichos con características diferenciadas se forman como consecuencia de la desconexión entre distintos puntos del suelo, que ocurre como consecuencia de una reducción en el contenido de agua del suelo (Carson et al., 2010; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013). Así, por ejemplo, el contenido en agua y propiedades químicas de la solución del suelo pueden variar drásticamente de un punto del sistema a otro muy cercano y esta situación de heterogeneidad espacial se acentúa a medida que disminuye el contenido en agua del suelo estudiado (Carson et al., 2010; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013). En este sentido, se ha propuesto, incluso, que la recogida de réplicas biológicas para la realización de un estudio sólido estadísticamente puede ser imposible debido a la gran heterogeneidad de este sistema ya que actualmente es metodológicamente complejo determinar parámetros fisicoquímicos y biológicos en la escala relevante de los microorganismos (Nesme et al., 2016). Es por ello que la interpretación de los datos medidos en suelo requiere la consideración de la heterogeneidad del suelo estudiado así como de la escala de medida ideal y la utilizada (Smalla & van Elsas, 2010; Vos et al., 2013; Myrold & Nannipieri, 2014; Jansson & Baker, 2016). Dada la cantidad de muestra requerida para llevar a cabo los estudios ómicos, actualmente no es posible aplicar estos métodos en la escala adecuada para el estudio de los procesos microbianos e interacciones en micronichos específicos del suelo, por lo que se usan muestras más grandes y los resultados que observamos son un compendio de los que se producen en cada uno de los micronichos de la misma (Myrold & Nannipieri, 2014; Jansson & Baker, 2016; Nesme et al., 2016). A la heterogeneidad física hay que sumarle al temporal, ya que el suelo es un sistema muy dinámico que se encuentra influenciado constantemente por la acción del clima y macro- y microorganismos que modifican su composición en el tiempo (Myrold & Nannipieri, 2014; Nesme et al., 2016).

Como método basado en la extracción de ADN del suelo, la metagenómica sufre los efectos de la adsorción de estas moléculas a las partículas de suelo, que interfieren con el proceso de extracción, además de la importante cantidad de ADN extracelular que se encuentran en los suelos, donde se conservan bastante bien (Nesme et al., 2016).

A pesar de los retos a los que aún se enfrenta la metagenómica de suelos, ha permitido grandes avances en el conocimiento actual de la microbiota que habita estos ambientes, y la explotación

de todo su potencial está aún por llegar. La integración de esta técnica con otras ómicas, el desarrollo futuro de un suelo de referencia donde validar técnicas de análisis y el avance de la tecnología permitirán el avance en el conocimiento de las relaciones entre microorganismos en el suelo, así como sus funciones y fisiología en diferentes condiciones fisicoquímicas (Myrold & Nannipieri, 2014; Jansson & Baker, 2016; Nesme et al., 2016).

II. OBJETIVOS

Los ambientes hipersalinos se caracterizan por poseer un alto contenido en sales. Esta propiedad, junto a otros factores fisicoquímicos, limita la biodiversidad presente en ellos. Mientras que la microbiota de ambientes hipersalinos acuáticos ha sido extensamente estudiada, la de los ambientes hipersalinos terrestres, como los suelos salinos ha recibido menor atención. El componente biológico, y especialmente, microbiano de los suelos salinos es en última instancia el responsable de los procesos bioquímicos y ciclos biogeoquímicos que ocurren en los estos sistemas. Dado que el aumento de la salinidad de los suelos está poniendo en peligro la productividad de muchas zonas del mundo y nuestra capacidad para alimentar a una creciente población mundial, el interés por el estudio de las comunidades microbianas en suelos salinos se ha incrementado en los últimos años. La compleja estructura del suelo y su heterogeneidad a diversas escalas espaciales y temporales dificulta en muchas ocasiones la interpretación de los resultados obtenidos. Aunque el número de publicaciones sobre la diversidad procariota y los factores edáficos relacionados con ella ha aumentado en los últimos meses, el conocimiento que se posee de la ecología microbiana en suelos salinos sigue siendo fragmentario y limitado.

Sin embargo, la escasa literatura disponible sobre los suelos salinos indica que se trata de un ambiente conceptualmente distinto a los hábitats hipersalinos acuáticos, cuyas condiciones fisicoquímicas, incluida la salinidad, presentan valores generalmente más estables que los encontrados en suelos. La gran mayoría de estudios sobre la microbiota de suelos salinos coincide en que los microorganismos que habitan estos hábitats pueden soportar un amplio rango de salinidades y que la comunidad está compuesta por grupos taxonómicos con representantes halófilos, así como por otros que no incluyen halófilos o halotolerantes conocidos. Además, una gran proporción de estas investigaciones encuentra un número no desdeñable de secuencias relacionadas con microorganismos no cultivados o incluso no relacionadas con ninguna de las presentes en las bases de datos. El estudio de la osmoadaptación de los microorganismos halófilos de suelo ha revolucionado los modelos clásicos de osmoadaptación establecidos en base al conocimiento de los hábitats hipersalinos acuáticos y sus habitantes. Así, el estudio de la microbiota de estos suelos extremos puede complementar nuestro actual conocimiento del mundo halófilo, que está sesgado hacia halófilos del medio acuático y así hacer posible predicciones y modelos para la recuperación de suelos afectados por salinización.

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva han demostrado su gran potencial en el campo de la ecología microbiana de suelos, permitiendo la descripción de la comunidad microbiana presente con un nivel de detalle sin precedentes, además de posibilitar la relación de los cambios en la comunidad con diversos parámetros fisicoquímicos. Las técnicas metagenómicas, en concreto, proporcionan información sobre la diversidad filogenética y metabólica de las comunidades microbianas y permiten reconstruir genomas ambientales de microorganismos no cultivados.

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Caracterización de la diversidad filogenómica y metabólica de procariotas de suelos salinos localizados en el Paraje Natural Marismas del Odiel, en Huelva, mediante métodos metagenómicos.
2. Comparación e integración de los resultados del análisis anterior con la extensa bibliografía disponible sobre la microbiota de ambientes hipersalinos acuáticos, así como con los estudios en otros suelos salinos, para identificar generalidades y particularidades de uno y otro ambiente. Determinar en qué medida el conocimiento actual de la ecología de ambientes hipersalinos y sus habitantes, basado mayoritariamente en estudios de medios acuáticos, es aplicable a ambientes hipersalinos terrestres.
3. Determinación de la contribución relativa de la salinidad y otros parámetros fisicoquímicos a la estructuración de las comunidades microbianas de suelos salinos del Paraje Natural Marismas del Odiel.
4. Papel de la luz como fuente de energía de los microorganismos halófilos que habitan en los suelos de este paraje y de las rodopsinas como sistemas involucrados en dichos procesos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Muestreos y análisis fisicoquímico de las muestras

III.1.1 Toma de muestras

Se realizaron un total de 4 muestreos de suelos salinos localizados en el Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva) (Tabla 3, Figura 11). Las muestras recogidas durante el primero y el segundo de ellos, llevados a cabo en octubre de 2013 y noviembre de 2014, respectivamente, se utilizaron para la caracterización de la comunidad procariota mediante secuenciación metagenómica, mientras que los muestreos tercero y cuarto sirvieron para el análisis de la relación de la salinidad con la comunidad microbiana de estos suelos salinos y el estudio la utilización de la luz como fuente de energía por la comunidad procariota del suelo. En la toma de muestras realizada en julio de 2015, se seleccionaron diferentes puntos de muestreo dentro de una misma localización, y se diferenciaron superficie (1 cm) y subsuperficie (2-4 cm).

Tabla 2. Características de los muestreos realizados.

Muestreo	Fecha	Localización	Nº de muestras	Uso
1	Octubre 2013	1	1	Secuenciación shotgun
2	Noviembre 2014	1	1	
3	Julio 2015	1, 2, 3, 4	48	Secuenciación de amplicones (ARNr 16S)
4	Agosto 2017	1	1	Marcaje con isótopos estables, H ₂ O ¹⁸ -SIP

En cada punto de muestreo se recogieron aproximadamente 200 g de suelo en bolsas estériles Whirl-Pak® (Sigma-Aldrich), y se conservaron en frío durante su traslado al laboratorio en un plazo de solo unas horas. Una vez allí, las muestras se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento en los días sucesivos al muestreo.

Las muestras recogidas durante el tercer y cuarto muestreo se trasladaron al Pacific National Northwest Laboratory (Richland, Washington, Estados Unidos) en hielo seco y a la Universidad de Southampton (Reino Unido) en frío, respectivamente. En ambos casos se conservaron en nuestro laboratorio réplicas de las muestras enviadas.

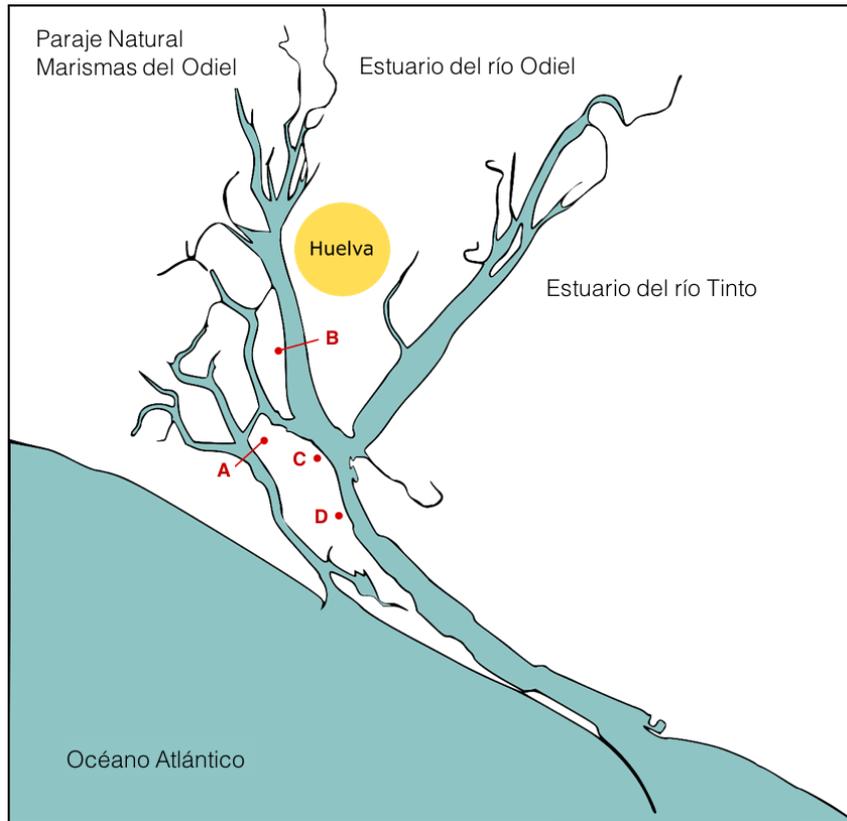


Figura 10. Puntos de muestreo en el Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva).

III.1.2 Análisis fisicoquímicos de las muestras

La temperatura del suelo en el momento de muestreo se determinó *in situ*. La salinidad y el pH de las muestras se determinaron en un extracto 1:5 con agua destilada mediante el conductímetro CRISON 35+ (Hach Lange Spain, S.L.U.) y el pHmetro CRISON GLP 21, respectivamente. En el caso del tercer muestreo, el pH se determinó en un extracto 1:2,5.

Una cantidad de 100 g por muestra de estos muestreos fue enviada al laboratorio Innoagral (Grupo Hespérides Biotech S.L., Sevilla) para el análisis detallado de parámetros fisicoquímicos complementarios de las muestras. La textura se evaluó mediante el método Bouyoucos (Bouyoucos, 1936) y se hizo uso del sistema de clasificación textural del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) para determinar la clase textural (Ditzler et al., 2017). El contenido en agua se obtuvo por gravimetría. El contenido en carbono se obtuvo de acuerdo al método de Walkley-Black (Walkley & Black, 1934). El contenido en amonio, sulfato, fósforo, nitratos y nitritos se determinó en extractos 1:5 de suelo llevado a sequedad y agua destilada mediante espectroscopía visible ultravioleta. Para las determinaciones del contenido en nitrógeno se utilizó el método Kjeldhal (Kjeldahl, 1883) y la concentración de cloruros se midió por volumetría. La concentración de metales y del resto de iones relacionados con la salinidad se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica. Estas determinaciones fisicoquímicas se realizaron llevando el suelo a sequedad.

III.2 Marcaje con isótopos estables (H_2O^{18})

III.2.1 Tratamiento previo de las muestras

El suelo se tamizó a 4 °C con un tamiz con abertura de malla de 2 mm. A continuación, se extendió sobre un recipiente estéril y se colocó en una estufa a 37 °C con cloruro de calcio hasta alcanzar la mitad del contenido en agua inicial. La monitorización del contenido en agua se realizó mediante el proceso detallado en la sección III.1.2. Este suelo se repartió en tubos Falcon cónicos de centrifuga de 15 mL (Fisher Scientific International, California, EE. UU.), para su posterior incubación.

III.2.2 Diseño del experimento, marcaje con H_2O^{18} e incubación

El planteamiento del experimento para la determinación del papel de la luz en el *pool* energético de la microbiota de los suelos salinos estudiados incluyó condiciones de luz y oscuridad, así como el tratamiento con un inhibidor del fotosistema II, diuron o DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) (Sigma), que permitiera aislar el efecto de las rodopsinas de la fotosíntesis. Así, se incluyeron un total de 22 muestras de 2 gramos de suelo cada una: a 6 de ellas se les añadió H_2O ultrapura estéril libre de ADNasas y ARNasas (Ambion™, ThermoFisher), 8 recibieron H_2O^{18} estéril y a otras 8 se les adicionó H_2O^{18} estéril con una concentración de DCMU de 5 μM (preparada a partir de una solución saturada de DCMU en H_2O ultrapura estéril). La cantidad de H_2O y H_2O^{18} adicionada fue de 150 μL /gramo de suelo. Se incubaron un número igual de cada tipo de muestras tanto en luz como en oscuridad a 37 °C durante 3 semanas. Las condiciones de luz consistieron en una intensidad de $147,5 \pm 10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz blanca de 5500 K proporcionada por dos bombillas LED cilíndricas, de 40 vatios y 3500-3800 lúmenes cada una (Bonlux, Lusta LED Co., Guandong, China). Las muestras a las que le correspondía condiciones de oscuridad se incubaron junto a las anteriores, cubiertas individualmente con papel de aluminio para evitar que les llegara luz.

Para los estudios de viabilidad, se prepararon 6 muestras con 1 g de suelo cada una, a los que se les adicionó 150 μL de H_2O ultrapura estéril. Tres de esas muestras se incubaron en condiciones de luz y otras tres en condiciones de oscuridad durante tres semanas.

III.2.3 Centrifugación isopícnica y fraccionamiento de gradientes

Tras la extracción de ADN, llevada a cabo como se indica en la sección III.3, una cantidad aproximada de 1 μg de ADN se sometió a una centrifugación en una solución de CsCl (Sigma) con una densidad de $1,725 \text{ g mL}^{-1}$ preparada a partir de una solución stock de $1,885 \text{ g mL}^{-1}$, y tampón GE (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM EDTA) (Neufeld et al., 2007). Las densidades se calcularon a partir del índice de refracción de las soluciones, que se determinó (con corrección de temperatura) mediante un refractómetro digital Reichert AR200. La centrifugación se llevó a cabo en una Ultracentrífuga Optima XPN-80 (Beckman), utilizando el rotor Beckman VTi90 y tubos de centrifuga de polipropileno de una capacidad de 5,1 mL Quick-Seal® (Beckman Coulter) sellados con calor mediante una selladora Beckman Tube

Sealer. La centrifugación se llevó a cabo durante 60-65 horas a una velocidad de 47 200 rpm y una temperatura de 20 °C.

El gradiente obtenido tras la centrifugación se separó en 16 fracciones de ~350 µL mediante la inyección en la parte superior del tubo de centrífuga sellado de un flujo constante de agua estéril generado por una bomba de jeringa programable, una vez que se había realizado una perforación en la parte inferior del mismo. La densidad de las fracciones obtenidas se calculó a partir del índice de refracción de éstas. El ADN contenido en cada fracción se precipitó añadiendo 2 µL de acrilamida lineal (Ambion, 5 mg mL⁻¹) y 2 volúmenes de solución de polietilenglicol (PEG) (30 % PEG 6000 y 1,6 M NaCl). Tras mezclar en vórtex, esta mezcla se incubó toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se procedió a una centrifugación a temperatura ambiente durante 30 minutos a 13 000 g. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con 500 µL de etanol de grado molecular (Sigma) al 70 %. Se procedió entonces a una centrifugación a 13 000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, para descartar el sobrenadante y posteriormente secar el *pellet* durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 30 µL de tampón TE (Neufeld et al., 2007). El ADN obtenido de este modo se conservó a -20 °C hasta su uso posterior.



Figura 11. Material utilizado durante el marcaje con H₂O¹⁸ y posterior centrifugación isopícnic.

III.2.4 qPCR en tiempo real

Se llevaron a cabo reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real del gen ARNr 16S para determinar la cantidad de ADN presente en cada fracción de los 22 gradientes. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL utilizando placas de 96 pocillos de volumen 0,1 mL MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™, Foster City, California, EE. UU.). Se empleó la polimerasa AmpliTaq™ Fast DNA Polymerase, junto al tampón de reacción 20x Master Mix TaqMan Fast Advanced (Applied Biosystems™). Se utilizó el ciclo de 40 minutos del termociclador AB StepOnePlus (Applied Biosystems™). Los cebadores universales de arqueas y bacterias utilizados se muestran en la Tabla 3 (Yu et al., 2005). La Tabla 3 muestra los componentes y concentraciones de las reacciones de amplificación.

Tabla 3. Cebadores universales de bacterias (BAC) y arqueas (ARC) utilizados en la qPCR.

Cebadores	Secuencia (5' – 3')
ARC787F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC
ARC1059R	GCCATGCACCCWCCTCT
ARC915P	AGGAATTGGCGGGGGAGCAC
BAC338F	ACTCCTACGGGAGGCAG
BAC805R	GACTACCAGGGTATCTAATCC
BAC516P	TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC

Tabla 4. Componentes y concentraciones de la reacción de qPCR.

Componente	Concentración/cantidad por reacción de PCR	
	Arqueas	Bacterias
Ready Mix 20x		1x
Cebador F (100 µM)	0,5 µM	0,9 µM
Cebador R (100 µM)	0,5 µM	0,9 µM
Sonda (100 µM)	0,2 µM	0,25 µM
Molde ADN		2 µL
H ₂ O ultrapura estéril		c.s.p. 20 µL
Volumen final		20 µL

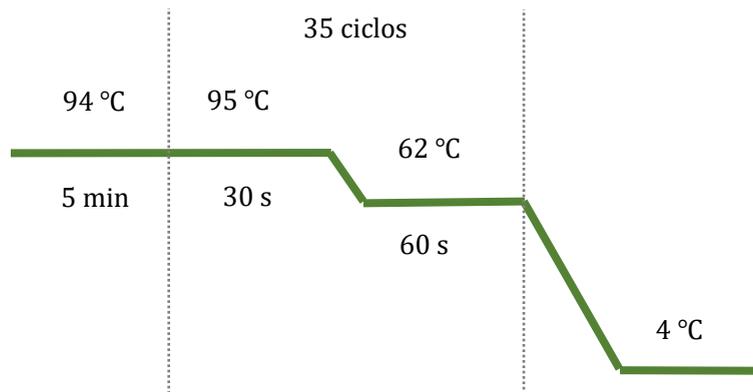


Figura 12. Ciclos de temperatura utilizados en la reacción de la qPCR en tiempo real.

III.3 Extracción y purificación de ADN metagenómico

El ADN de las muestras obtenidas en octubre de 2013 y noviembre de 2014 se extrajo utilizando el kit de extracción FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, California, EE. UU.) a partir de 10 gramos de suelo, utilizando el sistema FastPrep para la lisis mecánica y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo un posterior paso de purificación por el método de fenol:cloroformo.

Para la extracción del ADN de las muestras recogidas durante el tercer muestreo se empleó el *kit* comercial PowerSoil Extraction/Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, California, EE. UU.), utilizando 0,25 gramos de muestra. Fue necesario añadir un paso previo de lavado múltiple con solución salina basal (PBS) para eliminar parte de las sales presentes.

El kit de extracción empleado en el experimento de marcaje con isótopos estables (SIP) fue también FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, California, EE. UU.), en su versión de 0,5 gramos.

III.4 Determinación de la integridad, concentración y pureza del ADN

III.4.1 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa. Esta técnica se basa en la carga negativa que poseen las moléculas de ADN, propiedad por la cual migran hacia el ánodo (polo positivo) cuando se someten a un campo eléctrico (electroforesis). El gel de agarosa se comporta como un tamiz molecular que permite separar estas moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. De este modo, los fragmentos pequeños de ADN migrarán más rápido hacia el ánodo que las moléculas más grandes, que quedarán más cercanos al cátodo.

Se prepararon geles de agarosa (Seakem, LE Agarose) a una concentración del 0,8 % (p/v) en tampón TAE 1x (preparado a partir del 50x) con 3 μ L de RedSafe 20 000x (iNtRON

Biotechnology), que se sumergieron en ese mismo tampón en la cubeta de electroforesis. Se realizaron las diluciones oportunas de las muestras de ADN para cargar un total de ~100 ng en el gel. Las muestras de ADN o sus diluciones se mezclaron en una proporción 2:4 con tampón de carga 6x para facilitar la carga de la muestra en los pocillos del gel. Se utilizó un patrón de pesos moleculares de 1 Kb DNA (Invitrogen). La corriente eléctrica aplicada fue de 60 V durante 40 minutos. La visualización del ADN es posible gracias al compuesto RedSafe, que forma un complejo con el ADN visible bajo la luz ultravioleta, proporcionada por un transiluminador (TFP-M/WL).

Tampón TAE 50x: ácido acético glacial, 57,1 mL; EDTA 50 mM, pH 8,0; tris-base, 242 g; agua destilada, c.s.p. 1000 mL.

Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); sacarosa 40 % (p/v); xilén-cianol 0,25 % (p/v). Este tampón se conserva a 4 °C.

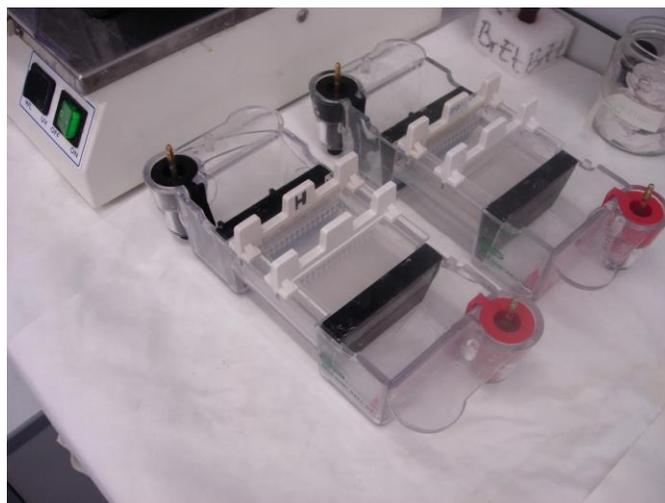


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa.

III.4.2 Espectrofotometría

Dado que los nucleótidos y otros compuestos contaminantes (proteínas, compuestos fenólicos, etc.) absorben energía de longitudes de onda específicas, el análisis de ADN por espectrofotometría permite la cuantificación y determinación de la pureza del ADN obtenido. En concreto, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que mide la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, y calcula los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . El ADN absorbe a 260 nm, mientras que los contaminantes orgánicos y las sales absorben a 230, y las proteínas y compuestos fenólicos lo hacen a 280 nm, respectivamente, por lo que una muestra de ADN se considera pura cuando los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} son 1,8 y 2,0, respectivamente (Desjardins & Conklin, 2011).

III.4.3 Fluorimetría

Los métodos de fluorimetría desarrollados para el análisis cuantitativo de ADN se basan en la unión de un fluoróforo selectivamente a moléculas de ADN de doble cadena intactas. Los dos métodos empleados en esta tesis doctoral fueron Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA y Qubit® dsDNA 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Mientras que el primero de ellos suele realizarse en placas de 96 pocillos, las medidas con el segundo método se realizan una a una. En ambas técnicas es necesario el uso de patrones. El método de Qubit dsDNA es más preciso para medidas de bajas concentraciones de ADN que las medidas de espectrofotometría. La cuantificación de ADN por esta técnica es preferible ya que, al contrario que en las medidas de espectrofotometría, únicamente mide ADN de doble cadena de buena calidad (Nakayama et al., 2016).

III.5 Secuenciación del ADN metagenómico y librerías del gen ARNr 16S

La secuenciación del ADN metagenómico obtenido de los dos primeros muestreos se llevó a cabo en el Servicio de Biología del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Se secuenció una placa completa por muestra con el pirosecuenciador Genome Sequencer FLX Titanium Series de 454 Life Sciences (Roche).

Con el ADN de las muestras recogidas durante el tercer muestreo se construyó una librería de la región V4 del gen ARNr 16S con los cebadores 515FB (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806RB (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), con la secuencia identificadora de cada muestra (*barcode*) incluida en el cebador directo, de acuerdo a los protocolos del Earth Microbiome Project (EMP) (<http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/emp-standard-protocols/16s/>) (Gilbert et al., 2014). Los amplicones resultantes se secuenciaron en el centro PNNL utilizando el kit para 500 ciclos de Illumina MiSeq Reagent Kit v2 (<http://www.illumina.com>) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La preparación de las librerías del gen ARNr 16S con los mismos cebadores citados anteriormente y la secuenciación de éstas en el experimento de marcaje con isótopos estables (SIP) se llevó a cabo en el servicio de secuenciación ambiental de la Universidad de Southampton (Reino Unido).

III.6 Bases de datos

III.6.1 Metagenomas

En el presente estudio se han utilizado datos procedentes de bases de datos metagenómicas obtenidas por otros autores con fines comparativos. Se trata de los metagenomas obtenidos de agua del Mar Mediterráneo (a partir de ahora nombrado como Deep Chlorophyll Maximum, DCM3) (Ghai et al., 2010), aquellos de diferentes estanques de la salina “Bras del Port”, de Santa Pola, Alicante (designados como SS13, SS19, SS33 y SS37, y correspondientes a estanques con salinidades del 13, 19, 33 y 37 %, respectivamente) (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a), un metagenoma de un estanque de una salina solar en Isla Cristina, Huelva con un 21 % de sales

(IC21) (Fernández et al., 2014b; 2014c) y otro de un cristizador de una salina localizada en la laguna Cahuil (Chile) con una salinidad del 34 % (Plominsky et al., 2014), además de metagenomas de suelos salinos del desierto del Kutch, en Gujarat, India (Pandit et al., 2015). Las características de estos metagenomas se muestran en la Tabla 5. Mientras que DCM3, las bases de datos obtenidas de las salinas de Santa Pola, Isla Cristina y la laguna Cahuil se secuenciaron mediante pirosecuenciación, los metagenomas procedentes de suelos salinos del desierto del Kutch se obtuvieron mediante la tecnología IonTorrent.

III.6.2 Bases de datos de secuencias

III.6.2.1 COG (Cluster of Orthologous Groups)

La base de datos de proteínas COG se generó mediante la comparación de todas las proteínas, predichas y conocidas, en todos los genomas microbianos completos disponibles, para inferir grupos de ortólogos. Cada COG consiste en un grupo de proteínas ortólogas en al menos tres linajes y probablemente corresponden a un dominio conservado en linajes más antiguos. Cada COG tiene una descripción funcional específica, además de englobarse en categoría superiores más amplias (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

III.6.2.2 RDP (Ribosomal Database Project)

RDP proporciona, entre otros, bases de datos revisadas de genes ARNr 16S de procariotas y ARNr 18S de hongos (Cole et al., 2014). La base de datos del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas empleadas en esta Tesis Doctoral corresponde a la versión 11.4 de esta base de datos revisada.

III.6.2.3 SEED

Esta base de datos funcional se organiza en subsistemas, cada uno de los cuales engloba productos génicos relacionados por participar en un mismo proceso biológico (como, por ejemplo, movilidad por medio de flagelo, síntesis de histidina, etc.) (Overbeek et al., 2005).

III.6.2.4 Base de datos de genomas de procariotas de NCBI: Refseq

La base de datos de genomas de procariotas Refseq de NCBI se nutre de Genbank, base de datos donde la comunidad científica deposita las secuencias genómicas de bacterias y arqueas que se van obteniendo. A diferencia de los genomas que podemos encontrar en Genbank, el subconjunto de genomas de esta base de datos que conforman Refseq están todos anotados mediante la herramienta de anotación de NCBI (Tatusova et al., 2016), lo cual mejora la coherencia de los productos génicos anotados en ellos (O'Leary et al., 2016).

Tabla 5. Bases de datos metagenómicas públicas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Base de datos	Hábitat	Salinidad (%)	Número de acceso en NCBI Sequence Read Archive	Referencia
DCM3	Mar Mediterráneo	3,8 %	SRX017111	(Ghai et al., 2010)
SS13	Salina solar "Bras del Port" (Santa Pola, Alicante)	13 %	SRX328504	(Fernández et al., 2014a)
SS19	Salina solar "Bras del Port" (Santa Pola, Alicante)	19 %	SRX090228	(Ghai et al., 2011)
SS33	Salina solar "Bras del Port" (Santa Pola, Alicante)	33 %	SRX347883	(Fernández et al., 2014a)
SS37	Salina solar "Bras del Port" (Santa Pola, Alicante)	37 %	SRX090229	(Ghai et al., 2011)
IC21	Salina solar de Isla Cristina (Huelva)	21 %	SRX352042	(Fernández et al., 2014c)
Gujarat (S1-S7)	Suelos salinos del desierto del Kutch (India)	4,11-30,79 %	S1 (SRX306504) S2 (SRX306503) S3 (SRX519631) S4 (SRX519746) S5 (SRX519747) S6 (SRX519748) S7 (SRX519749)	(Pandit et al., 2015)
Cáhuil	Salina de laguna Cáhuil (Chile)	34 %	SRX680116	(Plominsky et al., 2014)

III.6.2.5 NCBI-nr (non-redundant protein sequences)

La base de datos nr contiene las secuencias de otras bases de datos, tanto curadas (RefSeq, SwissProt, PIR, PDB y PRF) como no curadas (traducciones de GenBank: GenPept), y no es redundante (esto es, de ella se han eliminado las secuencias duplicadas) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>). La versión de la base de datos utilizada en esta Tesis Doctoral se descargó del link <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/> el 25/09/2017.

III.7 Análisis bioinformático de las secuencias metagenómicas

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó en una máquina virtual suministrada por el Servicio de Supercomputación del Centro de informática de la Comunidad Andaluza (CICA) equipada con el sistema operativo Centos 6.0. Para acceder a este servidor se utilizó in intérprete SSH (Secure Shell) y una plataforma virtual vmware vsphere 4.1. El servidor con sistema operativo Ubuntu del centro Pacific National Northwest Laboratory se utilizó durante las estancias realizadas en dicho centro.

La herramienta de Microsoft Office Excel y la de libre acceso R se utilizaron para realizar los análisis estadísticos y las figuras. Los paquetes de R utilizados específicamente para la realización de las figuras fueron ggplot2 v.2.2.0 (Wickham, 2009), ggthemes v3.4.0 (Arnold, 2017) y RColorBrewer v.1.1-2 (Neuwirth, 2014).

III.7.1 Control de calidad de las secuencias

Para la eliminación de las secuencias de baja calidad de los metagenomas completos se utilizaron los programas FastQC v.0.10.1 (Simon Andrews, 2010) y Prinseq v.0.20.3 (Aislabe et al., 2006). La herramienta FastQC permitió evaluar la calidad de las secuencias en bruto, mientras que Prinseq permitió descartar las secuencias o regiones de secuencias con una calidad por debajo de un valor determinado, así como los duplicados.

III.7.2 Contenido en guanina más citosina (G + C) del ADN

El cálculo del contenido en guanina más citosina del ADN se realizó mediante la herramienta “geecee” del paquete de aplicaciones bioinformáticas EMBOSS v.6.5.7.0 (Rice et al., 2000).

III.7.3 Frecuencia de aminoácidos

Para el cálculo de la frecuencia de uso de aminoácidos, se comenzó obteniendo los marcos abiertos de lectura (ORF) localizados en las secuencias mediante el programa Prodigal v.2.6 (Hyatt et al., 2010) en modo metagenómico. Posteriormente se utilizó el lenguaje de programación Perl para descartar las secuencias menores de 100 aminoácidos y calcular el porcentaje de uso de cada aminoácido.

III.7.4 Punto isoeléctrico

Para el cálculo del punto isoeléctrico del proteoma predicho a partir de las secuencias del metagenoma se partió del archivo de salida de Prodigal que contenía las secuencias aminoacídicas de los marcos abiertos de lectura detectados en las secuencias metagenómicas. Un programa en Perl permitió el cálculo del punto isoeléctrico a partir de dicho metaproteoma traducido.

III.7.5 Anotación de secuencias metagenómicas

El proceso de anotación consiste en la identificación de la información biológica contenida en una secuencia (Stein, 2001), que incluye la predicción de genes codificantes de proteínas, ARNr, ARNt, pseudogenes, regiones de control, secuencias de inserción, transposones y otros elementos móviles, y la comparación de las secuencias de estas unidades genómicas con las disponibles en las bases de datos. El resultado de este procedimiento depende, por tanto, de la base de datos utilizada, además de los algoritmos utilizados para la predicción de las citadas unidades genómicas.

En este estudio, la extracción y anotación de los genes ARNr 16S, que se utilizan como reloj molecular para la determinación de la filogenia de organismos procariotas, se realizó mediante el algoritmo BLASTN del paquete BLAST+ (Camacho et al., 2009) en el servidor utilizado por nuestro grupo de investigación y la base de datos de ARNr 16S de arqueas y bacterias RDP v.11.4. Este análisis permite caracterizar la comunidad procariota presente a nivel taxonómico. Se descartaron las secuencias cuya región similar a su secuencia más cercana en RDP abarcaba menos de 100 pb. Para la asignación a nivel de phylum se tomó el límite de similitud en 80 %, mientras que este límite fue situado en 95 % para la asignación a nivel de género (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a; 2014c).

Para su asignación taxonómica, las secuencias de ADN identificadas como genes codificantes de proteínas se enfrentaron a la base de datos de proteínas nr (25/09/2017) utilizando el programa DIAMOND v0.8.24 en modo "sensible". DIAMOND es un programa de alineación de secuencias de 500 a 20 000 veces más rápido que BLAST, por lo que es útil para el análisis de grandes cantidades de datos como los obtenidos en proyectos de secuenciación metagenómica (Buchfink et al., 2014). Posteriormente, la asignación taxonómica de cada secuencia se asignó por el algoritmo Lowest Common Ancestor (LCA) del programa MEGAN v.6 con los parámetros seleccionados por defecto. Este algoritmo no solo tiene en cuenta la secuencia más similar de la base de datos, sino que considera un número determinado de las secuencias de referencia más similares a la secuencia problema para asignar la taxonomía a la secuencia problema. A la secuencia problema se le asignará el nombre del ancestro común a todas las secuencias consideradas en el análisis. La anotación funcional de estas secuencias codificantes de proteínas, una vez traducidas mediante el programa Prodigal en modo metagenómico, se llevó a cabo mediante el programa SUPER-FOCUS (SUBsystems Profile by databases Reduction using FOCUS) v0.26 (Silva et al., 2015). Esta herramienta, identifica los géneros presentes en los datos metagenómicos mediante el programa FOCUS (Silva et al., 2014), para seleccionar y generar a

continuación una base de datos reducida de los subsistemas (categorías SEED) presentes en dichos géneros con CD-HIT (Huang et al., 2010). La alineación de las secuencias problema con la base de datos creada se llevó a cabo mediante RAPSearch2 (Zhao et al., 2012) con los parámetros *e-value* de 10^{-5} , un mínimo de identidad del 60 % y una longitud mínima de alineamiento de 15 aminoácidos. Aunque este programa conserva las categorías SEED de todos los resultados que cumplen con estos parámetros de alineamiento, en este estudio solo se seleccionó el mejor de ellos.

El programa COGNIZER (Bose et al., 2015) se utilizó para anotar COGs en las secuencias metagenómicas. El resultado se empleó para el cálculo de la diversidad funcional capturada por los metagenomas obtenidos.

III.7.6 Ensamblado de secuencias metagenómicas

En el ensamblado, las lecturas metagenómicas cortas se unen en base al solapamiento de secuencia para formar otras más largas denominadas *contigs*. Este proceso puede llevarse a cabo *de novo* (sin ningún tipo de conocimiento previo sobre el/los microorganismos secuenciados) o bien con genomas de referencia (donde se utiliza un genoma filogenéticamente cercano ya secuenciado y ensamblado como guía para este nuevo ensamblado). Por lo general, al obtener un metagenoma de una muestra ambiental no se posee información adecuada de los microorganismos presentes, por lo que en estos casos se lleva a cabo un ensamblado *de novo*. Existen tres estrategias principales de ensamblado *de novo*: *greedy*, Overlap-Layout-Consensus (OLC), y grafos de Bruijn (DBG). Los primeros ensambladores usaban el algoritmo *greedy*, donde se unen las lecturas con mejores solapamientos (siempre que no contradigan la secuencia construida hasta el momento) de forma iterativa. Esto es, se realiza siempre la elección con el mayor beneficio inmediato y no se considera la relación global entre todas las lecturas. El método OLC se basa en la construcción de un gráfico que incluye todas las lecturas metagenómicas e información de su solapamiento entre ellas en forma de nodos y conectores, respectivamente. Los *contigs* se construyen mediante la definición de caminos no ramificados en este gráfico, a partir de los cuales se toma la secuencia consenso de todas las lecturas que lo constituyen. En la tercera estrategia, el proceso comienza por la división de las lecturas en segmentos cortos solapantes de longitud fija (*k-mers*) que se organizan en un gráfico de Bruijn en función de su coocurrencia en las secuencias (Nagarajan & Pop, 2013). Los ensambladores se basan en una o más de estas estrategias. Por lo general, los métodos OLC son más adecuados para el ensamblado de secuencias largas, pero su uso en el ensamblado de secuencias cortas es muy costoso computacionalmente. Aquellos basados en gráficos de Bruijn permiten el ensamblado eficiente de secuencias cortas (Nagarajan & Pop, 2013; Vollmers et al., 2017).

El ensamblado de secuencias metagenómicas mejora la predicción y anotación de genes y permite, en última instancia, la obtención de genomas (*draft genomes*) ambientales, incluyendo los de miembros no cultivados, a partir de las lecturas metagenómicas (van der Walt et al., 2017).

La elección de uno u otro ensamblador depende del tipo de muestra, la tecnología de secuenciación utilizada y los recursos de computación disponibles (Vollmers et al., 2017). En este estudio se utilizaron varios programas: Velvet 1.2.10 y MetaVelvet 1.2.02 (METAgenomic-Velvet assembler) (Afiahayati et al., 2014), Ray Meta v2.3.1 (Boisvert et al., 2012), SPAdes v3.7.1 (St. Petersburg genome assembler) (Bankevich et al., 2012), IDBA-UD v.1.1.1 (Iterative De Bruijn graph Assembler for Short Sequencing data with Highly uneven Sequencing Depth) (Peng et al., 2010), MEGAHIT v1.05 (Li et al., 2015), que utilizan grafos de Bruijn, y Newbler 2.9, un ensamblador de tipo OLC creado por la compañía que comercializaba la tecnología de pirosecuenciación (Margulies et al., 2006).

El ensamblaje de lecturas de secuenciación se ve dificultado por factores inherentes a la secuencia original como la frecuencia y longitud de las secuencias repetitivas, o al método de secuenciación elegido, como los errores de identificación de bases característicos de cada tecnología de secuenciación o la generación de una cobertura no uniforme por razones arbitrarias (Miller et al., 2010). En el caso del ensamblado de secuencias metagenómicas, a estas dificultades se suman otras derivadas de la complejidad de la comunidad microbiana, en forma de riqueza de taxones y equitatividad de su abundancia, y del volumen de datos obtenido en cada proyecto de secuenciación ambiental, componentes que en muchos casos desafía los algoritmos creados para el ensamblaje de genomas individuales y la capacidad de computación disponible por los grupos de investigación (Quince et al., 2008; Nagarajan & Pop, 2013; Olson et al., 2017; Hitch & Creevey, 2018). Dado que la cobertura de las secuencias genómicas de los taxones dominantes es mayor que la de las especies menos abundantes, el ensamblado de secuencias metagenómicas da lugar, por lo general, a la reconstrucción de secuencias genómicas de las primeras (Rusch et al., 2007; Miller et al., 2010; Hitch & Creevey, 2018). Simulaciones indican que el ensamblado a partir de muestras complejas es susceptible de formación de quimeras (secuencia consenso resultado de unir dos lecturas procedentes de microorganismos diferentes) (Mavromatis et al., 2007). Además, el ajuste de los parámetros de solapamiento (similitud y longitud de la región solapada, porcentaje de secuencia que solapa, modo de actuación frente a elementos repetitivos, elección del valor de *k-mer*, condiciona la obtención de faltos positivos (secuencias quiméricas), si los parámetros son muy laxos, o la pérdida de información, en caso contrario. Por todo ello es necesario evaluar el resultado de este proceso de ensamblaje (Olson et al., 2017). Sin embargo, la determinación del grado de corrección de un ensamblaje es complicado ya que el resultado correcto suele ser desconocido (Nagarajan & Pop, 2013). Comúnmente se considera un buen resultado aquel que maximiza la precisión (que, en este caso, en el que no se conoce el resultado, se traduce en aquel que contiene el menor número de errores de ensamblaje e indeterminaciones) y el tamaño final del ensamblado (usando el mayor número posible de lecturas para dar lugar a *contigs* lo más largos posible) (Miller et al., 2010; van der Walt et al., 2017). Los parámetros más comúnmente utilizados para evaluar estas propiedades en un resultado de ensamblaje es el N50 (definido como la longitud del *contig* más pequeño contenido en el grupo de *contigs* más largos que contienen el 50 % del total de bases del ensamblaje), el porcentaje de lecturas o bases incluidas en los *contigs* obtenidos, cantidad de errores de ensamblaje y número o densidad de ORFs en los *contigs* obtenidos como resultado (Miller et al., 2010; Nagarajan & Pop, 2013; Olson et al., 2017). En esta Tesis Doctoral, se utilizó el programa QUAST v2.3 (Gurevich et al., 2013) para el

cálculo de todos esos parámetros a partir del resultado de cada uno de los ensambladores utilizados. La cobertura también puede ser utilizada para identificar errores de ensamblado (Nagarajan & Pop, 2013), por lo que en este estudio, se utilizó el programa IGVviewer para identificar *contigs* con cobertura irregular (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

III.7.7 Extracción de genomas a partir de metagenomas

Aunque la anotación frente a bases de datos de referencia de los fragmentos de ADN metagenómicos permite explorar la diversidad filogenética y funcional de la comunidad microbiana objeto de estudio, el establecimiento del origen taxonómico de estos genes funcionales es complejo, dado que las secuencias metagenómicas pueden pertenecer a múltiples genomas (Papudeshi et al., 2017). Por otra parte, los análisis ecológicos y evolutivos solo pueden llevarse a cabo con datos genómicos (Hugerth et al., 2015). Además, tras la anotación, las secuencias no relacionadas con las presentes en las bases de datos permanecen sin identificar (Papudeshi et al., 2017). Las técnicas de *binning* permiten agrupar las secuencias metagenómicas relacionadas filogenéticamente. De esta manera, los grupos, *bins* o MAGs (*Metagenome-Assembled-Genomes*) que resultan de este proceso pueden representar especies individuales o un phylum completo en función de la complejidad de la muestra, por lo que generalmente se considera el “genoma poblacional” de un conjunto de especies relacionadas (Wang et al., 2012b; Sangwan et al., 2016). El *bin* o MAG ideal contiene el 100 % de la información del genoma compuesto microbiano, además de tener mínima variación de contenido en G+C y diversidad de especies (Papudeshi et al., 2017). Las comunidades microbianas con una baja diversidad taxonómica y una alta cobertura de taxones filogenéticamente distintos resultan en MAGs de alta calidad. Si la divergencia entre especies presentes en el metagenoma es pequeña, la reconstrucción de bins será difícil dada la similitud de sus genomas (Papudeshi et al., 2017). Por ello, la extracción de genomas ambientales de metagenomas de suelo, donde la diversidad es alta y la cobertura por lo general insuficiente, es complicada (Nesme et al., 2016).

Existen métodos de *binning* supervisados y no supervisados (Wang et al., 2012b). En los primeros, las secuencias metagenómicas se alinean con los genomas presentes en las bases de datos y se agrupan las que se asemejan a un determinado taxón (McHardy et al., 2006; Brady & Salzberg, 2009). Dado que el 99 % de los microorganismos encontrados en muestras ambientales son desconocidos y/o no han podido obtenerse en cultivo puro (Amann et al., 1990; Eisen, 2007), una gran proporción de secuencias quedarán sin agrupar mediante este método. Los métodos no supervisados hacen uso de una o varias características intrínsecas de las secuencias, como el contenido en G+C (Karlin et al., 1997), la frecuencia de *k-mers* (frecuentemente, de tetranucleótidos) (Pride et al., 2003; Teeling et al., 2004; Cleary et al., 2016) y la cobertura de los contigs en una muestra o la variación de la misma entre varias muestras (Albertsen et al., 2013; Imelfort et al., 2014). Este segundo método de *binning* permite la reconstrucción de genomas de taxones cultivados y no cultivados, pudiendo incluir en ellos secuencias sin homología a las depositadas en las bases de datos, así como la determinación del origen taxonómico de los genes funcionales identificados.

En este estudio, el agrupamiento de *contigs* (≥ 500 nt) resultado del coensamblaje de SMO1 y SMO2 relacionados filogenéticamente se llevó a cabo mediante los programas CONCOCT (Alneberg et al., 2014), MaxBin (Wu et al., 2016) y MetaBAT (Kang et al., 2015), que utilizan frecuencia de *k-mers* y cobertura de los contigs en varias muestras, y VizBin, cuyo algoritmo está basado en la frecuencia de *k-mers* y permite añadir capas de información tales como contenido en G+C, longitud de las secuencias, cobertura o información taxonómica, entre otras. Ésta última herramienta permite al investigador, en función de todos los parámetros antes citados, seleccionar visualmente el grupo de *contigs* que desea agrupar en *bins* y revisar el resultado de otro programa de *binning* (Laczny et al., 2015). El programa CheckM (Parks et al., 2015) fue utilizado para evaluar el porcentaje del genoma recuperado, así como la variación del contenido en G+C, la contaminación con secuencias de otros grupos y la diversidad (riqueza) de especies presentes en dicho genoma poblacional.

III.7.8 Estimación de la posición filogenética de los genomas extraídos

La posición filogenética de los genomas extraídos de los metagenomas de suelo que se encontraban más de un 40 % completos se llevó a cabo mediante la construcción de un árbol filogenético con FastTree v.2.1.3 (Price et al., 2010) a partir de la concatenación del grupo de genes conservados determinados por PhyloSift v.1.0.1 (Darling et al., 2014) de dichos genomas ambientales y genomas de referencia obtenidos de la base de datos Refseq v.81 de NCBI (O'Leary et al., 2016). La relación con toras especies descritas con genoma disponible en las bases de datos puede también estimarse mediante el cálculo del parámetro ANI (Average Nucleotide Identity), que se relaciona directamente con los resultados de experimentos hibridación ADN-ADN que muestran la relación entre especies (Goris et al., 2007). Mientras que en la hibridación ADN-ADN el límite para la delineación de especies se sitúa en el 70 %, el límite equivalente de valores de ANI es del 95 %, valor que indica la proporción de alineamiento entre regiones codificantes de los dos genomas estudiados (Goris et al., 2007). En esta Tesis Doctoral, el valor de ANI se obtuvo utilizando el programa OrthoANu descrito por Yoon y colaboradores, que utiliza el algoritmo USEARCH para la alineación de las secuencias (Yoon et al., 2017).

III.7.9 Anotación de los genomas extraídos

Los genomas extraídos del metagenoma completos en más de un 40 % se sometieron a una anotación automática online en el servidor de RAST v.2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al., 2008), utilizando el protocolo de anotación RASTtk (Brettin et al., 2015). El archivo de entrada de RAST es un archivo multi-FASTA con los contigs del mismo. RAST identifica los ORFs y los anota basándose en los subsistemas SEED (III.6.2). La anotación puede ser visualizada, comparada con la de otros genomas en la misma plataforma de RAST. Se trata de un anotador automático que permite la mejora del resultado mediante la anotación manual de genes específicos (Edwards & Holt, 2013; Brettin et al., 2015).

III.7.10 Reclutamiento de genomas

Con el objetivo de determinar el número y la identidad de las secuencias de un metagenoma similares a las de un genoma determinado, se realizó una búsqueda mediante el programa

BLAST de las secuencias metagenómicas con un mínimo de un 70 % de identidad al genoma en cuestión. Para la representación gráfica de este resultado, el número de lecturas reclutadas por un genoma fue normalizado por el tamaño de la base de datos metagenómica.

III.7.11 Análisis bioinformático de amplicones

Las lecturas obtenidas de la secuenciación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S fueron analizadas con diferentes programas bioinformáticos según el estudio realizado, atendiendo a las metodologías puestas a punto por los grupos de investigación con los que se llevó a cabo cada uno de ellos.

Para la evaluación de la distribución espacial de la comunidad procariota en suelos salinos de las Marismas del Odiel (Capítulo II), el control de calidad de las secuencias y el proceso de deduplicación fueron llevados a cabo mediante el programa sdm (simple demultiplexer) (Hildebrand et al., 2014), mientras que la identificación de secuencias quiméricas *de novo* se realizó con VSEARCH (Rognes et al., 2016). El *clustering* o agrupación de secuencias según su relación filogenética en OTUs (*Operational Taxonomic Units*) fue llevado a cabo mediante swarm (Mahé et al., 2014), utilizando un límite de similitud de 97 %. La anotación se realizó con el programa LAMBDA (Hauswedell et al., 2014) y las bases de datos SILVA (Quast et al., 2013) y Greengenes (DeSantis et al., 2006). Para decidir la identidad de las secuencias a partir de la anotación de las mismas con las bases de datos citadas se utilizó el algoritmo LCA implementado en el programa hundo. El árbol filogenético de los grupos identificados fue calculado con FastTree 2.

El análisis de los archivos resultantes del proceso anterior se realizó en R v.3.2.0 para Windows (R Core Team, 2015). El paquete tydir v.0.6.0 (Wickham, 2016) se utilizó para transformar los datos entre los distintos formatos requeridos por cada función en R. El paquete phyloseq v.1.14.0 (McMurdie & Holmes, 2013) se empleó para filtrar y analizar la tabla de OTUs, el árbol filogenético y el archivo de metadatos. Las muestras con menos de 4.000 secuencias y las secuencias únicas (*singletons*) o asignadas al dominio *Eukarya* se descartaron del análisis. A continuación, se seleccionaron las secuencias que aparecían al menos en un 20 % para reducir el número de grupos taxonómicos minoritarios en los subsiguientes análisis. La normalización de los valores de abundancia de OTUs en cada muestra (tabla de OTUs) previa a la aplicación de los índices de diversidad se llevó a cabo utilizando el paquete DESeq2 v.1.22.1 (Love et al., 2014).

Los amplicones secuenciados en el experimento de marcaje con H₂O¹⁸ fueron analizados con el *pipeline* de VSEARCH (Rognes et al., 2016), incluyendo los pasos de filtrado de secuencias de baja calidad, deduplicación, identificación de quimeras *de novo* así como utilizando la base de datos SILVA v.132 dereplicada al 99 % y generación de OTUs mediante agrupación de las secuencias similares en más de un 97 %. La anotación se llevó a cabo mediante el script `assign_taxonomy.py` del *pipeline* QIIME v.1.9 frente a la base de datos SILVA v.132 de bacterias y arqueas. La tabla de OTUs se analizó en R v.3.2.0, utilizando los paquetes phyloseq v.1.14.0 y ampvis2 v.2.3.11.

III.7.12 Determinación de la diversidad

III.7.12.1 Alfa diversidad

El concepto de alfa diversidad fue introducido por Whittaker en 1972 como la riqueza (número de taxones diferentes) de un ecosistema (Whittaker, 1972). Sin embargo, este concepto ha evolucionado de tal manera que en la actualidad representa tanto la riqueza como la equitatividad (proporción en la que cada uno de los taxones presentes aparece) de la comunidad estudiada. Los análisis de alfa diversidad son útiles para examinar los patrones de dominancia, rareza o complejidad de la comunidad. Diversos índices de alfa diversidad pueden ser utilizados para estimar estos parámetros. En este estudio se utilizaron el número de taxones observados y el índice de diversidad de Shannon.

Número de taxones o grupos observados

Representa el número de especies o grupos funcionales diferentes observados en la muestra.

Índice Chao 1

Éste índice refleja la predicción del número de especies presentes en una muestra por extrapolación del número de organismos poco abundantes que podrían no haber sido obtenidos debido a un muestreo (o secuenciación, en este caso) insuficiente (Chao, 1987).

Índice de Shannon o Shannon-Wiener (H')

El índice de Shannon considera tanto el número como la equitatividad de las especies presentes. Los valores de este índice suelen oscilar entre 0,5 y 5, y, aunque no tiene límite superior, una comunidad se considera diversa cuando este valor es superior a 3. La fórmula del índice de Shannon es la siguiente (Shannon & Weaver, 1949):

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde

S – número de especies (riqueza)

p_i – proporción de individuos de la especie i respecto del total de individuos; esto es, la abundancia relativa de la especie i , n_i/N

n_i – número de individuos de la especie i

N – Número de todos los individuos de todas las especies

Aunque generalmente estos índices se han utilizado para caracterizar la diversidad específica, pueden aplicarse a otras características de la comunidad o niveles taxonómicos (Krause et al., 2008). Para la realización de la diversidad filogenética y funcional de los metagenomas completos, el índice Chao 1 a nivel de género y el número de grupos (COGs) observados, respectivamente, se calcularon mediante la función `alpha_diversity.py` del paquete QIIME.

Todos estos índices se calcularon a nivel de OTUs sin aplicación previa de ningún tipo de normalización o rarefacción en el caso del análisis de amplicones, haciendo uso de la función “`estimate_richness`” disponible en el paquete de R `phyloseq`.

III.7.12.2 Beta diversidad

La beta diversidad hace referencia a la variación de la composición en especies de dos muestras, medida que puede ser tratada como una distancia. Whittaker la definió como “el grado del reemplazo de especies o el cambio biótico a lo largo de gradientes ambientales” (Whittaker, 1972). Los índices de beta diversidad son útiles, pues, para relacionar la estructura espacial de las comunidades microbianas con los procesos ecológicos (Ricotta, 2017). Estos índices pueden, por lo general, considerar tan solo la ausencia o presencia de especies en las muestras estudiadas, de forma que son índices binarios o no ponderados, o tener en cuenta también la abundancia de los mismos en el caso de los ponderados.

El índice utilizado para el cálculo de la beta diversidad en este trabajo fue el de disimilitud de Bray-Curtis ponderado, cuya fórmula se expone a continuación:

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$$

donde

C_{ij} – suma del menor valor de abundancia observado de todas las especies compartidas entre las dos muestras comparadas

S_i – número total de especies presentes en la muestra i

S_j – número total de especies presentes en la muestra j

Los valores de este índice se sitúan entre 0 y 1, donde el valor 0 indica que las dos muestras estudiadas tienen la misma composición. Éste índice fue calculado mediante la función `vegdist` del paquete de R `vegan`.

III.7.13 Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las muestras tomadas a diferente profundidad (superficie/subsuperficie) se realizaron pruebas de Student entre los dos grupos. Las diferencias estadísticamente significativas de estas propiedades entre los

puntos de muestreo fueron evaluadas mediante pruebas ANOVA combinadas con pruebas de Tukey HSD. Se utilizaron correlaciones de Pearson para establecer las interrelaciones entre los parámetros fisicoquímicos. En todos los casos, los p-valores fueron ajustados por el número de comparaciones realizadas según Bonferroni y el nivel de significancia establecido en $p=0,05$.

Las curvas de rarefacción de la diversidad filogenética y funcional detectada en los metagenomas completos se calcularon mediante el uso de las herramientas `multiple_rarefactions.py`, `alpha_diversity.py`, `collate_alpha.py` y `make_rarefactions_plots.py` del paquete QIIME v.1.9.1, a partir de las anotaciones de las secuencias detalladas en la sección III.7.5 y utilizando como medidas de diversidad el índice Chao 1 y el número de categorías COGs detectadas, respectivamente.

La evaluación de las diferencias a nivel de alfa diversidad entre las muestras de diferente profundidad se utilizó la prueba no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (Mann & Whitney, 1947) y la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) fue empleada para realizar comparaciones entre los distintos lugares de muestreo. La normalidad de la distribución de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk (Shapiro 1965). Estas pruebas estaban disponibles como funciones básicas de la versión de R utilizada. La correlación de los valores de alfa diversidad con los parámetros fisicoquímicos se llevó a cabo mediante la función `corr.test` del paquete `psych`, obteniendo valores de correlación de Pearson. La corrección de Bonferroni fue aplicada mediante la función `dunn.test` del paquete de R `dunn.test`. La significancia fue determinada con un intervalo de confianza del 95 % ($p=0,05$).

El análisis de ordenación basado en Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, del inglés *Non-Metric Multidimensional Scaling*) se llevó a cabo para representar las relaciones entre muestras basadas en los índices de Bray-Curtis. Para ello se utilizó la función `metaMDS` del paquete `vegan` (Oksanen et al., 2017) en R. La función `envfit` del mismo paquete fue empleada para superponer las relaciones de los parámetros fisicoquímicos con los ejes de representación del NMDS. Solo se mostraron en el gráfico los parámetros significativamente correlacionados tras la aplicación de la corrección de Bonferroni al resultado de la función `envfit`. La función `PERMANOVA` (Anderson, 2008) del paquete de R `vegan` permitió evaluar la contribución de cada factor (profundidad o lugar de muestreo) y cada parámetro fisicoquímico en la variación de la comunidad microbiana entre muestras.

La función `indval` del paquete `labdsv` (Roberts, 2016) se utilizó para realizar el análisis de especies indicadoras de Dufrêne-Legendre (Dufrêne & Legendre, 1997). Mediante este análisis se trata de identificar qué especies son indicadoras de diferentes tipos de muestras (procedentes de diferentes puntos de muestreo o profundidades, en este caso). El valor indicador de cada especie en los diferentes grupos se calcula como el producto de la frecuencia relativa y abundancia media relativa de éstas en los grupos considerados.

El análisis estadístico de los datos de secuenciación obtenidos en el experimento de marcaje con isótopos estables también se llevó a cabo en R. La función `amp_ordinate` del paquete `ampvis2` v2.3.11 fue utilizada para realizar el análisis multidimensional de componentes

principales (PCA) basado en el índice de Bray-Curtis. Para ello, previamente se aplicó la transformación de Hellinger a la tabla de ocurrencia de OTUs. Las diferencias entre tratamientos observadas en la ordenación fueron evaluadas mediante las pruebas ANOSIM (ANalysis of SIMilarities), incluida en las funciones básicas de R, y PERMANOVA, como la función `adonis2` del paquete `vegan`.

III.7.14 Depósito de las secuencias en bases de datos públicas

Las lecturas obtenidas de los metagenomas completos SMO1 y SMO2, así como los genomas extraídos a partir de ellos se depositaron en DDBJ/ENA/Genbank en el proyecto PRJNA318875.

Los datos de secuenciación de amplicones obtenidos para el análisis de la influencia de la salinidad en la estructura de la comunidad procariota de los suelos salinos de las Marismas del Odiel se depositaron en la misma base de datos bajo el proyecto PRJNA378479.

IV. RESULTADOS

IV.1 CAPÍTULO I

Con el objetivo de caracterizar filogenética y funcionalmente la comunidad procariota de suelos salinos localizados en las Marismas del Odiel, se procedió a la obtención, secuenciación y análisis de dos bases de datos metagenómicas de estos suelos.

IV.1.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

Las características fisicoquímicas de las dos muestras obtenidas durante los muestreos de octubre de 2013 y noviembre de 2014 (designadas como SMO1 y SMO2, respectivamente) se recogen en la Tabla 1.

El suelo mostraba una textura francoarenosa, de acuerdo con la clasificación textural propuesta por USDA (Soil Survey Staff, 2010). El pH del suelo muestreado variaba de moderadamente básico en octubre de 2013 (7,8) a básico en noviembre de 2014 (8,9), La humedad del suelo en los dos momentos de muestreo fue baja (<15 % v/v), por lo que en ellos probablemente predominan los procesos oxidantes. El valor de la conductividad eléctrica ($CE_{1:5}$), fue de 24 dS/m en SMO1 y 54,5 dS/m para SMO2. Dado que los límites de conductividad establecidos para evaluar la salinidad del suelo se refieren a esta medida en el extracto de pasta saturada (CE_e) – un método costoso y laborioso que requiere experiencia previa para su correcta realización –, la relación propuesta por He y colaboradores (He et al., 2013) fue utilizada para obtener los valores de CE_e a partir de los obtenidos en el extracto 1:5 p/v. De esta manera constatamos que, el suelo objeto de estudio poseía características de suelos salinos en los dos momentos de muestreo, sugiriendo que la alta concentración de sales no es un rasgo transitorio de los mismos, sino permanente, al menos durante la época de muestreo escogida. En relación con la literatura existente sobre suelos salinos desde el punto de vista microbiológico, las muestras consideradas en este estudio poseen conductividades similares a las de los suelos de Qarhan Salt Lake (China) estudiados por Xie y colaboradores (Xie et al., 2017), los de la Sal del Rey (Texas) (Hollister et al., 2010a), suelos salinos de Sicilia (Canfora et al., 2014), y los localizados en el desierto del Kutch en Gujarat (India) (Pandit et al., 2015) y el antiguo lago Texcoco (México) (Pandit et al., 2015), considerando el resto de los trabajos existentes conductividades más bajas.

El contenido en carbono orgánico se sitúa en el rango encontrado en suelos salinos de La Sal del Rey (Hollister et al., 2010a) y Sicilia (Canfora et al., 2014) y el contenido en nitrógeno es similar al de los suelos salinos estudiados por Hollister y colaboradores (Hollister et al., 2010a) y Pandit y colaboradores (Pandit et al., 2015). Con respecto al contenido en metales, que evaluamos en estos suelos debido a las altas concentraciones de estos elementos encontrados en sedimentos de las Marismas del Odiel por diversos autores (Beltrán et al., 2010; Hierro et al., 2014), no superan en este caso los valores legales para la considerarlos contaminados.

Dada la dificultad de medir estos parámetros en la solución del suelo, los valores mostrados en la Tabla 1 corresponden a las medidas en distintos extractos agua: suelo,

Al poseer una mayor proporción de solvente por unidad de suelo, los valores obtenidos en ellos pueden sobreestimar las concentraciones reales en la solución del suelo (Rhoades et al., 1999). Por otro lado, la característica estructura heterogénea del suelo da lugar a la formación de micronichos con condiciones fisicoquímicas particulares, más diversas cuanto menor conexión exista entre ellos, esto es, cuanto menor sea el contenido en agua del suelo (Carson et al., 2010; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013; Tecon & Or, 2017). Además, la cantidad de agua presente en un suelo modula la biodisponibilidad y el transporte de los compuestos solubles en él (Tecon & Or, 2017). Así, la humedad relativa del suelo juega un papel relevante en la evaluación de los niveles y variación de estrés osmótico, concentración de nutrientes o compuestos tóxicos que se encuentran en el entorno directo de la comunidad de microorganismos objeto de estudio.

IV.1.2 Características generales de las bases de datos metagenómicas

La Tabla 7 muestra algunas características generales, como el número y longitud media de las secuencias, de las bases de datos metagenómicas analizadas en este estudio, así como el tipo de hábitat del que fueron obtenidas, su salinidad y pH. Como referencia, se incluyeron en este estudio varios metagenomas de ambientes hipersalinos acuáticos obtenidos mediante la misma tecnología que las bases de datos de suelos secuenciadas durante esta Tesis Doctoral. Entre éstos se encuentran los estanques de salinidades 13, 19, 33 y 37 % NaCl (SS13, SS19, SS33 y SS37, respectivamente) de las salinas Bras del Port, en Santa Pola, Alicante (España), que constituyen uno de los ambientes hipersalinos mejor conocidos desde el punto de vista microbiológico (Ventosa et al., 2014) y que fueron estudiadas por nuestro grupo de investigación en colaboración con el del Dr. Rodríguez-Valera de la Universidad de Alicante (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a). Incluimos también la base de datos denominada IC21 y correspondiente a un estanque de salinidad 21 % NaCl de las salinas de Isla Cristina (Huelva), obtenida mediante el mismo proceso de extracción y secuenciación e igualmente estudiadas por nuestro grupo de investigación con anterioridad (Fernández et al., 2014b; 2014c). Con el objetivo de minimizar los sesgos derivados del uso de diferentes programas para el análisis bioinformático de las bases de datos, y de validar los métodos utilizados en esta Tesis Doctoral, todos los metagenomas se analizaron de manera paralela haciendo uso de la misma metodología.

Cabe destacar la mayor longitud de las lecturas de los metagenomas de suelo, a pesar de estar obtenidos mediante la misma tecnología, como consecuencia del avance de la tecnología de pirosecuenciación en el período de tiempo entre la obtención de las primeras y las últimas bases de datos.

Tabla 6. Características fisicoquímicas de las dos muestras de suelo salino, designadas como SMO1 y SMO2.

Parámetro	Unidades	SMO1	SMO2
pH _{1:2,5}	-	7,80	8,90
CE _{1:5}	dS/m	24,00	54,50
Humedad relativa	%	14,70	6,90
Materia orgánica	mg/kg	2590,00	2342,00
Carbono orgánico	mg/kg	N.D.	13 590,00
Carbono total	mg/kg	N.D.	17 640,00
Nitrógeno total	mg/kg	1070	890,00
Nitrógeno orgánico	mg/kg	N.D.	780,00
Amonio	mg/kg	N.D.	3,03
Nitrito	mg/kg	N.D.	0,04
Nitrato	mg/kg	N.D.	257,00
Sulfato	%	1,35	6,68
Fósforo	%	3,10	22,76
Cloruros	%	0,93	14,16
Sodio	%	2,95	8,60
Magnesio	%	0,13	0,88
Calcio	%	0,27	1,32
Potasio	%	0,56	0,12
Cobre	mg/kg	N.D.	74,10
Zinc	mg/kg	N.D.	84,40
Aluminio	mg/kg	N.D.	5,20
Arsénico	mg/kg	N.D.	11,50
Cadmio	mg/kg	N.D.	0,10
Mercurio	mg/kg	N.D.	B.L.D.
Plomo	mg/kg	N.D.	16,80

N.D. – No determinado; B.L.D. – Por debajo del límite de detección.

Tabla 7. Características generales de las bases de datos de ambientes hipersalinos analizadas en este estudio.

Base de datos	Hábitat	Conductividad/salinidad	pH	Nº de secuencias	Longitud media de secuencia (pb)	Referencia
SMO1	Suelo salino	24,0 dS/m	7,8	1 289 630	628	(Vera-Gargallo & Ventosa, 2018; Vera-Gargallo et al., 2018)
SMO2	Suelo salino	54,4 dS/m	8,9	839 941	629	
SS13	Salina	13 % NaCl	8,0	1 481 803	305	(Fernández et al., 2014a)
SS19	Salina	19 % NaCl	8,0	1 241 633	361	(Ghai et al., 2011)
SS33	Salina	33 % NaCl	7,0	963 381	367	(Fernández et al., 2014a)
SS37	Salina	37 % NaCl	7,1	736 936	417	(Ghai et al., 2011)
IC21	Salina	21 % NaCl	7,5	1 191 373	397	(Fernández et al., 2014b; 2014c)

IV.1.3 Rasgos halofílicos de las bases de datos metagenómicas

Varios rasgos genómicos, como un proteoma ácido y un alto contenido en GC, han sido propuestos como adaptaciones fisiológicas de los microorganismos halófilos a hábitats con altas concentraciones de sal (Paul et al., 2008; Barberán et al., 2012). Estas características han sido utilizadas con anterioridad en estudios metagenómicos para realizar una caracterización inicial de la microbiota de estos ambientes (Kunin et al., 2008; Rodríguez-Brito et al., 2010; Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a; 2014c). En este estudio se analizan el punto isoeléctrico, la frecuencia de aminoácidos y el contenido en GC de las bases de datos obtenidas de suelos salinos en relación a los resultados de los metagenomas de referencia.

En la Figura 16 se puede observar la predominancia de aminoácidos ácidos en el metaproteoma traducido a partir de las secuencias metagenómicas de las bases de datos de suelos salinos. Todas las bases estudiadas muestran un perfil bimodal con un pico de punto isoeléctrico bajo (alrededor de 4) y otro de alto pI (aproximadamente 10). En las bases de datos acuáticas se observa un aumento del porcentaje de aminoácidos ácidos a medida que aumenta la salinidad, mientras que los perfiles del metaproteoma de suelos salinos no siguen la misma tendencia. Éstos se sitúan entre los de las bases de datos SS33, SS37 e IC21 y los menos salinos SS13 y SS19. Una alta proporción de aminoácidos ácidos aspartato y glutamato con respecto a los cargados positivamente ha sido observada en el proteoma de la mayoría de los

microorganismos con estrategia de osmoadaptación *salt-in* (Lanyi, 1974; Kastritis et al., 2007; Paul et al., 2008; Elevi Bardavid & Oren, 2012b). Inicialmente propuesto como mecanismo necesario mantener la maquinaria celular activa en el medio intracelular con alta concentración de cargas positivas que poseen estos organismos, esta relación no está clara actualmente (Oren, 2013b; Czech & Bremer, 2018). Los organismos con estrategia *salt-out*, e incluso los marinos, poseen también una mayor representación de aminoácidos ácidos frente a básicos, aunque este desbalance es menos acusado que en el caso de los organismos con estrategia *salt-in* (Elevi Bardavid & Oren, 2012b).

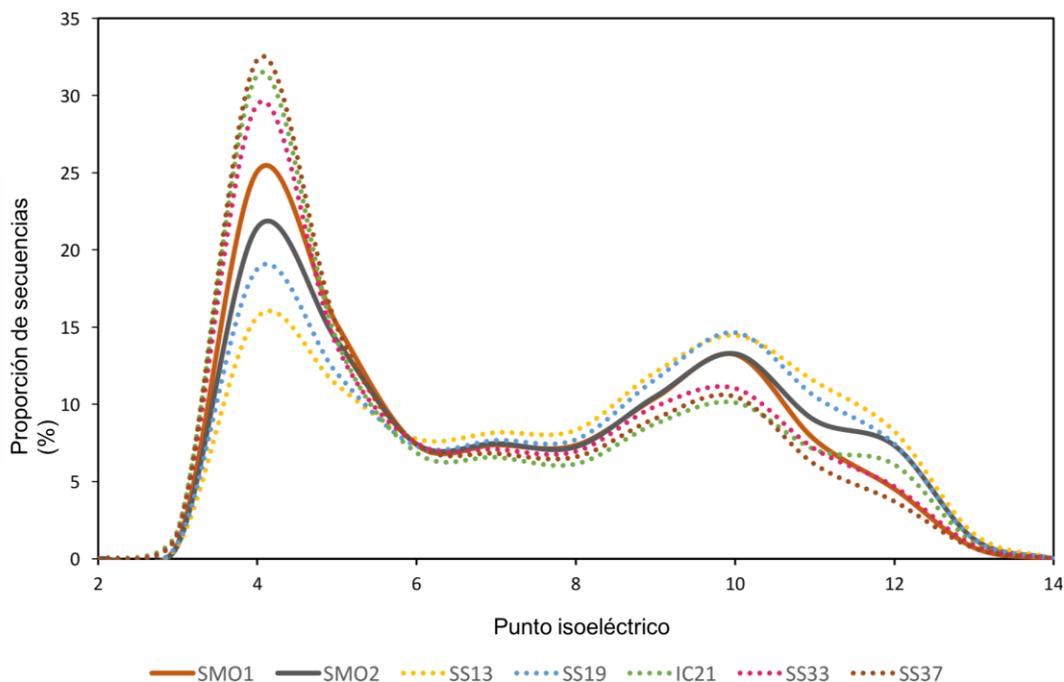


Figura 14. Punto isoeléctrico del proteoma traducido a partir de las secuencias de las bases de datos metagenómicas de suelo y de referencia, mostrado como el porcentaje del total de secuencias.

Además de una predominancia de aminoácidos ácidos frente a básicos, también se ha observado en las proteínas de microorganismo halófilos una tendencia al uso del aminoácido básico arginina frente a lisina (Thanki et al., 1988; Fukuchi et al., 2003)(Figura 17). El patrón de uso de aminoácidos observado en SMO1 y SMO2 es también muy similar al detectado en las bases de datos de ambientes hipersalinos acuáticos y sigue estas dos tendencias. El uso preferencial de arginina frente a lisina podría deberse al diferente contenido en GC de los codones asociados a cada uno de los dos aminoácidos. Los microorganismos halófilos suelen poseer un alto valor de GC y, dado que los codones codificantes de lisina (AAA y AAG) tienen un sesgo hacia nucleótidos AT y la arginina es codificada por los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG, el último se encontraría favorecido en estos organismos (Rhodes et al., 2010).

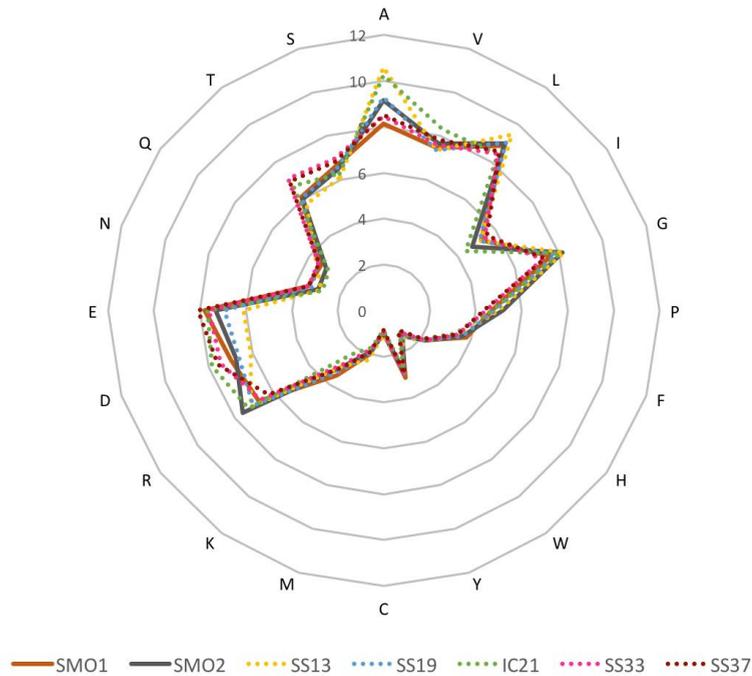


Figura 15. Frecuencia de uso de aminoácidos determinada a partir del metaproteoma traducido de las bases de datos SMO1, SMO2, SS13, SS19, IC21, SS33 y SS37.

En cuanto al contenido en GC de las secuencias metagenómicas de suelos salinos, se observó una distribución bimodal similar al de las bases de datos procedentes de estanques de salinas (Figura 18). La mayoría de los halófilos extremos, como los miembros de la clase *Halobacteria* (*Euryarchaeota*) y del género bacteriano *Salinibacter* se caracterizan por poseer un alto contenido en GC, rasgo que ha sido propuesto como protector contra la formación de dímeros de timidina inducidos por los radiación ultravioleta que sufren la mayoría de los ambientes hipersalinos en los que habitan; aunque existen excepciones de arqueas de este grupo que poseen un bajo GC, como los miembros del género *Haloquadratum*, con un contenido en GC de 47,9 %. Mientras que los dos picos del perfil de GC principales en las bases de datos de estanques de salinas (~48 y 65 %) estaban bien definidos y correspondían a los valores de GC determinados para *Haloquadratum* (47,9 %) y otros miembros de la familia *Halobacteria* (60-70 %), coincidiendo su altura con la abundancia de cada uno de ellos en las distintas bases de datos, los picos de GC observados en las bases de datos de suelos son más amplios y se encuentran peor definidos. Dado que el contenido en GC es un rasgo taxonómico, de manera que taxones filogenéticamente cercanos poseen contenidos en GC similares, estos resultados sugieren que la comunidad microbiana de los suelos presenta una mayor diversidad taxonómica que las bases de datos acuáticas. Además, el pico de bajo GC observado en los metagenomas de suelos no coincide con el del género *Haloquadratum*, sino que podría corresponder secuencias relacionadas con otros taxones halófilos o halotolerantes de bajo GC como el phylum candidato *Nanohaloarchaeota*, miembros del filo *Bacteroidetes*, *Firmicutes* o de la familia *Balneolaceae*. El pico de alto GC, por otro lado, está en consonancia con el contenido

en GC de microorganismos halófilos pertenecientes a las familias *Halobacteria*, *Rhodotermaceae* y al filo *Actinobacteria*.

Dada la naturaleza heterogénea del suelo, que propicia la existencia de microhábitats con distintas condiciones fisicoquímicas (especialmente en suelos con baja contenido en agua)(Tecon & Or, 2017), y a pesar de las altas concentraciones de sales encontradas en éstos, no podemos descartar que una fracción de las secuencias pertenezcan a microorganismos no halófilos. Esto ha sido anteriormente observado por otros autores en suelos salinos de Sicilia, India y China (Canfora et al., 2014; Pandit et al., 2015; Xie et al., 2017; Narayan et al., 2018; Zhao et al., 2018).

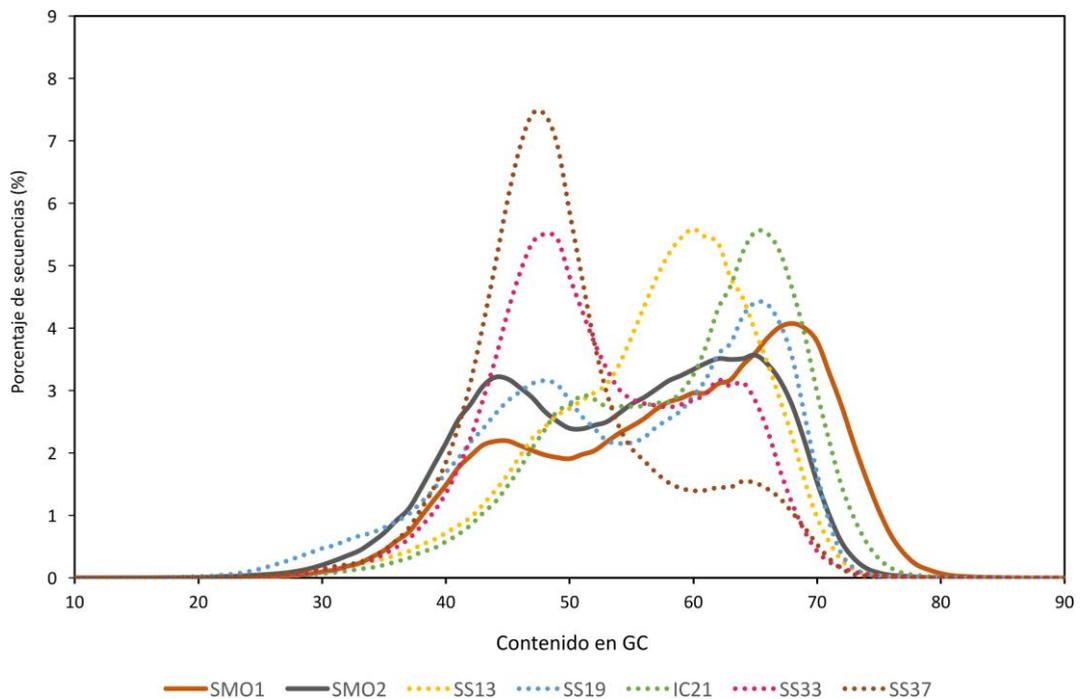


Figura 16. Perfil de contenido en GC de las secuencias de las bases de datos SMO1, SMO2, SS13, SS19, IC21, SS33 y SS37.

IV.1.4 Estimaciones de alfa-diversidad

Con el objetivo de evaluar el grado de diversidad filogenética y funcional capturados en este estudio, del total presente en estos suelos, se llevaron a cabo las curvas de rarefacción que pueden ser observadas en las Figuras 4A y B. La inclusión de las bases de datos de referencia en estos análisis permitió la comparación de la diversidad presente en suelos frente a la determinada para los ambientes acuáticos hipersalinos. Con respecto a la diversidad filogenética, valorada a partir del índice de riqueza Chao 1 basada en la anotación a nivel de especie de las lecturas metagenómicas, el valor para los suelos salinos se encontraba en el rango de las bases de datos acuáticas más diversas y con menor concentración de sales, SS13 y SS19 (Figura 19A). A nivel funcional, el análisis de rarefacción basado en la anotación de categorías

COGs en las secuencias metagenómicas mostró que los suelos salinos poseían una mayor diversidad funcional (Figura 19B). Estos resultados son coherentes con los estudios que indican que los suelos constituyen uno de los ambientes más diversos de la Tierra, presumiblemente debido a su estructura heterogénea y las amplias y bruscas oscilaciones en las condiciones fisicoquímicas que sufren (Walsh et al., 2005; Smucker et al., 2010; Vos et al., 2013). Youssef y colaboradores, en su estudio de la comunidad de Halobacteria de diversos sedimentos salinos observaron una mayor diversidad ecológica en hábitats con mayor oscilaciones de salinidad, frente a los permanentemente salinos (Youssef et al., 2012). Sin embargo, el grado de salinidad presente parece restringir la presencia de una mayor diversidad de taxones.

IV.1.5 Ensamblado de lecturas metagenómicas en contigs

El ensamblado de lecturas metagenómicas en secuencias más largas compuestas por secuencias solapantes (*contigs*) permite una asignación taxonómica y funcional más fiable, y permite la agrupación de secuencias filogenéticamente relacionadas en *bins* (Vollmers et al., 2017). Tras realizar varias pruebas con diferentes ensambladores y parámetros, los mejores resultados, mostrados en la Tabla 8, se obtuvieron mediante el ensamblador de Newbler v2.9 (gsAssembler, Roche), Teniendo en cuenta la mayor diversidad de la comunidad presente en los suelos salinos estudiados, y con el objetivo de obtener un ensamblado de mayor calidad (mayor número de lecturas ensambladas y contigs más largos) se llevó a cabo un coensamblado de las dos bases de datos procedentes de suelo. Sin embargo, y a pesar de esta estrategia, tan solo un 26,7 % de las secuencias de suelo pudieron ser ensambladas en *contigs*, frente al ~60-70 % de lecturas ensambladas en el caso de los metagenomas de ambientes hipersalinos acuáticos. El valor de N50, que representa el tamaño mínimo de los *contigs* más largos que componen el 50 % del ensamblaje, también fue menor. Estos resultados pueden ser interpretados atendiendo a la mayor diversidad de la comunidad microbiana presente en los suelos salinos estudiados, frente a la que se encuentra en los estanques de salinas tomados como referencia en este estudio, dado que, a una profundidad de secuenciación similar, una comunidad menos diversa contendrá una mayor proporción de secuencias solapantes (esto, es, perteneciente a un mismo organismo) que otra más diversa.

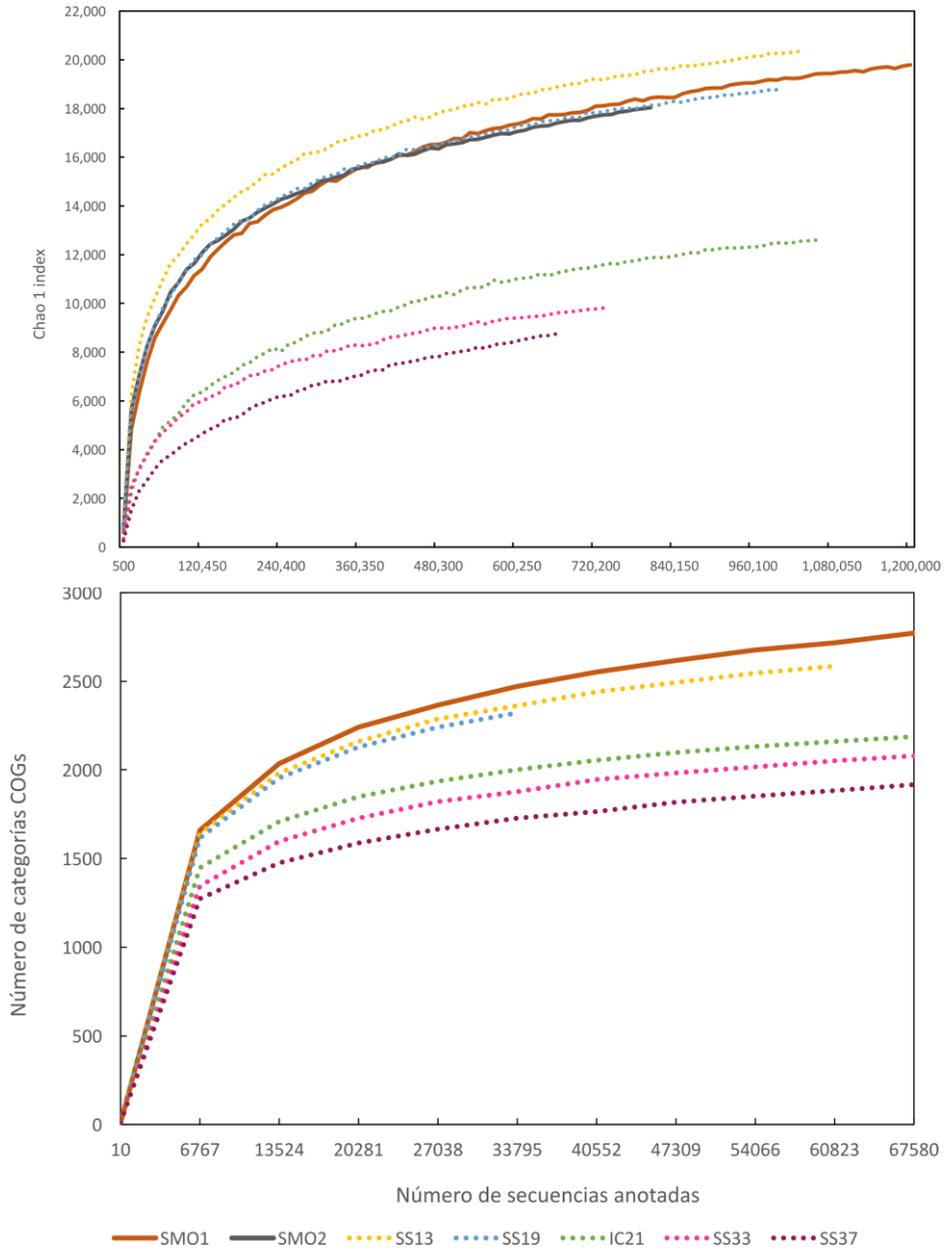


Figura 17A y B. Curvas de rarefacción basadas en A) la diversidad filogenética evaluada mediante el índice Chao 1, y B) la diversidad funcional en base al número de categorías COGs anotadas en las bases de datos metagenómicas estudiadas.

Tabla 8. Porcentaje de lecturas ensambladas, número de contigs y valor de N50 del resultado del ensamblaje de las bases de datos metagenómicas de suelos salinos obtenidas en este estudio y las procedentes de salinas utilizadas como referencia.

Base de datos	Lecturas ensambladas (%)	Nº de contigs >1 kb	N50 (pb)
SMO1	26,7	25 001	1 857
SMO2			
SS13	63,7	8 193	2 280
SS19	65,3	12 742	2 429
SS33	59,0	6 040	2 069
SS37	67,0	6 589	2 336
IC21	69,2	9 270	2 793

IV.1.6 Diversidad filogenética de la comunidad microbiana

Para evaluar la diversidad filogenética de la comunidad microbiana se utilizaron dos aproximaciones: por un lado, se analizó la afiliación taxonómica de los contigs resultado del ensamblado conjunto de las dos bases de datos metagenómicas (Figura 20); por otro, se extrajeron las lecturas relacionadas con el gen ARNr 16S y se anotaron frente a la base de datos RDP (Tablas 9 y 10).

La afiliación taxonómica de los *contigs*, en relación a la de las bases de datos utilizadas como referencia, se muestra en la Figura 20. La comunidad procariota reflejada en estos *contigs* estaba compuesta de manera equitativa por bacterias y arqueas. Esta ratio de arqueas frente a bacterias es muy superior a la que se encontraría en suelos con valores de salinidad no elevados, pero coherente con las proporciones de arqueas que pueden encontrarse en ambientes extremos, como los hipersalinos (Ghai et al., 2011; Jarrell et al., 2011; Fernández et al., 2014a). Aunque su distribución no se encuentra restringida a ambientes extremos de donde inicialmente se aislaron profusamente, sino que son cosmopolitas (Chaban et al., 2006; Jarrell et al., 2011), se ha propuesto que las propiedades de las membranas de arqueas las hacen más resistentes a condiciones fisicoquímicas extremas, razón por la que predominan en ambientes extremos (Van de Vossenberg et al., 1998). La proporción arqueas:bacterias es variable en los suelos salinos donde la comunidad procariota completa ha sido estudiada (Hollister et al., 2010a; Pandit et al., 2015; Patel et al., 2015; Xie et al., 2017; Narayan et al., 2018), en función del grado de salinidad (Xie et al., 2017), como ocurre en ambientes hipersalinos acuáticos, aunque esta propiedad es difícilmente comparable entre estudios de ambientes salinos terrestres. Los miembros del phylum *Euryarchaeota*, al que se afilian las arqueas halófilas extremas de la clase *Halobacteria*, dominaban la fracción del dominio *Archaea*. Los miembros de este phylum son miembros comúnmente encontrados en ambientes con altas concentraciones de sal, incluidos suelos salinos (Hollister et al., 2010a; Oren, 2015a; Pandit et al., 2015; Narayan et al., 2018). También detectamos *contigs* relacionados con representantes del phylum candidato *Nanohaloarchaeota*. Este grupo de arqueas de pequeño tamaño (~ 0,6 µm) fue detectado por primera vez en el lago alcalino hipersalino Magadi (Kenia) (Grant et al.,

1999) y desde entonces ha sido identificado en diversos ambientes alrededor del planeta con salinidades comprendidas entre el 19 y 40 %: en la columna de agua de salinas de Mongolia interior (China) (Casanueva et al., 2008), de Chula Vista (California) (Zhaxybayeva et al., 2013), de Bras del Port, Santa Pola (Alicante, España) (Ghai et al., 2011; Zhaxybayeva et al., 2013; Martínez-García et al., 2014; Gomariz et al., 2015), de Argentina (Di Meglio et al., 2016) y en los sedimentos de salinas de Sudáfrica (Casanueva et al., 2008) y Santa Pola (Mora-Ruiz et al., 2018); en lagos salinos de Transilvania (Rumanía) (Baricz et al., 2014b) y Siberia (Rusia) (Vavourakis et al., 2016), así como en costras salinas del desierto de Atacama (Finstad et al., 2017). Sin embargo, este taxón no había sido detectado en suelos salinos hasta el momento.

Una pequeña proporción de secuencias de arqueas se afiliaban a *Thaumarchaeota*, un phylum de microorganismos oxidadores de amonio que no incluye halófilos descritos hasta la fecha, Aunque se trata del phylum de arqueas más abundante en otros ambientes acuáticos y terrestres (Shi et al., 2016), solo un pequeño número de estudios ha detectado su presencia en suelo salinos y, en todos los casos se encontraba en baja proporción (Navarro-Noya et al., 2015b; Shi et al., 2016; Xie et al., 2017). Por otro lado, no se detectaron *contigs* relacionados con arqueas metanógenas o miembros del phylum *Crenarchaeota*, que han sido identificados como componentes minoritarios de la microbiota de otros suelos salinos estudiados (Walsh et al., 2005; Navarro-Noya et al., 2015b; Pandit et al., 2015).

La comunidad bacteriana de los suelos salinos estudiados, con 26 phyla diferentes representados, es más diversa que la encontrada en ambientes hipersalinos acuáticos (Figura 20). Sin embargo, dominan claramente los phyla *Balneolaeota*, *Bacteroidetes* y *Rhodothermaeota*, mientras que los demás se encuentran en muy baja proporción. Como en el caso de las arqueas, la fracción correspondiente a bacterias también se compone de phyla que engloban a microorganismos halófilos, como *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Rhodothermaeota*, *Spirochaetes*, *Thermotogae* y *Verrucomicrobia*, así como de grupos sin representantes halófilos descritos (Ventosa et al., 2008; de la Haba et al., 2011; Spring et al., 2016; Munoz et al., 2017). Otros estudios también han hallado secuencias relacionadas con no halófilos en suelos salinos (Oueriaghli et al., 2013; Canfora et al., 2014; Pandit et al., 2015; Xie et al., 2017; Narayan et al., 2018; Zhao et al., 2018), llegando incluso a constituir un ~20 % de la comunidad (Patel et al., 2015).

Dadas las peculiaridades de la secuencia del gen ARNr 16S, que contiene regiones conservadas con alto grado de semejanza para todos los microorganismos, los *contigs* obtenidos a partir de estas secuencias no se estimaron fiables y se procedió a obtener y anotar las secuencias metagenómicas que contenían fragmentos del gen ARNr 16S para el análisis de la diversidad microbiana a niveles más específicos. Esta aproximación permitió, además, considerar la totalidad de las secuencias metagenómicas, en contraposición al ~27 % representado por el conjunto de *contigs* ensamblados, y obtener valores individuales para cada una de las bases de datos de suelo, SMO1 y SMO2.

El análisis de las lecturas relacionadas con el gen ARNr 16S de los metagenomas de suelo SMO1 y SMO2 a nivel de género reveló la presencia de una gran diversidad de taxones, constituyendo

los mayoritarios rara vez más del 10 % de las secuencias (Tablas 9 y 10). Destaca el alto número de grupos taxonómicos representados por menos del 1 % de las secuencias, agrupados en 'Otros', categoría que engloba más del 20 % de las lecturas relacionadas con este gen en la base de datos SMO2. Cinco grupos en el caso de SMO1 y cuatro en la base de datos SMO2 engloban más del 7 % de las secuencias metagenómicas relacionadas con el gen ARNr 16S: *Haloarcula*, *Halolamina* y *Salinigranum* (*Euryarchaeota*) se encuentran entre los grupos mayoritarios en ambas bases de datos, mientras que *Halorubrum* (*Euryarchaeota*) y *Fodonibius* (*Balneolaeota*) ocupan el segundo y tercer puesto en abundancia en SMO1, siendo *Salinimicrobium* (*Bacteroidetes*) el género representado por un mayor número de secuencias en SMO2 (Tablas 9 y 10). Los géneros *Halorubrum* y *Fodonibius* también aparecen representados en SMO2, así como *Salinimicrobium* en SMO1, aunque en menor proporción. Otros géneros representados por más de un 1 % de las secuencias en ambas bases de datos fueron *Gracilimonas* (3,4 % en SMO1; 3 % en SMO2), *Halobellus* (2,5 % en SMO1; 4,6 % en SMO2), *Natronomonas* (2,5 % en SMO1; 2,2 % en SMO2), *Haloplanus* (2,1 % en SMO1; 1,9 % en SMO2), *Halorientalis* (1,9 % en ambos), *Halomicroarcula* (1,6 % en SMO1; 2,2 % en SMO2) y *Halomonas* (1,1 % en SMO1; 1,6 % en SMO2). *Salinibacter*, que abunda en estanques de salinas solares de altas concentraciones salinas, solo está representado por más de un 1 % de las secuencias en las muestras tomadas en octubre de 2013. Se corroboran así los resultados mostrados a nivel de phylum, constatando que no se ensambla preferentemente un grupo de microorganismos más que otro. Además, el contenido en GC de los géneros citados corresponde con los picos mayoritarios observados en el perfil de GC de estas dos bases de datos (Figura 18).

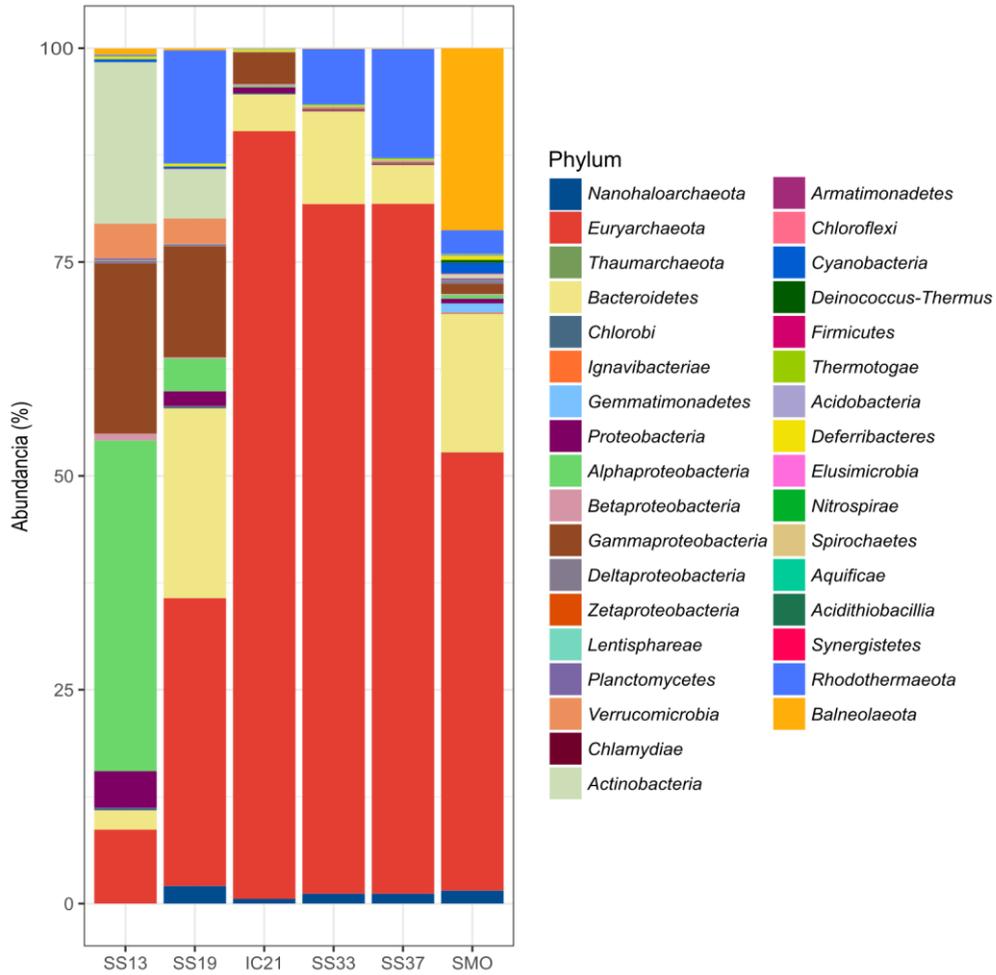


Figura 18. Diversidad procariota a nivel de phylum representada por los contigs mayores de 1 kb de las bases de datos de referencia junto a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelo SMO1 y SMO2 (SMO).

Tabla 9. Afiliación taxonómica a nivel de phylum de los fragmentos del gen ARNr 16S identificados en las secuencias de las dos muestras de suelo salino, SMO1. Las secuencias asignadas poseen una identidad de más del 95 % a lo largo de al menos 100 pb con el hit mostrado. La categoría 'Otros' incluye los taxones representados por menos de un 1 % de las secuencias. El color corresponde al phylum al que pertenecen: *Euryarchaeota* – rojo, *Bacteroidetes* – verde, *Gammaproteobacteria* – celeste, *Alphaproteobacteria* – naranja, *Actinobacteria* – morado, *Rhodothermaeota* – gris y *Balneolaeota* – azul. Se muestra también el rango de salinidad y GC de los representantes de estos géneros.

SMO1			
Género	Rango salino	GC	Abundancia relativa
<i>Haloarcula</i>	12-30	60-65	12,7 %
<i>Halorubrum</i>	6-30	60-71	10,3 %
<i>Fodinibius</i>	10-15	43	9,0 %
<i>Halolamina</i>	8-30	65-68	7,4 %
<i>Salinigranum</i>	5-28	63-65	7,1 %
<i>Unc. Halobacteria</i>	-	-	6,7 %
<i>Salinibacter</i>	12-30	44-67	4,1 %
<i>Gracilimonas</i>	1-20	42-47	3,4 %
<i>Halohasta</i>	12-28	62-63	3,4 %
<i>Halapricum</i>	15-30	66	2,7 %
<i>Halobellus</i>	8-30	61-69	2,5 %
<i>Natronomonas</i>	12-36	62-64	2,5 %
<i>Halonotius</i>	16-36	58	2,1 %
<i>Haloplanus</i>	5-28	62-67	2,1 %
<i>Halorientalis</i>	8-30	61-63	1,9 %
<i>Halorubellus</i>	8-30	67	1,8 %
<i>Halomicroarcula</i>	5-30	64-65	1,6 %
<i>Salinimicrobium</i>	0-10	42-48	1,6 %
Uncl. <i>Ectothiorhodospiraceae</i>	-	-	1,2 %
Uncl. <i>Gammaproteobacteria</i>	-	-	1,2 %
<i>Halalkalicoccus</i>	6-35	60-63	1,1 %
<i>Halomonas</i>	0-30	49-74	1,1 %
Otros			12,7 %

Tabla 10. Afiliación taxonómica a nivel de phylum de los fragmentos del gen ARNr 16S identificados en las secuencias de las dos muestras de suelo salino, SMO2. Las secuencias asignadas poseen una identidad de más del 95 % a lo largo de al menos 100 pb con el hit mostrado. La categoría 'Otros' incluye los taxones representados por menos de un 1 % de las secuencias. El color corresponde al phylum al que pertenecen: *Euryarchaeota* – rojo, *Bacteroidetes* – verde, *Gammaproteobacteria* – celeste, *Alphaproteobacteria* – naranja, *Actinobacteria* – morado, *Rhodothermaeota* – gris y *Balneolaeota* – azul. Se muestra también el rango de salinidad y GC de los representantes de estos géneros.

SMO2			
Género	Rango salino	GC	Abundancia relativa
<i>Salinimicrobium</i>	0-10	42-48	9,2 %
<i>Salinigranum</i>	5-28	62,9-65,2	9,0 %
<i>Halolamina</i>	8-30	64,8-68	8,7 %
<i>Haloarcula</i>	12-30	60,1-65	8,4 %
Uncl. <i>Halobacteria</i>	-	-	6,3 %
<i>Halobellus</i>	8-30	61,4-69,2	4,6 %
Uncl. <i>Gammaproteobacteria</i>	-	-	4,1 %
<i>Gracilimonas</i>	1-20	41,7-47,2	3,0 %
<i>Halorubrum</i>	6-30	60,2-71,2	2,7 %
<i>Halomicroarcula</i>	5-30	64-64,5	2,2 %
<i>Marinobacter</i>	0-25	52-63,5	2,2 %
<i>Natronomonas</i>	12-36	61,8-64,3	2,2 %
<i>Pseudidiomarina</i>	-	-	2,2 %
<i>Altererythrobacter</i>	0-13	54,5-69	1,9 %
<i>Halomarina</i>			1,9 %
<i>Haloplanus</i>	5-28	62,1-67,2	1,9 %
<i>Halorientalis</i>	8-30	61,3-62,8	1,9 %
<i>Fodinibius</i>	10-15	43	1,6 %
<i>Halomonas</i>	0-30	48,9-74,3	1,6 %
<i>Nocardiopsis</i>	0-20	65-74,7	1,6 %
Uncl. <i>Flavobacteriaceae</i>	-	-	1,4 %
<i>Idiomarina</i>	0,5-12	41,2-56,4	1,1 %
Otros			20,4 %

De esta manera, se demuestra que la comunidad de este suelo es dinámica en la época de muestreo seleccionada ya que, aunque la mayoría de los grupos mayoritarios están presentes en ambas bases de datos, su abundancia relativa es variable. El planteamiento utilizado en este estudio no permite identificar los factores fisicoquímicos relacionados con el cambio en la diversidad y estructura comunidad procariota detectado.

Cabe destacar que entre los microorganismos más abundantes se encuentran grupos cuyos representantes poseen diferentes susceptibilidades a un alto contenido extracelular de iones (Tablas 9 y 10). Mientras que el rango de salinidad de los representantes de los géneros mayoritarios *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Halolamina* y *Salinigranum* alcanza un máximo de aproximadamente 30 % NaCl en condiciones de laboratorio, aquellos mayoritarios y variables entre las dos bases de datos, los representantes descritos del género *Fodinibius* son halófilos débiles o moderados y aquellos de *Salinimicrobium* no sobreviven en presencia de más de un 10 % NaCl (Tablas 9 y 10). Varios estudios de la microbiota presente en suelos salinos destacan el aislamiento tanto de halófilos estrictos como de halotolerantes a partir de una misma muestra de suelo (Quesada et al., 1982; Shi et al., 2012). Es más, aunque los géneros más abundantes presentes en estos suelos tienen relación con la salinidad, se detectan, como en otros suelos salinos anteriormente estudiados, bajas proporciones de grupos taxonómicos sin representantes halófilos o halotolerantes conocidos (Figura 5, Tabla 4)(Oueriaghli et al., 2013; Canfora et al., 2014; Pandit et al., 2015; Xie et al., 2017).

La coexistencia de grupos de microorganismos con tolerancias a la salinidad tan dispares podría ser un reflejo de la alta heterogeneidad espacial de estos suelos, que daría lugar a nichos con diversas salinidades donde abundarían diferencialmente estos grupos, de modo que no se encontrarían físicamente conectados. La variación debido a lluvias y otros factores ambientales de estos nichos diferenciados podría explicar la estructura dinámica y diferencias observadas entre la muestra tomada en octubre de 2013 y la de noviembre de 2014, dado que la desaparición o disminución en tamaño y creación de nuevos nichos con condiciones diferentes podrí favorecer el desarrollo de diferentes grupos taxonómicos. En este caso, aquellos grupos taxonómicos abundantes en ambas bases de datos deberían ser versátiles. Por otro lado, también podría tratarse de representantes no caracterizados relacionados con los grupos identificados capaces de sobrevivir en rangos de salinidad diferentes a los ya descritos. En este sentido, diversos estudios apuntan a un mayor carácter eurihalino de los halófilos aislados de suelos salinos (en contraposición a los obtenidos a partir de ambientes acuáticos) (Quesada et al., 1982; Caton et al., 2004; Purdy et al., 2004; Schneegurt, 2013), presumiblemente debido a la heterogeneidad en el tiempo y el espacio de la salinidad (y otros parámetros fisicoquímicos) en este tipo de hábitats salinos (Quesada et al., 1982; Walsh et al., 2005).

Entre los taxones detectados en estos suelos se encuentran algunos bien conocidos por su prevalencia y/o abundancia en otros suelos salinos, como es el caso de *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Salinibacter*, *Natronomonas*, *Marinobacter* y *Halomonas* (Walsh et al., 2005; Mesbah et al., 2007; Valenzuela-Encinas et al., 2008; Caton et al., 2009; Wang et al., 2011; Luque et al., 2012b; Oueriaghli et al., 2013; Navarro-Noya et al., 2015b; Pandit et al., 2015; Patel et al., 2015; Liu et al., 2016). Éstos también son géneros abundantes en ambientes hipersalinos acuáticos. Sin

embargo, *Halolamina*, *Salinigranum*, *Fodinibius* y *Salinimicrobium* no han sido detectado como abundantes en suelos salinos con anterioridad y en pocos acuáticos, siendo la información ambiental disponible sobre ellos, en concreto sobre *Fodinibius* y *Salinigranum*, escasa.

El género *Halolamina* contiene en la actualidad 6 especies descritas, aislados de salinas solares localizadas en Corea y varias regiones de China (Cui et al., 2011; Koh et al., 2015; Xu et al., 2016), minas de sal en la provincia china de Xinjiang, China (Zhang et al., 2013) o sal no purificada (Cha et al., 2014), además de 33 entradas de especies de *Halolamina* no caracterizadas en Genbank y 11 secuencias ambientales en junio de 2018. Su prevalencia y abundancia en estudios moleculares es desigual. Aunque no se ha reportado como abundante en los ambientes hipersalinos mejor estudiados (salinas solares y lagos salinos) mediante métodos moleculares, sí lo es en los estudios de Zhang y colaboradores de la microbiota de sedimentos de chimeneas hidrotermales inactivas del fondo marino en India (Zhang et al., 2016), en procesos de fermentación de marisco al estilo Coreano (Jung et al., 2013) y de producción de sal a partir de aguas del subsuelo en las torres de concentración de sales en Polonia, lugar donde además constituía uno de los taxones presentes en todas las muestras (Kalwasińska et al., 2018). También se encontraba entre los más abundantes y ubicuos en los estudios de varios ambientes salinos de Túnez (agua, costra salina, sedimento, *biofilm*) (Najjari et al., 2015) y sedimentos salinos de diferentes localizaciones (Youssef et al., 2012). Este género se encuentra recurrentemente en estudios de sales comerciales, aunque algunos estudios lo encuentran ubicuo a todas las muestras (Clark et al., 2017; Gibtan et al., 2017), mientras que otro lo detecta en tan solo una de ellas (Henriet et al., 2014). En los lagos de la región xxx de Ocnei también se ha detectado, aunque su abundancia en ellos depende del lago estudiado (Baricz et al., 2014b). En el resto de los estudios en lo que se ha detectado, aparece solo en ciertas muestras y en baja proporción (Casamayor et al., 2013; Bhattacharyya et al., 2015; Han et al., 2017).

A pesar de encontrarse en varios ambientes hipersalinos, su abundancia no se ha correlacionado con ningún parámetro fisicoquímico específico hasta la fecha y, en el estudio de Najjari y colaboradores (Najjari et al., 2015), no se encuentra correlacionado positiva ni negativamente con la salinidad en el rango estudiado; lo que podría sugerir un carácter más eurihalino de este género.

Poca es la información disponible en la literatura sobre la distribución ambiental de *Salinigranum* y *Fodinibius*. El género *Salinigranum* posee en la actualidad dos especies descritas, *S. rubrum* y *S. salinum*, ambas aisladas de salinas solares. Atendiendo a estudios independientes de cultivo, tan solo representa una fracción pequeña de la comunidad estudiada de una *sabkha* en Arabia Saudí (Albokari et al., 2017), y Genbank incluye una secuencia ambiental relacionada con este género procedente de aguas de arrecifes en India.

Fodinibius incluye en la actualidad una única especie descrita, obtenida a partir de un sedimento de minas de sal (Wang et al., 2012a), y representantes de este género han podido ser aislado de salinas de Anatolia (Turquía) (Çınar & Mutlu, 2016). En estudios moleculares, tan solo se ha detectado en el estudio de Kalwasińska y colaboradores (Kalwasińska et al., 2018), donde constituye uno de los géneros más abundantes. Su pariente más cercano, *Aliifodinibius*, que se

encuentra estrechamente relacionado con *Fodinibius*, ha sido recurrentemente encontrado en ambientes de sustrato sólido (Wang et al., 2013; Al-Mailem et al., 2017; Cho et al., 2017).

En cuanto a *Salinimicrobium* (*Flavobacteria*), las 8 especies descritas fueron aisladas de sedimentos o suelos, aunque entre las secuencias ambientales encontradas relacionadas con este género se asociaban a otros organismos (Radwan et al., 2010; Valdenegro-Vega et al., 2013), agua de mar, salina solar en la bahía de Bohai (China) (Zhang et al., 2016) y se encuentra de forma recurrente, y a veces abundante en suelos contaminados por hidrocarburos (Al-Awadhi et al., 2013; Patel et al., 2014; Liao et al., 2015; Fang et al., 2016; Li et al., 2016; Al-Mailem et al., 2017).

El sustrato de un hábitat ha sido propuesto como un parámetro relevante en la determinación de la estructura microbiana, por encima de la salinidad (Jeffries et al., 2011). Atendiendo a la información disponible en la literatura sobre estos géneros se observa una tendencia hacia ambientes de sustrato sólido. Su escasa presencia en estudios ambientales podría ser consecuencia, por tanto, de la limitada atención por parte de la comunidad científica que estos otros ambientes hipersalinos han recibido. Sin embargo, estos grupos no se encuentran como abundantes en los escasos estudios que han caracterizado la microbiota de otros suelos salinos a nivel de género, lo que sugiere que determinadas condiciones fisicoquímicas de estos suelos podrían jugar también un papel fundamental en la determinación de su abundancia. El planteamiento del presente estudio, con dos únicos momentos de muestreo, no permite discernir con claridad los parámetros fisicoquímicos con los que estos grupos se correlacionan.

Destaca también la ausencia de secuencias relacionadas con los géneros *Haloquadratum*, que domina la población procariota en ciertos ambientes hipersalinos acuáticos, como los estanques de mayor salinidad de la salina Bras del Port que se incluyen como referencia en este estudio (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a). Además, mientras que en gran parte de los suelos salinos estudiados abundan los representantes del género *Bacillus* (Miller et al., 1983; Quesada et al., 1983; Miller & Leschine, 1984; Nicolaus et al., 1992; Garabito et al., 1998; Caton et al., 2004; Irshad et al., 2014; Narayan et al., 2018) y *Halobacterium* (Quesada et al., 1982; Oueriaghli et al., 2013; Pandit et al., 2015; Patel et al., 2015), éstos no constituyen una fracción relevante de la comunidad en los suelos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. La ausencia de géneros de halófilos metanógenos, sulfato reductores o anaerobios corrobora que en estos suelos no se daban condiciones de anaerobiosis prevalentes en el momento de muestreo, como ya sugerían los bajos valores de humedad de las dos muestras consideradas.

En las dos bases de datos se detecta entre un 6 y 7 % de secuencias relacionadas con la clase *Halobacteria* que no pudieron ser clasificadas a nivel de género. La fracción de gammaproteobacterias no clasificadas a este mismo nivel taxonómico constituía más del 1 % en ambos casos. El encuentro de una fracción de secuencias no asignadas a ningún taxón específico constituye una característica recurrente en estudios metagenómicos de suelo (Choi et al., 2016). En el metaanálisis llevado a cabo por Ma y Gong donde se analiza la diversidad de todas las secuencias relacionadas con el gen ARNr 16S obtenidas de suelos salinos depositadas en bases de datos públicas se pone de manifiesto que aún queda por muestrear el 75 % de la

diversidad de bacterias y el 50 % de la de arqueas presentes en este tipo de hábitats (Ma & Gong, 2013). La mayor proporción de secuencias que pudieron ser clasificadas en este estudio, con respecto a las cifras indicadas por Ma y Gong podría deberse a la influencia de la salinidad, que propicia la presencia de taxones ya conocidos de otros ambientes hipersalinos bien conocidos.

Por todo ello, y aunque destaca la gran similitud de la comunidad de estos suelos en momentos tan separados en el tiempo, podemos decir que estos suelos contienen una comunidad única y distinta a otros suelos salinos o ambientes hipersalinos estudiados compuesta principalmente por microorganismos halófilos, entre los que se encuentran halófilos extremos frecuentemente reportados en otros ambientes hipersalinos así como microorganismos con diferentes susceptibilidades a la sal, con escasa o variada representación en estudios moleculares llevados a cabo hasta la fecha. La estructura heterogénea del suelo podría explicar parte de las diferencias existentes entre la comunidad procariota de suelos salinos con respecto a los ambientes hipersalinos acuáticos, como la mayor diversidad, la dominancia de grupos con distintos rangos salinos o la presencia de microorganismos no halófilos. La obtención en cultivo puro de los habitantes de los suelos salinos, para lo que se requiere aún un gran esfuerzo, permitiría comprobar las hipótesis aquí planteadas.

IV.1.7 Diversidad funcional

La Figura 21 muestra la proporción de categorías SEED anotadas en *contigs* de las bases de datos de suelos salinos en comparación con esta misma información en los metagenomas de referencia.

Puede observarse en las bases de datos procedentes de suelos se encuentran más representados las categorías SEED de transporte de membrana, adquisición y hierro, motilidad y quimiotaxis. Dado que las concentraciones de nutrientes en suelos son por lo general bajas y altamente variables en el tiempo y el espacio (Torsvik & Øvreås, 2008), es muy probable que las capacidades probablemente proporcionadas por estos genes, como la de movimiento, comunicación con otros y con el entorno y rápida adquisición de nutrientes cuando están disponibles suponga una ventaja adaptativa para los microorganismos que viven en el suelo. Además, se observa que estos microorganismos tienen una mayor diversidad metabólica, suponiendo los genes relacionados con fermentación, metabolismo de monosacáridos, polisacáridos y compuestos aromáticos una mayor proporción de secuencias en estos mismos metagenomas con respecto a los de referencia. La versatilidad metabólica ha sido relacionada con una mayor abundancia en grupos bacterianos que habitan el suelo (Kurm et al., 2017). El marcado carácter dinámico en el tiempo y el espacio de la estructura fisicoquímica del suelo podría seleccionar microorganismos versátiles en cuanto a sus preferencias nutricionales, capaces de utilizar diversas fuentes de carbono. Dado que los ambientes hipersalinos se encuentran frecuentemente contaminados con petróleo y compuestos relacionados, metales pesados y/o otros productos tóxicos de origen antropogénico, y los reservorios de petróleo suelen usar aguas salinas y estar rodeado de suelos salinos (Radwan & Al-Mailem, 2015), no es extraño encontrar microorganismos halófilos con capacidades hidrocarbonoclasticas. En este

suelo, son abundantes las secuencias relacionadas con taxones con estas capacidades, como *Salinimicrobium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Gracilimonas* y *Altererybacter* (Fang et al., 2016; Al-Mailem et al., 2017). Aunque en este estudio no evaluamos, y las orillas Marismas del Odiel han sufrido la influencia de dos vertidos de hidrocarburos tipo petróleo y fuel en 2013 y 2014 en la ría de Huelva provenientes del Polo Químico de Huelva, donde se sitúa una zona de explotación de hidrocarburos, resulta poco probable que estos suelos contengan altas concentraciones de estas sustancias. Dado que se han aislado microorganismos con capacidades hidrocarbonocásticas de ambientes no contaminados (Brito et al., 2006; Koukkou & Vandera, 2011; Teramoto et al., 2013), proponemos que esta función se ha seleccionado en la comunidad en base a la versatilidad metabólica que proporciona.

La alta proporción de secuencias relacionadas con el metabolismo de polisacáridos podría estar relacionada con la alta proporción de exopolisacáridos, que se relaciona con la adhesión a superficies sólidas como son las partículas del suelo, así como con protección frente a estrés ambiental como desecación, alto contenido en metales y otras sustancias tóxicas (Limoli et al., 2015), condiciones que se encuentran frecuentemente en los suelos estudiados.

Se puede observar que los genes clasificados en las categorías de patogenicidad, virulencia y metabolismo secundario se encuentran en mayor proporción en las bases de datos provenientes de suelos salinos, con respecto a las obtenidas de columna de agua de diferentes estanques de salinas. Se ha propuesto que la escasez de nutrientes promueve la síntesis de antibióticos y, consecuentemente, la aparición de mecanismos de resistencia (Abrudan et al., 2015), lo cual puede explicar las proporciones encontradas en estos suelos con respecto a los metagenomas de referencia. De igual modo, los suelos constituyen hábitats reconocidos por su gran proporción de microorganismos productores de metabolitos secundarios, y son investigados en la búsqueda de nuevas moléculas para un amplio rango de usos y aplicaciones biotecnológicas (Tyc et al., 2018). Cabe destacar que, debido a que no se han descrito patógenos de la clase *Haloarchaea* (Seck et al., 2018), sería esperable que las bases de datos con mayor proporción de bacterias albergaran mayor número de genes relacionados con virulencia y patogenicidad. Sin embargo, aunque SS13 y SS19 poseen la mayor proporción de bacterias frente a arqueas, es en los *contigs* obtenidos a partir de las bases de datos de suelos donde mayor proporción de estos genes se encuentra. Esto puede reflejar, una vez más, las duras condiciones encontradas en estos suelos.

Los genes relacionados con fotosíntesis se encuentran en mayor proporción en las bases de datos de suelos, cuya comunidad de productores primarios fotosintéticos es superior (Figura 5). Aquellos relacionados con pared celular y cápsula se encuentran en el rango de las muestras menos salinas SS13 y SS19, que contienen una mayor proporción de secuencias relacionadas con el dominio bacteria.

La alta proporción de secuencias atribuidas a elementos de transposición en las bases de datos de suelos podría indicar que esta característica, que contribuye a la plasticidad genómica permitiendo la adquisición de nuevos rasgos, contribuye a la supervivencia en hábitat como el suelo, oligotrófico y variable.

Contrariamente a lo que cabría esperar dadas las oscilaciones en factores ambientales y nutricionales (pudiendo suponer condiciones desfavorables) en el entorno de los microorganismos de suelo, la proporción de secuencias anotadas en la categoría SEED de latencia y esporulación fue superior en los *contigs* de los metagenomas de estanques de salinas con salinidades intermedias. En este sentido, se ha propuesto que la competición por los recursos, especialmente en condiciones extremas, ejerce una presión para el mantenimiento de un metabolismo activo, frente al estado de latencia (Aanderud et al., 2016), lo cual podría explicar nuestros resultados.

Aunque podrá hipotetizarse que una gran proporción de los genes encontrados en este tipo de ambientes extremos deberían anotarse en la categoría SEED correspondiente a mecanismos de respuesta a estrés, esto no es lo que se observa en nuestros resultados (Figura 6). El hecho de que no todas las rutas metabólicas de los principales mecanismos de osmoadaptación (como por ejemplo transporte de iones o síntesis de solutos compatibles como la trehalosa) no se encuentran clasificados en esta categoría es en parte responsable de este resultado. Por ello, se realizó un estudio detallado de los genes relacionados con los mecanismos conocidos de osmoadaptación (Tabla 5). La biosíntesis de trehalosa y la síntesis de betaína a partir de colina, así como su transporte desde el exterior parecen ser los mecanismos de acumulación de solutos compatibles más prevalentes en la microbiota de los suelos salinos. En las bases de datos hipersalinas acuáticas, la betaína es preferida frente a la trehalosa como soluto compatible. La glicina betaína, la ectoína y sus derivados y la trehalosa se encuentran entre los osmolitos más comunes en procariotas (Oren, 2008). En nuestro estudio, los genes relacionados con la acumulación e ectoína fueron los menos abundantes de entre los osmolitos analizados. Aunque inicialmente la ectoína se propuso como el soluto compatible principalmente acumulado por los representantes de los taxones *Proteobacteria*, *Firmicutes* y otras bacterias (Ciulla et al., 1997), estudios moleculares han constatado que la importancia relativa de la ectoína como soluto compatible en estos ambientes hipersalinos naturales es limitado (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a; 2014c).

Como en ambientes marinos, la luz sirve como fuente de energía para las comunidades heterótrofas de ambientes acuáticos hipersalinos (Ventosa et al., 2014), como se refleja en el número de secuencias afiliadas a rodopsinas en las bases de datos de salinas solares (Tabla 5). La prevalencia e importancia de los genes de rodopsinas en ambientes terrestres es desconocida. En nuestro estudio, la proporción de secuencias anotadas como proteorrodopsinas bacterianas o bacteriorrodopsinas de haloarqueas en los metagenomas de suelos salinos es ligeramente inferior a la encontrada en las bases de datos de salinas. Sin embargo, y pese a la opacidad de los componentes del suelo, nuestros resultados evidencian que una proporción no desdeñable de microorganismos de este ambiente podrían poseer la capacidad de fotoheterotrofia.

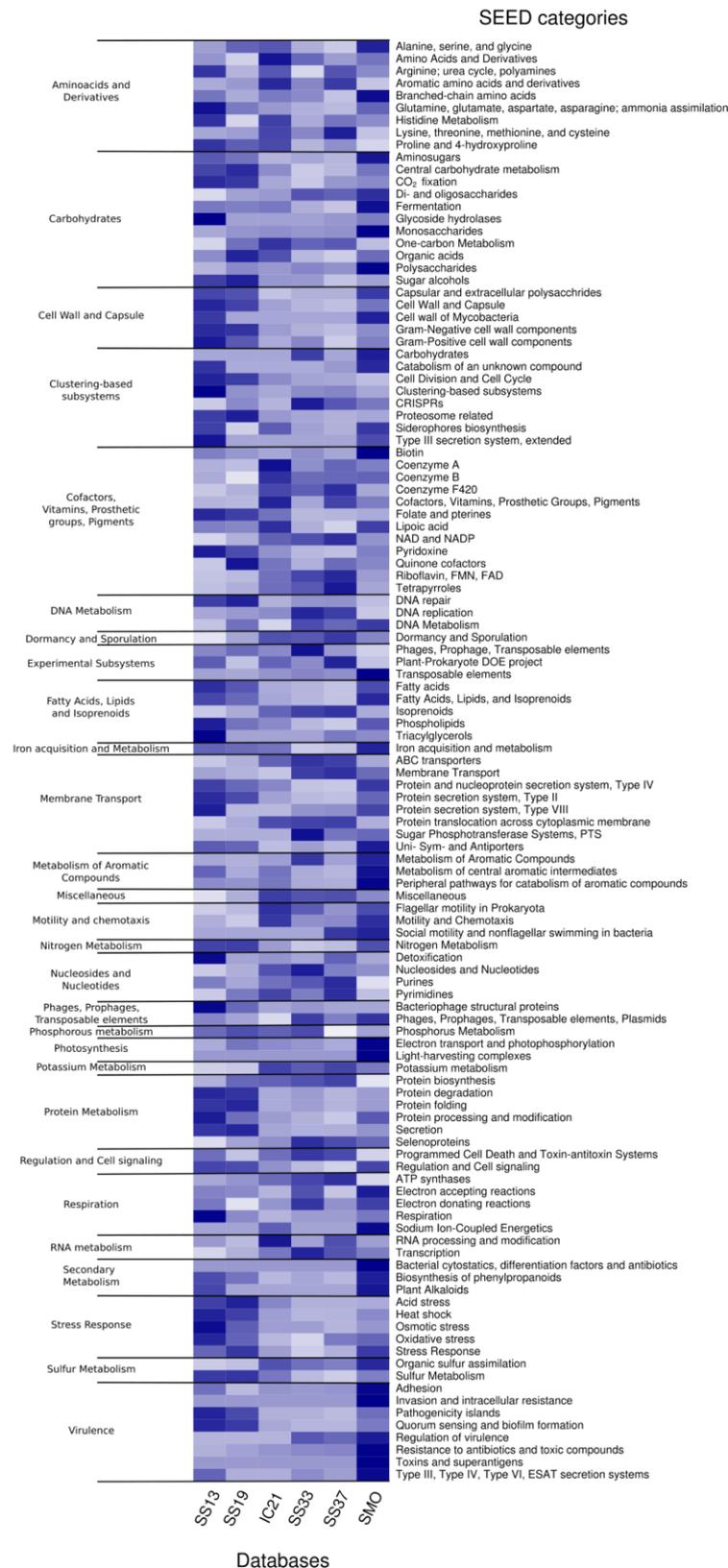


Figura 19. Mapa de calor que muestra la proporción de proteínas relacionadas con los subsistemas SEED en los contigs de las bases de datos estudiadas. SMO hace referencia a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelos, SMO1 y SMO2. Se ha aplicado una escala por filas.

Tabla 11. Fracción de secuencias anotadas como genes relacionados con osmoadaptación y rodopsinas de las bases de datos metagenómicas de suelos salinos obtenidos en este estudio y las procedentes de salinas solares. ‘SMO’ hace referencia a los contigs resultado del ensamblaje conjunto de las dos bases de datos de suelo salino, SMO1 y SMO2.

	SS13	SS19	IC21	SS33	SS37	SMO
Betaína a partir de glicina	0,0265	0,0356	0,0180	0,0288	0,0053	0,0049
Betaína a partir de colina	0,5531	0,2161	0,0717	0,0222	0,0101	0,1609
Transporte de betaína	0,3531	0,4003	0,1741	0,0549	0,0281	0,0748
Transporte de colina	0,2671	0,2298	0,1181	0,1303	0,0943	0,0967
Transporte de ectoína	0,0022	0,0008	0	0	0,0006	0,0014
Síntesis de ectoína	0,1338	0,0502	0	0	0	0,0254
Biosíntesis de trehalosa	0,1285	0,2238	0,0738	0,1027	0	0,2893
Transporte de trehalosa	0	0	0,0004	0	0	0,0049
Proteorrodopsina	0,0442	0,0506	0,0144	0,0040	0,0018	0,0071
Bacteriorrodopsina	0,0396	0,0387	0,0570	0,0830	0,0838	0,0233

IV.1.8 Análisis metagenómico de resolución genómica

IV.1.8.1 Proceso de binning y características generales de los genomas recuperados

Las técnicas de *binning* permiten agrupar secuencias con relación filogenética y, en el mejor de los casos, recuperar mediante estos *contigs* la secuencia genómica completa o casi completa de estos grupos filogenéticos. Aunque la metagenómica ha permitido el estudio de la diversidad filogenética y metabólica de un gran número de ambientes naturales solventando el sesgo del aislamiento en cultivo puro, los análisis ecológicos y evolutivos solo pueden ser llevados a cabo con datos genómicos (Hugerth et al., 2015).

Aunque la extracción de genomas ambientales a partir de metagenomas de suelo ha mostrado ser especialmente dificultosa dado la gran diversidad presente y, por lo general, la menor cobertura obtenida, la mayor abundancia de ciertos grupos taxonómicos en estos suelos, junto con el uso de los datos de cobertura diferencial de estas secuencias en ambos metagenomas propiciaron la recuperación, mediante el uso de métodos automáticos y posterior refinamiento manual, de tres genomas bacterianos en estado de borrador, completos en más del 50 % y con bajos valores de contaminación, según los parámetros evaluados por CheckM (Tabla 5), y un genoma relacionado con el dominio *Archaea* de menor calidad.

El genoma reconstruido de mayor calidad cubría un ~87 % de la secuencia genómica del taxón (Tabla 5) mientras que los otros dos relacionados con el dominio *Bacteria*, estaban completos en un ~53 y ~47 %. La contaminación, estimada a partir del número de copias múltiples de los genes marcadores utilizados, era muy baja en todos los casos, así como la heterogeneidad de cepa, evaluada como el número de copias múltiples de genes marcadores con estrecha relación

filogenética entre ellos (Parks et al., 2015). De acuerdo con los estándares recientemente establecidos sobre los genomas ensamblados a partir de metagenomas (denominados *Metagenome Assembled Genomes*, MAGs, o *bins*), los obtenidos en nuestro estudio se consideran borradores de calidad media (fracción del genoma capturada ≤ 50 , contaminación < 10 %) (Bowers et al., 2017). A pesar de la abundancia del dominio *Archaea* en las bases de datos de suelos salinos estudiadas, el genoma recuperado relacionado con este taxón tan solo se encuentra completo en un 10 %. Probablemente, la gran diversidad de representantes de este orden presentes, su abundancia similar en las dos bases de datos y similitud genómica observada en *Halobacteria* (Papke et al., 2007) dificultan el proceso de ensamblado y *binning*. Cabe destacar que estos genomas ambientales se consideran representaciones de poblaciones y no de especies o cepas particulares, dada la imposibilidad de determinar si se trata de una u otra entidad (Sharon & Banfield, 2013).

Tabla 12. Resultados del análisis de los genomas ambientales recuperados con CheckM.

Bin	Linaje según marcadores filogenéticos	Fracción recuperada (%)	Contaminación (%)	Heterogeneidad a nivel de cepa
Bin 1	k__Bacteria (UID2570)	86,65	2,24	0,00
Bin 2	p__Bacteroidetes (UID2591)	53,37	2,02	0,00
Bin 3	k__Bacteria (UID203)	47,15	1,72	0,00
Bin 4	k__Archaea (UID2)	10,11	0,00	0,00

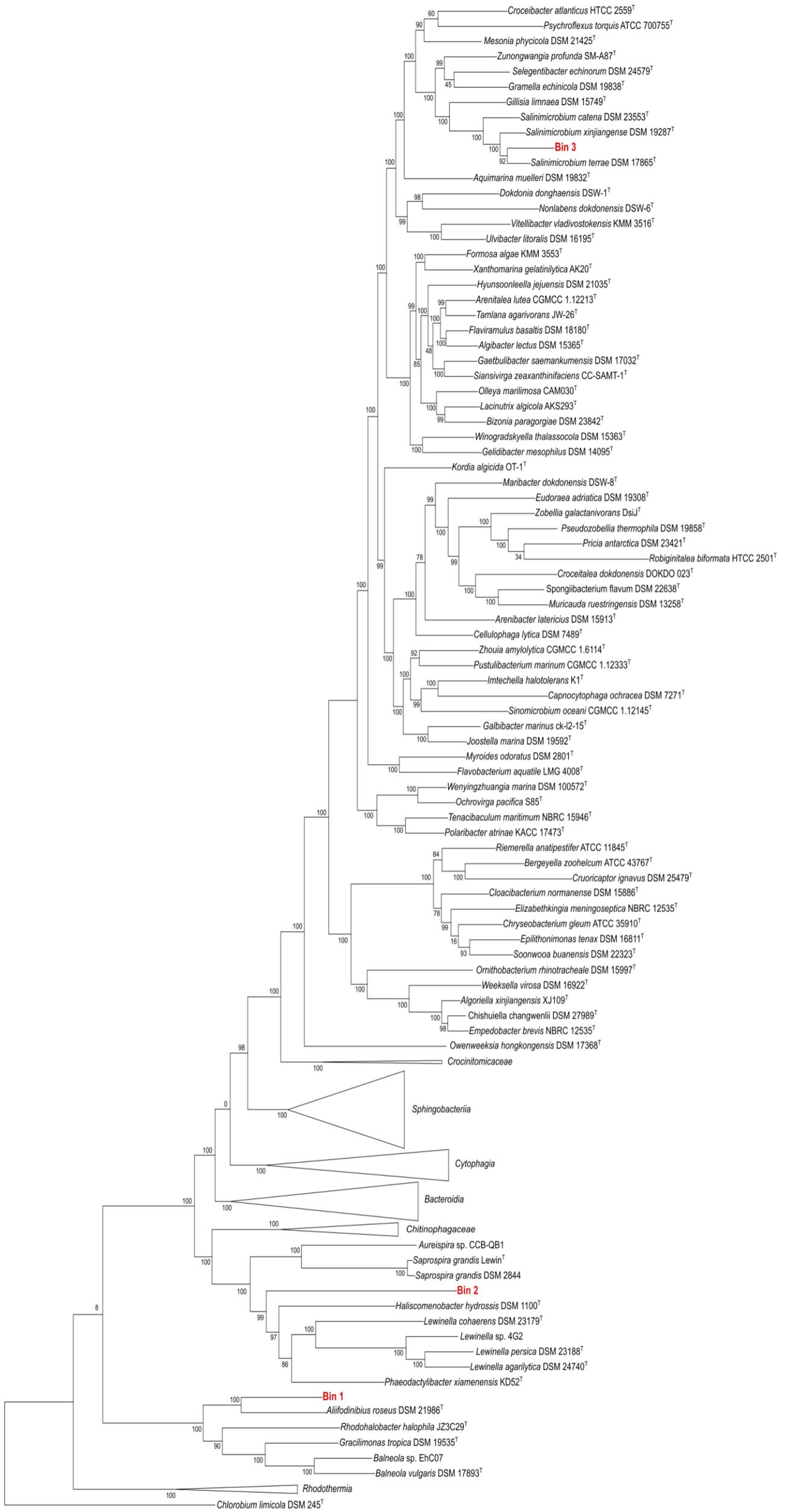
IV.1.8.2 Estimación de la posición filogenética

El análisis filogenómico de los genomas ambientales completos en más de un 50 % reveló que éstos se afiliaban a la recientemente propuesta familia *Balneolaceae* (Figura 7), que engloba a los géneros *Aliifodinibius*, *Balneola*, *Fodinibius*, *Gracilimonas* y *Rhodohalobacter*, y que constituía uno de los phyla principales representados en estos suelos (Figura 5), al orden *Saprospirales* (compuesto por las familias *Haliscomenobacteraceae*, *Lewinellaceae* y *Saprospiraceae*) y al género *Salinimicrobium* (*Flavobacteriaceae*), ambos pertenecientes al phylum *Bacteroidetes* (Figura 7).

El cómputo del valor de ANI (Average Nucleotide Identity) entre el genoma recuperado relacionado con la familia *Balneolaceae* y los disponibles en las bases de datos públicas de esta misma familia mostró que no correspondía a ninguna de las especies con genoma disponible, ya que los valores de ANI eran inferiores a 95 %. El genoma reconstruido podría pertenecer a un género no descrito de esta familia, o bien al género *Fodinibius*, del cual no existe genoma secuenciado disponible en las bases de datos y, por ello, no ha podido ser incluido en el análisis filogenómico.

Tabla 13. Valores de ANI (%) entre los genomas de las especies tipo del phylum Balneolaeota y el bin 1.

	<i>Aliifodinibius roseus</i> DSM 21986 ^T	<i>Balneola vulgaris</i> DSM 17893 ^T	Bin 1	<i>Gracilimonas tropica</i> DSM 19535 ^T	<i>Rhodohalobacter halophilus</i> JZ3C29 ^T
<i>Aliifodinibius roseus</i> DSM 21986 ^T	100,0	66,6	69,8	67,9	67,6
<i>Balneola vulgaris</i> DSM 17893 ^T	66,6	100,0	66,3	68,9	67,4
Bin 1	69,8	66,3	100,0	67,8	67,4
<i>Gracilimonas tropica</i> DSM 19535 ^T	67,9	68,9	67,8	100,0	68,3
<i>Rhodohalobacter halophilus</i> JZ3C29 ^T	67,6	67,4	67,4	68,3	100,0



0.10

Figura 20. Árbol filogenómico de los phyla *Bacteroidetes* y *Balneolaeota* basado en la concatenación de los genes marcadores del programa PhyloSift v1.0.1. La longitud de rama representa en número de sustituciones por sitio y el valor del nodo representa la confianza de dicha separación. *Chlorobium limicola* DSM 245T fue utilizado como *outgroup*.

IV.1.8.3 Análisis genómico

En el análisis genómico de los genomas recuperados destaca el alto número de proteínas relacionadas con resistencia a metales como el cobre, cobalto, zinc, cadmio, mercurio y arsénico, en comparación con los genomas disponibles de microorganismos cercanos filogenéticamente. De este modo, aunque estos suelos no se consideran contaminados de acuerdo a los valores legalmente establecidos a tal efecto, los microorganismos más abundantes poseen mecanismos de detoxificación frente a algunos metales.

En comparación con el resto de los representantes del phylum *Balneolaeota* cuyo genoma está disponible en el momento de análisis, el bin 1 posee una mayor proporción de genes relacionados con reparación de daño en ADN, latencia y esporulación, metabolismo de glicina y genes de resistencia a compuestos tóxicos. Además, codifica genes de síntesis de carotenoides y una proteorrodopsinas cuyo mejor hit resultó ser la xantorrodopsina de *Salinibacter*. Aunque no se detectan secuencias relacionadas con proteínas de membrana con actividad fotoquímica en el genoma del resto de aislados de este phylum, Vavourakis y colaboradores detectaron una rodopsina de bombeo de sodio en un genoma ambiental relacionado con el género *Balneola* recuperado a partir de metagenomas de lagos alcalinos salinos de la región de Altai (Rusia) (Vavourakis et al., 2016), lo cual sugiere que probablemente existen representantes de este grupo capaces de explotar la energía solar para llevar a cabo procesos celulares. Los taxones descritos del phylum *Balneolaeota* requieren de un 5 a un 10 % NaCl para crecer y han sido aislados de una gran diversidad de hábitats, desde ambientes marinos a sedimentos hipersalinos. Los solutos compatibles empleados por estos organismos parecen ser diversos: mientras que en el genoma de *Balneola* disponible se encuentran transportadores de betaína y glicerol, el genoma de la especie tipo de *Rhodohalobacter* codifica proteínas de transporte de colina y una colina deshidrogenasa. El genoma de *Aliifodinibius roseus* DSM 21986 no contiene secuencias relacionadas con el transporte o síntesis de solutos compatibles. En el genoma extraído, como en el de *Gracilimonas tropica* DSM 17893, se encuentran anotados transportadores de betaína y colina.

El bin relacionado con el orden *Saprospirales* es el que contenía un menor número de secuencias relacionadas con resistencia a compuestos tóxicos, de los recuperados a partir de estos metagenomas de suelo. En este genoma también se identificaron genes relacionados con formación de la cápsula y estado de latencia. Las secuencias anotadas como citocromo c oxidasa y las de la ruta de fermentación a butirato nos hacen predecir que este microorganismo podría tener la capacidad de crecer tanto aeróbica como anaeróbicamente.

El genoma relacionado con el género *Salinimicrobium* recuperado en nuestro estudio codifica una proteína de transporte de colina y la ruta de biosíntesis de trehalosa. Atendiendo a su secuencia genómica, *Salinimicrobium xinjiangense* y *Salinimicrobium terrae* podrían también

utilizar la trehalosa como soluto compatible. La estrategia de osmoadaptation del resto de taxones de este género, que comprende halotolerantes y halófilos débiles, no ha sido descrito. No se detectaron secuencias relacionadas con motilidad. El crecimiento anaerobio de los microorganismos representados por este genoma parece factible dado que se encuentran genes relacionados con desnitrificación y fermentación.

Con respecto al genoma relacionado con arqueas, análisis por medio del programa BLAST de varias proteínas ribosomales que en él aparecen determinaron que estaba relacionado con la clase *Halobacteria*. Un ~22 % de las secuencias anotadas en categorías SEED correspondían a proteínas transportadoras de membrana (principalmente de oligopéptidos y aminoácidos ramificados) y otro ~13 % se asignaban a secuencias de resistencia a compuestos tóxicos. El transportador de glicina betaína BetT y el de colina OpuD y una colina sulfatasa (EC 3.1.6.6) estaban presentes en este genoma. La presencia de estos genes relacionados con el transporte de osmolitos no implica necesariamente la utilización de la estrategia *salt-out* por parte de esta haloarquea, dado que estos osmolitos pueden servir como fuente de carbono, nitrógeno y/o energía, así como de sustancias termoprotectoras (Becker et al., 2014). Aunque no detectamos genes de rodopsinas en este genoma, un dominio activador de bacteriorrodopsina pudo ser anotado en una proteína.

IV.1.8.4 Ecología

Análisis de reclutamientos genómicos mostraron que el representante de *Balneola* cuyo genoma fue recuperado no era abundante en otros ambientes acuáticos hipersalinos (Figura 8). Hollister y colaboradores también encontraron en sus investigaciones sobre la microbiota a lo largo de un gradiente de salinidad compuesto por muestras de suelo y sedimento, un grupo de secuencias relacionadas con este phylum, en concreto con el género *Balneola* asociadas únicamente a muestras de suelo (Hollister et al., 2010a), y un reciente estudio metagenómico de resolución genómica llevado a cabo en lagos hipersalinos de naturaleza básica también mostró que el bin obtenido relacionado con este género no constituía una parte importante de la comunidad de estos lagos (Vavourakis et al., 2016), reforzando la idea de que algunos microorganismos podrían habitar diferencialmente ambientes de distinta naturaleza y/o sustrato. En este caso, el contenido en agua del ambiente (mayor en hábitats acuáticos y sedimentos) podría también jugar un papel importante.

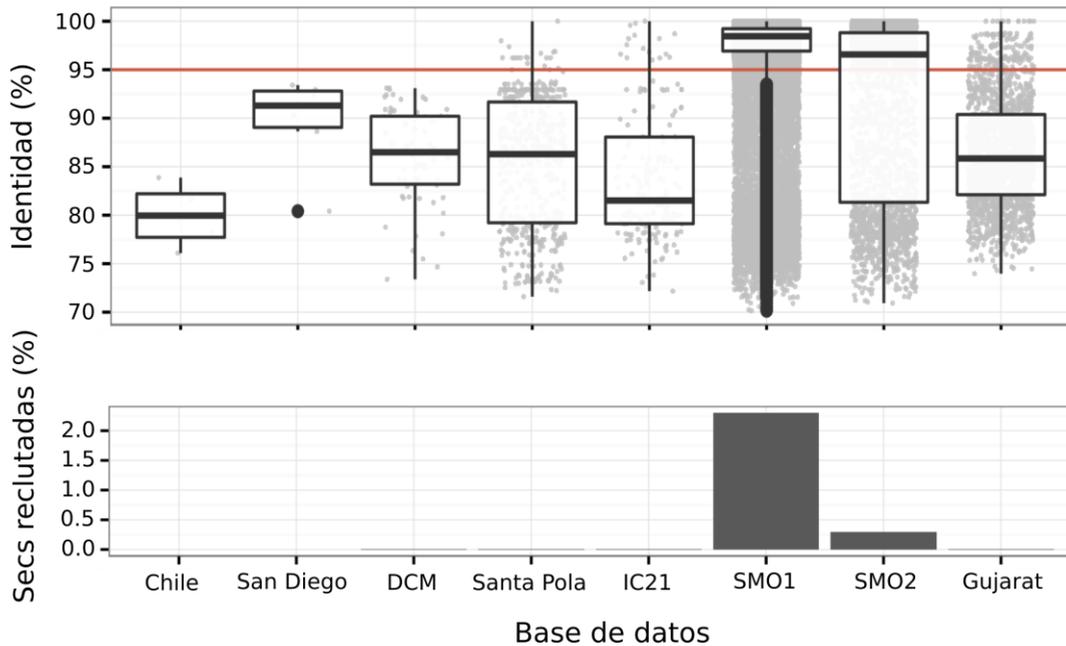


Figura 21. Porcentaje e identidad de secuencias metagenómicas de diversos ambientes salinos con semejanza a la secuencia genómica del bin 1. Las bases de datos de ambientes hipersalinos acuáticos utilizadas fueron: ‘Chile’, que corresponde a la columna de agua de un cristalizador con 34 % de salinidad de la laguna Cahuil (Chile)(Plominsky et al., 2014), ‘San Diego’, resultado de la combinación de las bases de datos metagenómicas de la comunidad microbiana de las salinas de Guerrero Negro (Baja California Sur, México)(Dillon et al., 2013), ‘Santa Pola’, como la combinación de las bases de datos metagenómicas procedentes de la salina Bras del Port, localizada en Santa Pola (Alicante, España)(Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a) e ‘IC21’, correspondiente a la columna de agua de un estanque concentrador de las salinas de Isla Cristina (Huelva, España)(Fernández et al., 2014c). DCM hace referencia a una muestra de agua marina del mar Mediterráneo con una concentración de sales del 3,5 % (Ghai et al., 2010). Las bases de datos metagenómicas de suelos incluidas corresponden a las obtenidas en esta Tesis Doctoral, SMO1 y SMO2 y ‘Gujarat’, la combinación de las bases de datos de suelos salinos localizados en el Great Rann of Kutch (Gujarat, India) (Pandit et al., 2015).

IV.2 CAPÍTULO II

IV.2.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Un total de 48 muestras provenientes de 4 localizaciones representativas de un rango de salinidad y dos profundidades (0-1 cm, 2-4 cm) fueron recogidas y analizadas. Varias características eran compartidas por todas las muestras: alta salinidad (valores $EC_{1.5}$ entre 5,96 y 61,02 dS/m, así como sodio y cloruro como principales iones), bajo contenido de agua (0,08-0,32 %) y bajas concentraciones elementales de carbono (5-31,9 g/kg), nitrógeno (0,12-0,87 g/kg), azufre (0,29-14,16 g/kg) y fósforo (por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras). También presentaban valores similares de pH ($7,0 \pm 1,3$). Estos valores están en consonancia con los obtenidos para las muestras de la localización 1, SMO1 y SMO2, que fueron analizadas con anterioridad. El contenido de Co, Ni, Cr, Cd y Pb estaban por debajo del límite de detección (0,05 mg/kg) en más del 80 % de las muestras, mientras que en las restantes sus niveles eran muy bajos.

Las muestras eran muy variables en cuanto a otros parámetros fisicoquímicos, especialmente en lo que se refiere a los contenidos de Cu, Zn, Fe y Al, que mostraban variaciones de más del 100 % en las muestras de la base de datos, así como en cuanto al DOC (coeficiente de variación, $CV=0,95$). Algunos parámetros específicos que diferían significativamente entre las localizaciones fueron los siguientes: la localización 2 tenía un mayor contenido de agua y manganeso, así como un pH más elevado, mientras que la localización 4 tenía un mayor contenido de hierro y aluminio. Las concentraciones de azufre, fósforo y algunos iones relacionados con la salinidad también diferían significativamente entre las localizaciones. Ningún parámetro del suelo se correlacionaba con la profundidad de muestreo, aunque había diferencias en los valores de conductividad y contenido en Na, Ca, K, Mg, Cl, sulfato, S, Cu y Mn entre las muestras de superficie y subsuperficie en algunas localizaciones.

Algunos de los parámetros evaluados se correlacionaban fuertemente ($r > 0,7$, $p < 0,05$), dificultando el discernimiento de qué propiedades geoquímicas específicas del suelo determinaban la estructura de la comunidad microbiana. Los valores de conductividad se correlacionaban con la concentración de K ($r=0,715$), Na ($r=0,848$), sulfato ($r=0,789$), cloruro ($r=0,828$), Mg ($r=0,722$) y Mn ($r=0,715$). El calcio se correlacionaba positivamente con el sulfato ($r=0,769$) y el contenido de Fe con el de Al ($r=0,699$).

IV.2.2 Composición de la comunidad microbiana

Un total de 263 514 secuencias del gen ARNr 16S fueron agrupadas en 3304 OTUs provenientes de las 46 muestras que superaron los filtros de calidad referidos en Material y Métodos. Los principales phyla representados en estos suelos son *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, de acuerdo con estudios llevados a cabo en otros ambientes hipersalinos acuáticos y terrestres, y con los resultados obtenidos a partir de las los metagenomas de suelos salinos de este mismo paraje detallada en el Capítulo I. Cabe destacar que la constitución de los phyla *Balneolaeota* y *Rhodothermaeota* es reciente y la base de datos de secuencias de

referencia utilizada en este análisis de amplicones, al contrario que la utilizada en el estudio anterior, aún incluye a sus representantes bajo el phylum *Bacteroidetes*.

Las secuencias relacionadas con arqueas suponían del 6,65 al 80,65 % de las lecturas en las muestras. El grupo mayoritario, el orden *Halobacteria* (*Euryarchaeota*), dominaba la microbiota de las localizaciones 1 a 3, mientras que *Bacteroidetes* era el phylum más abundante en la localización 4 (Figura 23).

Globalmente, los géneros de haloarqueas más abundantes eran *Halorubrum* (29,76 % de las secuencias de euriarqueotas), *Natronomonas* (15,15 %) y *Haloarcula* (10,68 %), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otros suelos salinos. *Haloarcula* se encontraba entre los géneros más representados en las dos bases de datos metagenómicas analizadas con anterioridad, mientras que *Natronomonas* y *Halorubrum* también englobaban más de un 1 % de las secuencias relacionadas con el gen ARNr 16S en los dos metagenomas considerados en dicho estudio. *Natronomonas* constituía el género dominante del phylum *Euryarchaeota* en la localización 4, suponiendo la mitad de las secuencias de este grupo, mientras que *Halorubrum* predominaba en el resto de las localizaciones. En estos suelos se identifican secuencias relacionadas con otros géneros de haloarqueas que no constituyen una fracción importante en el resto de los estudios de la microbiota de suelos salinos existentes. Así, “*Candidatus Halobonum*” constituye un 6,37 % de las secuencias relacionadas con *Euryarchaeota*, y no había sido detectado en el estudio metagenómico de estos suelos. *Halolamina* y *Salinigranum*, que junto a *Haloarcula*, constituían los tres géneros de haloarquea más abundantes en ambas bases de datos SMO1 y SMO2, no se encuentran entre los 10 géneros más abundantes en estos suelos. *Salinigranum* ni siquiera se encontraba entre los 20 más abundantes (Figura 24). Constatamos, como en el estudio anterior, la ausencia de secuencias relacionadas con el género *Haloquadratum*.

Con respecto a las secuencias asignadas al dominio *Bacteria*, *Bacteroidetes* (10,52 a 68,54 % de las secuencias) y *Proteobacteria* (2,62-22,25 % de las lecturas) fueron los phyla más abundantes, siendo *Gemmatimonadetes* el siguiente grupo más representado (0,09-14,36 %) (Figura 23).

De los 22 géneros pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*, el más abundante en el conjunto de todos los datos fue *Salinibacter*, que comprendía un 24,31 % de las secuencias asignadas a este grupo y constituía así el género bacteriano con mayor representación. Este género, que comparte hábitat con *Haloquadratum* en estanques cristalizadores de salinas, ha sido identificado como abundante en otros estudios de ambientes hipersalinos acuáticos y suelos salinos, así como en el estudio metagenómico detallado en el capítulo I, donde solo se encontraba representado por más de un 1 % de las secuencias en uno de los momentos de muestreo (SMO1). Sin embargo, su representación era muy baja en la localización 4 de este

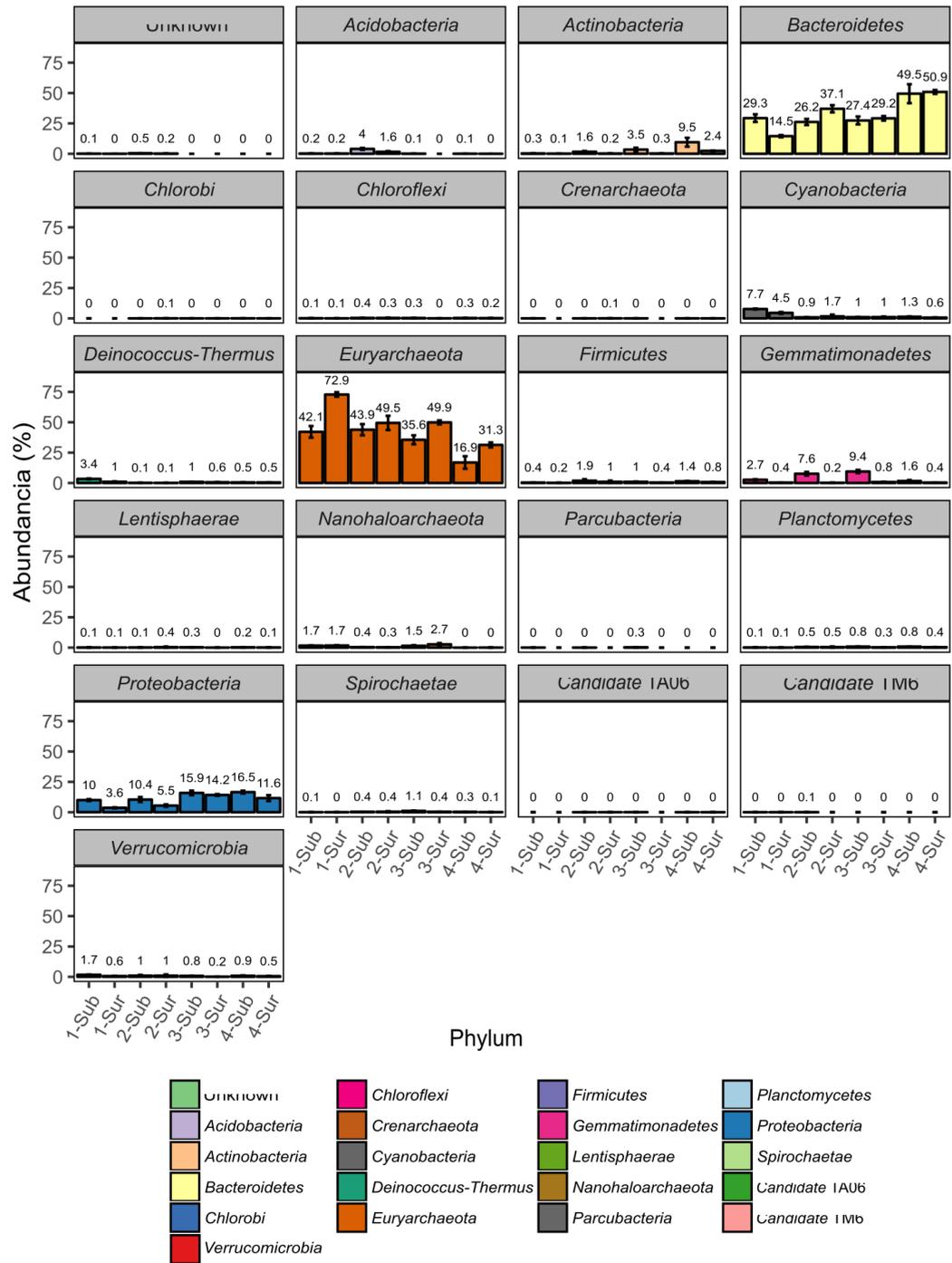


Figura 22. Abundancia relativa de los phyla detectados en las muestras de suelos salinos estudiados.

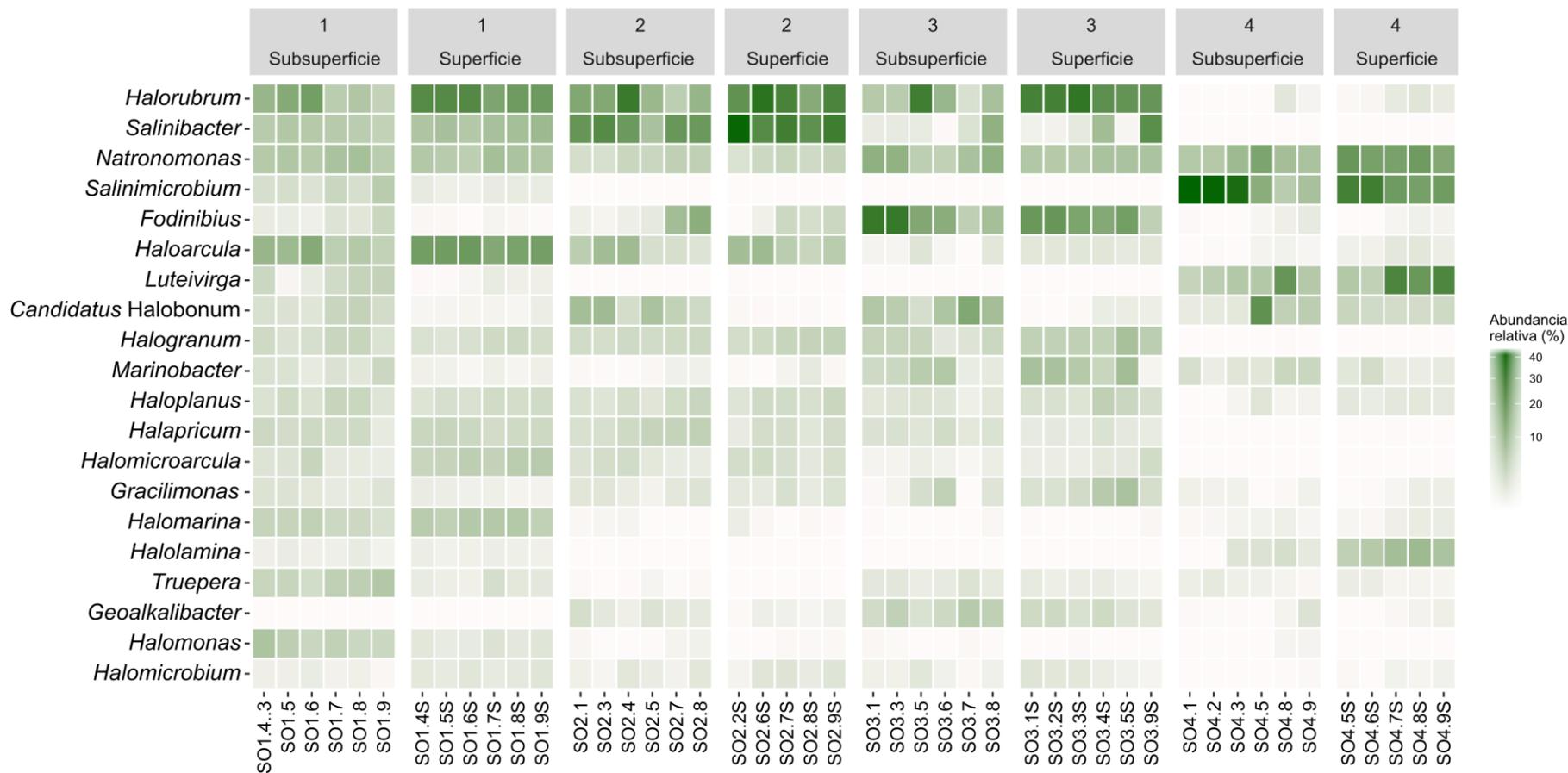


Figura 23. Mapa de calor de la abundancia relativa de los 20 géneros más representados en todas las muestras, evaluado a partir de la media en el conjunto de las bases de datos.

muestreo, donde *Luteivirga* era el género bacteroides predominante. *Fodinibius* (14,78 % de *Bacteroidetes*, actualmente perteneciente a *Balneolaeota*) y *Salinimicrobium* (16,96 %), los géneros bacterianos más abundantes en SMO1 y SMO2, respectivamente, fueron los siguientes géneros de *Bacteroidetes* más representados por el conjunto de las secuencias de todas las localizaciones, aunque su abundancia variaba en función del sitio de muestreo, predominando en la localización 4 y 3, respectivamente. De manera similar a *Fodinibius*, *Luteivirga* es un género descrito en 2013 con una única especie descrita (que se encontraba en asociación con la esponja mediterránea *Axinella polypoides*) (Haber et al., 2013) que no se ha detectado como abundante ni se ha aislado en ningún otro estudio de la microbiota de ambiente salino. *Gracilimonas*, otro representante del actual phylum *Balneolaeota* y, así como los metabólicamente versátiles *Marinobacter* y *Halomonas* (*Proteobacteria*), que también fueron identificados en el estudio metagenómico, así como *Geoalkalibacter* (*Proteobacteria*), que es capaz de utilizar metales para el metabolismo respiratorio, y *Truepera* (*Deinococcus-Thermus*), reconocido por su capacidad de resistir altos niveles de radiación ionizante, también se encontraban entre los 20 géneros más representados (evaluado en base a la abundancia media de estos en el conjunto de todas las muestras estudiadas).

La proporción de lecturas asignadas a cada taxón del phylum *Proteobacteria* detectado (39 familias y 53 géneros) variaba en función de la localización. La localización 1 estaba dominada por *Halomonadaceae* (33,83 %), la localización 2 por bacterias no cultivadas del grupo GR-WP33-58 (20,21 %), la localización 3 por *Alteromonadaceae* (27,13 %), y *Rhodobacteraceae* (43,57 %) era la familia más abundante en la localización 4. Un 27,70 % de las lecturas asignadas a *Proteobacteria* no pudieron ser clasificadas a nivel de género, y un 15,90 % estaban relacionadas con microorganismos no cultivados. Aproximadamente un tercio de las secuencias no clasificadas se afiliaban a la familia *Rhodobacteraceae*, y esa misma familia, junto con *Ectothiorhodospiraceae*, eran las más representadas entre los microorganismos no cultivados.

El phylum candidato *Nanohaloarchaeota*, detectado en el estudio metagenómico (Capítulo I), constituía hasta un 5 % de las lecturas en algunas de las muestras. Por el contrario, las secuencias relacionadas con *Crenarchaeota* se encontraban en bajas proporciones ($\leq 0,33$ %) en todos los casos (Figura 23), de acuerdo con los estudios anteriores.

Entre los phyla minoritarios representados en más de un 20 % de las muestras se incluían *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Spirochaetae*, *Chloroflexi*, *Lentisphaera*, *Acidobacteria*, *Chlorobi* y los phyla candidatos *Parcubacteria* (también denominado OD1), *TM6* (o *Dependentiae*) y *TA06* (Figura 23).

Aunque 7 phyla (*Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Deinococcus-Thermus* and *Firmicutes*) estaban presentes en todas las muestras, solamente dos OTUs, relacionados con el género *Natronomonas*, se encontraron en todas las bases de datos (Figura 25). De entre éstos, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* contienen microorganismos halófilos, mientras que *Gemmatimonadetes* y *Deinococcus-Thermus* han sido detectados en suelos salinos con anterioridad, aunque no se conocen representantes de estos grupos con un requerimiento de NaCl de más de un 1 % (Kushner & Kamekura, 1988). Ésta es también la situación del resto de phyla

minoritarios detectados en este estudio salvo *Verrucomicrobia*, que incluye halófilos. Este hecho ya fue observado en el estudio metagenómico anterior. La alta heterogeneidad de la estructura del suelo, así como el bajo contenido en agua podrían dar lugar a micronichos desconectados entre ellos que posean diferentes condiciones ambientales y, por tanto, puedan sustentar microorganismos con diversas adaptaciones (Tecon & Or, 2017), aunque también es posible que existan microorganismos de estos grupos con susceptibilidades a la sal diferentes a los ya descritos.

A todos los niveles taxonómicos se encontró una fracción de lecturas que no pudieron ser relacionadas con secuencias en las bases de datos. A nivel de género, un total de 38 179 secuencias (14,49 %) no pudieron ser clasificadas con los parámetros empleados en este estudio. Las secuencias no clasificadas estaban distribuidas de forma diferente entre dominios: mientras que un 26,76 % de las secuencias bacterianas permanecieron sin clasificar a este nivel, solamente un 0,77 % de las secuencias de arqueas se encontraron en esta misma situación. Como ya se ha comentado, otros estudios de suelos salinos ya reportaron que una fracción relevante de secuencias no estaban relacionadas con las existentes en las bases de datos. Los resultados son coherentes con el metaanálisis de Ma y Gong donde determinaron que la diversidad de bacterias y arqueas aún por descubrir en suelos salinos constituía un 75 y un 50 %, respectivamente (Ma & Gong, 2013), y reflejan el esfuerzo de aislamiento en cultivo puro aún necesario para caracterizar completamente la microbiota de este tipo de hábitats.

IV.2.3 Relación entre las propiedades del suelo y la estructura de la comunidad microbiana

Los análisis de correlación entre la abundancia de estos géneros y los parámetros fisicoquímicos determinados de las muestras mostraron que tan solo los valores de abundancia de *Candidatus Halobonum* se asociaban a las medidas de conductividad ($r=-0.59$, $p<0.01$), mientras que otras propiedades de estas muestras, como el contenido en agua, pH, textura, cantidad de S, P, K, Ca, Na, sulfato, Cl, Cu, Al y Fe se relacionaban con la abundancia de otros de estos géneros.

Fodinibius fue el género con una prevalencia mediana de sus OTUs más elevada. Aparte de *Natronomonas*, que parecía estar presente y ser relativamente abundante en todas las muestras, los géneros principales estaban diferencialmente representados entre localizaciones. Mientras que *Halorubrum* y *Salinibacter* eran abundantes en las localizaciones 1 a 3, *Fodinibius* era abundante en la localización 3, y *Haloarcula* en la 1. Las muestras de la localización 4 no contenían secuencias relacionadas con el género *Salinibacter*, y el número de las relacionadas con *Halorubrum* y *Fodinibius* era bajo. Abundaban, sin embargo, *Salinimicrobium* y

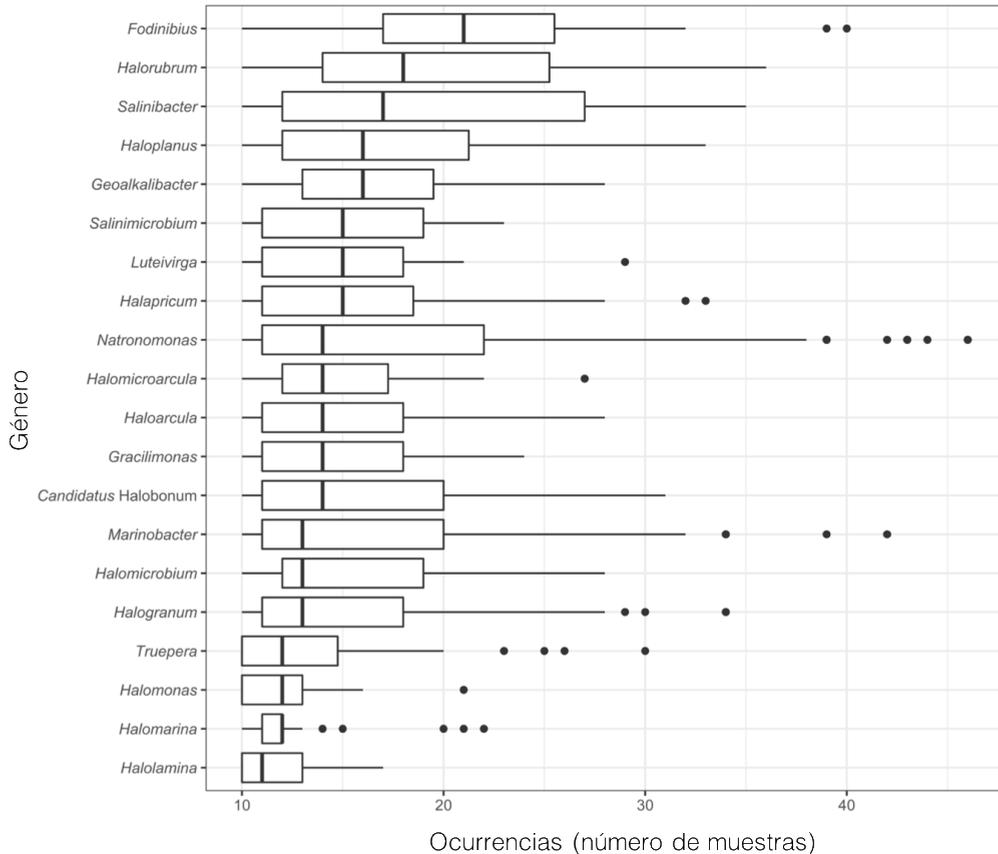


Figura 24. Distribución de los OTUs afiliados a los 20 géneros más abundantes.

Luteivirga (Figura 24). A nivel de OTU, ningún filotipo pudo considerarse indicador de una localización o profundidad determinada, de acuerdo con el valor indicador propuesto por Dufrêne-Legendre, que considera fidelidad y abundancia en cada grupo. La mayoría de OTUs estaban presentes en más de 1 localización, pero solamente 50 (1,51 % del número total de OTUs; principalmente afiliados a *Natronomonas*, pero también a *Marinobacter*, *Fodinibius*, *Halogramum* y *Halapricum*) fueron encontrados en más de 3 localizaciones (~ 34 muestras). *Fodinibius* fue el género con una prevalencia mediana de sus OTUs más elevada y solamente dos OTUs relacionados con *Natronomonas* eran compartidos por todas las muestras, sugiriendo que ciertas propiedades de los suelos incluidos en el estudio impedían que un mayor número de OTUs estuvieran presentes en un alto número de muestras y podrían desempeñar un papel clave en la determinación de la estructura microbiana en los mismos. De esta manera, aunque el alto contenido en sal en todas las muestras determina la naturaleza halofílica de la mayoría de los habitantes de estos suelos, características específicas de cada sitio parecen definir la abundancia de cada taxón en cada muestra.

El análisis de la relación entre la estructura microbiana de las muestras, evaluada mediante análisis de ordenación NMDS, corroboraron esto, ya que las muestras se agrupaban en función de la localización o lugar de muestreo. Una agrupación secundaria pudo observarse para aquellas muestras de la misma profundidad dentro de una misma localización. A continuación, investigamos

los parámetros fisicoquímicos susceptibles de afectar a la composición de la comunidad microbiana en los rangos considerados en este estudio. Las variables del medio como el contenido de arena, limo o agua, el pH, azufre y fósforo total, sulfato, calcio, aluminio y hierro, pero no la conductividad, se correlacionaban significativamente con la estructura de la comunidad (Figura 26). El test “bioenv” (vegan) mostró que, entre todas las variables fisicoquímicas consideradas, la combinación del contenido de arena, limo y aluminio se correlacionaba mejor con los cambios en la composición de la comunidad ($r=0,654$). El análisis PERMANOVA indicó que los parámetros correlacionados con la comunidad según el vector *fitting* y el análisis “bioenv” eran estadísticamente significativos. Todos estos parámetros eran estadísticamente diferentes entre localizaciones, pero no todas las propiedades determinadas como diferentes entre lugares de muestreo fueron identificadas como relevantes en los cambios en la estructura de la comunidad microbiana. Las relaciones entre el pH, P, S, humedad relativa y textura con la estructura de la comunidad microbiana en suelos salinos ha sido identificada con anterioridad (Hollister et al., 2010a; Chowdhury et al., 2011; Liu et al., 2018; Zhao et al., 2018). Con respecto al contenido en metales, tan solo la cantidad de aluminio y hierro, que se encuentran en altas proporciones en la localización 4 y es responsable parcial de la separación de las muestras de este lugar de muestreo de las demás, mostraron relacionarse con un cambio en la estructura de la comunidad, a pesar de que la salinidad ha demostrado propiciar la movilización y por lo tanto la biodisponibilidad y toxicidad de metales en suelos (Du Laing et al., 2008; Acosta et al., 2011). La influencia del contenido en Al en la estructura de la comunidad microbiana de hábitats con pH alrededor de la neutralidad no ha sido descrita hasta la fecha.

El aluminio es un elemento muy abundante en la corteza terrestre que no tiene ningún papel biológico conocido (Piña & Cervantes, 1996; Bojórquez-Quintal et al., 2017a). Posee una química compleja, y su especiación está gobernada principalmente por el pH, de manera que su biodisponibilidad aumenta al disminuir el pH, aunque también influyen otros factores como la fuerza iónica, la concentración de solutos inorgánicos o de agentes complejantes (Piña & Cervantes, 1996; Gensemer & Playle, 1999; Bojórquez-Quintal et al., 2017b). Proponemos, pues, que los posibles efectos del Al en la estructura de la comunidad procariota se producen debido al efecto de otros componentes de estos suelos sobre su biodisponibilidad. Sin embargo, el contenido en Al y Fe de estos suelos está correlacionado, lo cual impide la determinación de la contribución de cada una de estas variables por separado.

En este estudio, los factores ‘localización o lugar de muestreo’, ‘profundidad’ y ‘conductividad’ explicaban 55,5 %, 5,1 % y 8,2 % de la variabilidad en la comunidad procariota, respectivamente (Tabla 13). Es decir, la salinidad (evaluada como la conductividad eléctrica en un extracto acuoso de suelo 1:5 p/v) no se encuentra entre los factores con mayor influencia sobre la composición de la comunidad o la abundancia de los géneros mayoritarios. Estos resultados

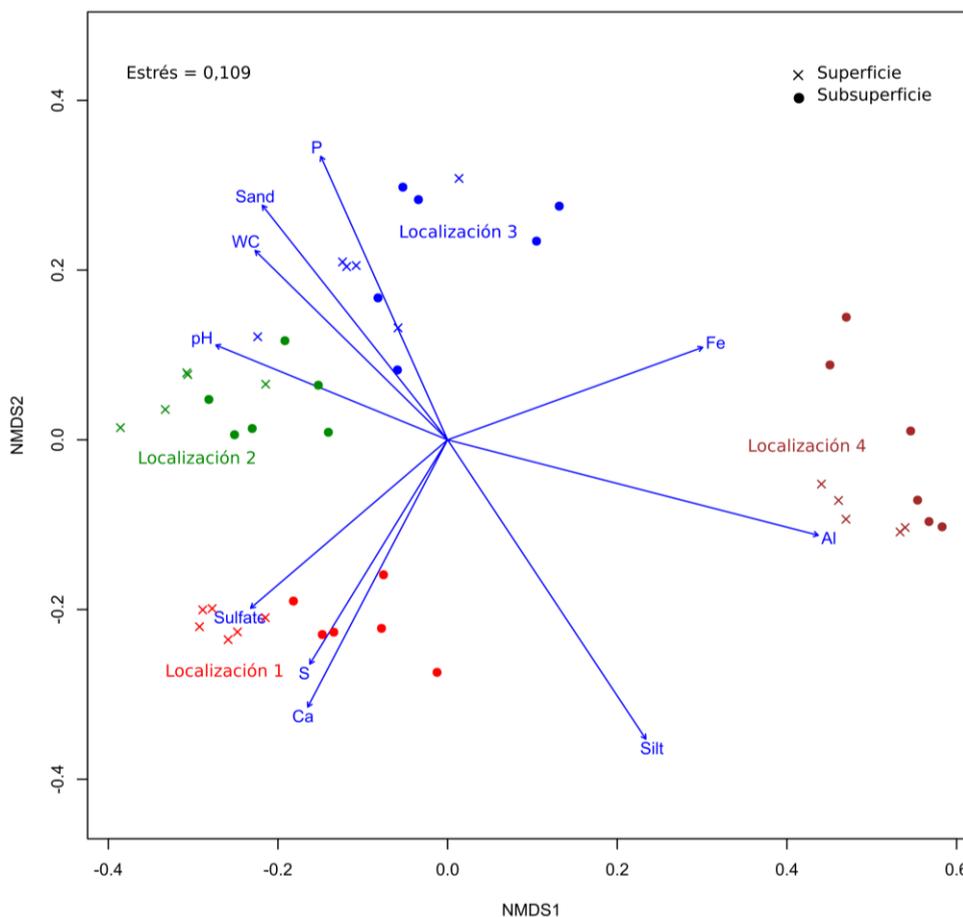


Figura 25. Ordenación NMDS que muestra el agrupamiento de las secuencias de acuerdo con la medida de diversidad Bray-Curtis calculada a nivel de OTU. Los parámetros físico-químicos correlacionados significativamente con los ejes del gráfico de ordenación se encuentran representados en el mismo.

sugieren que la influencia del contenido en sal del suelo sobre la microbiota de estos suelos altamente salinos es limitada, probablemente debido al grado de especialización a la vida en condiciones salinas de los principales procariotas. Aunque la salinidad ha sido propuesta como uno de los factores primordiales que gobiernan la estructura de la comunidad microbiana (Rietz & Haynes, 2003; Lozupone & Knight, 2007; Navarro-Noya et al., 2015a; Zhong et al., 2016), este no es el primer estudio en el que esta influencia crítica de la salinidad sobre la microbiota no se observa (Hollister et al., 2010b; Bates et al., 2011; Chambers et al., 2016). Hollister y colaboradores propusieron que, una vez superado un cierto nivel de salinidad, el contenido en sal ejercería una menor influencia debido a que a partir de ese punto la mayor parte de los microorganismos serían halófilos o halotolerantes capaces de crecer o sobrevivir en esas condiciones (Hollister et al., 2010a). Teniendo en cuenta que la muestra de menor conductividad en nuestro estudio ($EC_{1:5}=5,96$) era altamente salina, y que la comunidad microbiana estaba constituida principalmente por microorganismos halófilos, nuestros resultados sustentan dicha hipótesis. Es más, varios de los microorganismos halófilos aislados de hábitats terrestres han mostrado ser

especialmente flexibles en el rango de salinidades externas que pueden soportar (Quesada et al., 1982; Caton et al., 2004; Purdy et al., 2004; Savage et al., 2007), y se ha propuesto que la salinidad tiene un efecto menor en el suelo frente a los ambientes acuáticos (Xie et al., 2017). El hecho de que tan solo uno de entre los 20 géneros más abundantes se correlacione con los valores de conductividad y la alta ocurrencia de algunos filotipos en el conjunto de muestras apoya esta hipótesis. Por ello, proponemos que el nivel de salinidad considerado en cada estudio particular, junto con la naturaleza del hábitat (suelos frente a aguas) podrían considerarse factores clave durante el proceso de integración de los resultados de influencia de salinidad en la estructura de la comunidad microbiana.

Sin embargo, los iones Ca y sulfato, relacionados con la salinidad y correlacionados entre ellos en este estudio, aparecen asociados a los cambios en la comunidad procariota en nuestro estudio, sugiriendo que toxicidades específicas de cada ion, en vez del efecto osmótico en el que participan, son importantes en la estructuración de la comunidad procariota en el rango de salinidad considerado. Otros autores han constatado que los efectos causados por los iones salinos no podían ser explicados únicamente por el estrés osmótico o actividad de agua (Lloret et al., 1995; de Lima Alves et al., 2015; Fox-Powell et al., 2016).

Tabla 14. Resultados de la prueba PERMANOVA para evaluar el efecto de los indicadores geoquímicos seleccionados en la comunidad procariota del suelo.

Variable	R ²	P
Localización	0,555	0,001
Profundidad	0,051	0,001
Humedad	0,131	0,001
pH	0,113	0,001
Arena	0,164	0,001
Limo	0,148	0,001
Carbón	0,045	0,037
Fe	0,103	0,001
Al	0,193	0,001
S	0,079	0,002
P	0,114	0,001
Sulfato	0,099	0,001
Ca	0,091	0,001
Conductividad	0,082	0,002

IV.2.4 Medidas de diversidad y correlación con las propiedades del suelo

La diversidad alfa, evaluada en base a los índices de Shannon y Simpson, no era significativamente diferente entre las muestras de superficie y subsuperficie, aunque se observaba una tendencia que sugería que las muestras de superficie (0-1 cm) eran menos diversas que aquellas de la subsuperficie (2-4 cm) (Figura 27). Aunque la diversidad evaluada en base al índice de Shannon y la dominancia (estimada mediante el cálculo del índice de Simpson) eran elevadas en todas las localizaciones consideradas (5,32 a 6,71 y 0,98 a 0,99, respectivamente), la localización 1 presentaba una diversidad y dominancia significativamente más elevadas que el resto, mientras que la localización 4 era menos diversa y mostraba una menor dominancia. Los índices calculados no se correlacionaban con los parámetros fisicoquímicos de las muestras considerados en este estudio.

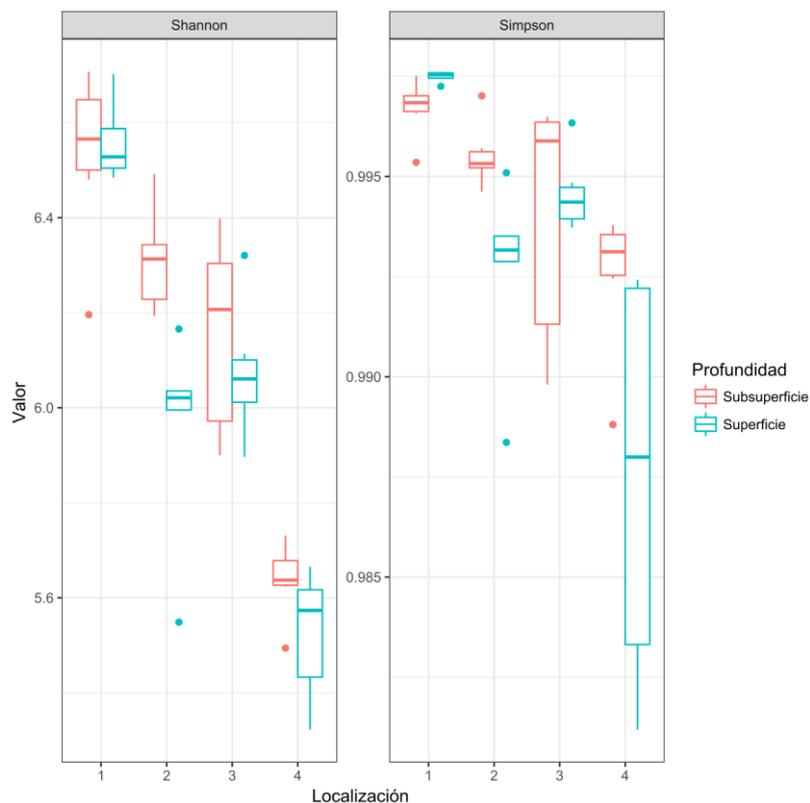


Figura 26. Medidas de alfa diversidad calculadas a nivel de OTU de cada sitio y profundidad muestreados. Los lugares de muestreo con diversidad significativamente diferentes se encuentran marcados con letras distintas.

IV.3 CAPÍTULO III

IV.3.1 Influencia de la salinidad sobre la comunidad procariota de suelos salinos

En estos suelos, la proporción de procariotas productores primarios es escasa con respecto a la vasta comunidad heterótrofa presente. Además, los suelos salinos estudiados se encuentran desprovistos de organismos superiores como plantas que podrían proporcionar sustratos a los microorganismos que allí se encuentran. Por lo tanto, se desconoce si la comunidad procariota de estos suelos descrita en los capítulos anteriores se encuentra activa metabólicamente y, en ese caso, cuáles son los sustratos que permiten su desarrollo. En este capítulo nos propusimos dilucidar las relaciones tróficas de la comunidad procariota presente en estos suelos, mediante la determinación de la influencia de la luz como fuente de energía para los mismos.

La incubación de muestras de suelo salino por triplicado en condiciones de luz y oscuridad durante tres semanas dio lugar a comunidades estadísticamente diferentes según las pruebas de adonis2 y anosim. A pesar de la variabilidad intermuestra, especialmente en condiciones de luz, se observa la separación de los grupos de muestras (luz/oscuridad) en el primer eje, esto es, el que más variabilidad entre muestras explica, del gráfico de ordenación basado en el índice de disimilitud Bray Curtis (Figura 28). Estos resultados indican que la luz tiene una influencia en la composición de la comunidad microbiana del hábitat estudiado. La luz actúa como fuente de energía para los organismos fotótrofos (Hamilton *et al.* 2015). Se trata de la principal fuente de energía de los productores primarios fotosintéticos, organismos que sustentan las cadenas tróficas produciendo compuestos metabolizables por el resto de la comunidad heterotrófica. En la actualidad, se han identificado microorganismos con estas capacidades en 7 phyla bacterianos: *Acidobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Hamilton *et al.* 2015). La luz es un recurso ampliamente disponible en muchos ambientes hipersalinos y una gran variedad de microorganismos halófilos heterótrofos han adquirido la capacidad de utilizarla como fuente de energía mediante rodopsinas, principalmente en condiciones de estrés (nutricional, etc.) (Pinhassi *et al.* 2016). La capacidad de producir rodopsinas está muy extendida, especialmente en ambientes marinos y en ambientes hipersalinos (Béjà *et al.* 2001, Bodaker *et al.* 2012, Finkel *et al.* 2013, Pinhassi *et al.* 2016). Finkel y colaboradores (2013) detectaron la presencia de genes relacionados con rodopsinas en metagenomas de ambientes terrestres; y en el análisis de los metagenomas completos de estos mismos suelos salinos en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral reveló la presencia de genes relacionados con estos pigmentos. De esta manera, las diferencias en la estructura de la comunidad detectadas en las muestras de suelos incubadas en condiciones de luz u oscuridad podrían ser debidas bien a un aumento de la producción primaria y la síntesis de sustratos por parte de los organismos fotosintéticos de estos suelos, o bien al uso de rodopsinas para obtener energía en las condiciones encontradas en estos suelos. Los principales filotipos más representados en condiciones de luz que de oscuridad son los OTUs 2 y 17 (afiliados al género *Natronomonas*), 8, 11 y 19 (relacionados con el género *Halorientalis*), 1 (*Halosiccatus*) y 3 (*Halomicrobium*) (Figura 28).

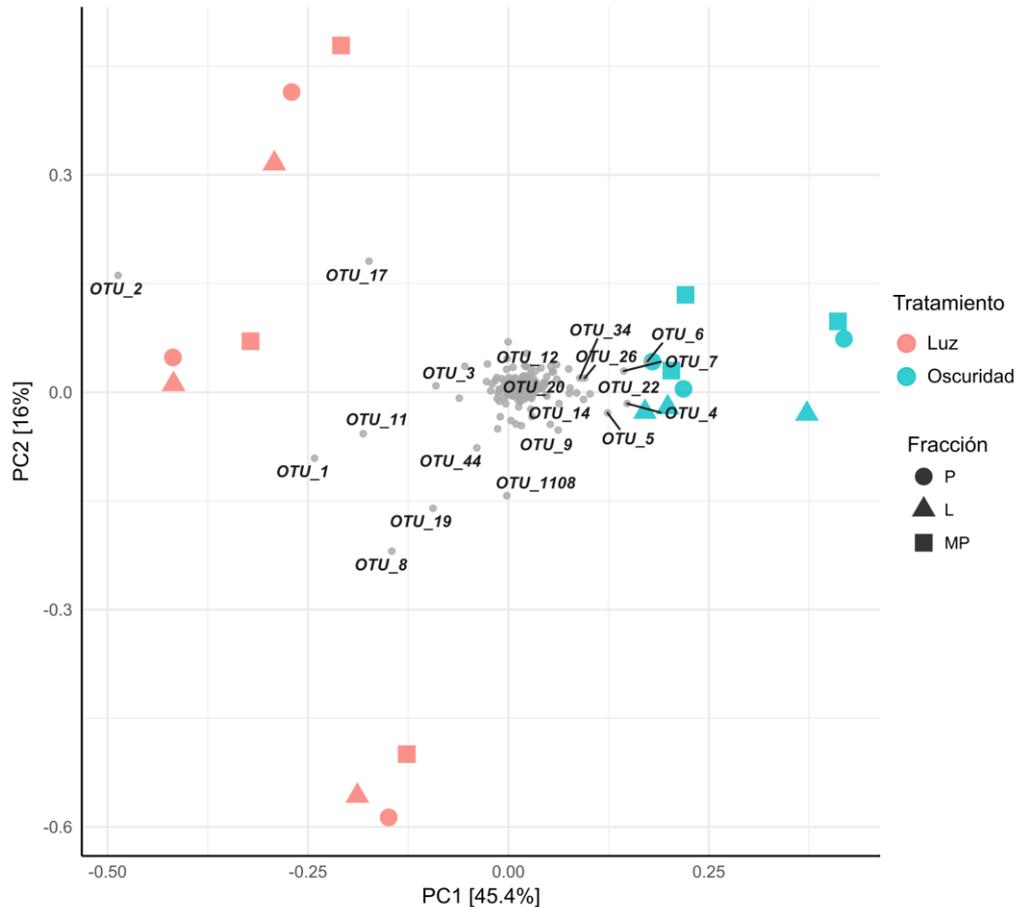


Figura 27. Gráfica de ordenación que muestra la agrupación de las muestras incubadas en luz y en oscuridad durante tres semanas en función del índice de disimilitud de Bray-Curtis calculado a nivel de OTU.

Con el objetivo de determinar los principales grupos de microorganismos que varían en una y otra condición, se llevó a cabo un experimento de marcaje con isótopos estables en las mismas condiciones de luz y oscuridad en el que, tras llevar el suelo a la mitad de su contenido en agua inicial, la humedad relativa se recuperó añadiendo H_2O^{18} . Para discernir entre el efecto de los productores primarios y el de las rodopsinas en las diferencias en la estructura de la comunidad se incluyeron controles con un compuesto inhibidor del fotosistema II (diurón, o DCMU, 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), ya utilizado con anterioridad por otros autores para el estudio de la contribución de la producción primaria fotosintética y las rodopsinas en una columna de agua hipersalina (Oren 2016).

La medida de la abundancia relativa de genes relacionados con el gen ARNr 16S encontrados en cada fracción de diferente densidad recuperada de los gradientes de densidad obtenidos por centrifugación isopícnica del ADN de cada muestra reveló que, en las condiciones ensayadas, el ADN de arqueas aparecía a densidades superiores a las encontradas en las muestras control tratadas con H_2O tanto en luz como en oscuridad, lo cual indica que este grupo procariota había crecido activamente e incorporado el agua con el isótopo de oxígeno más pesado (Figuras 29 y 30).

Esta situación contrasta con el resultado obtenido para el dominio *Bacteria*, donde tan solo una minoría de sus representantes contienen ADN más pesado (Figuras 29 y 30).

Estos resultados sugieren que las arqueas de estos suelos sobreviven mejor a oscilaciones en el contenido en agua o períodos de desecación, que son comunes en dicho hábitat o bien son más competitivas en las condiciones objeto de estudio, pudiendo encontrarse las bacterias en estado de latencia esperando condiciones más favorables para su desarrollo o haber muerto en el período de desecación. Van de Vosseberg y colaboradores (1998) ya propusieron que los representantes del dominio *Archaea* se encontraban mejor preparados para resistir condiciones extremas, dadas las peculiares características de sus membranas.

Nuestros resultados constituyen la primera evidencia de que, al menos una parte de la comunidad microbiana se encuentra activa en las extremas condiciones de estos suelos. Cabe destacar, una vez más, que la mayor parte de los microorganismos activos son arqueas (probablemente del orden *Halobacteria*, como ya se describió en los capítulos anteriores) y, por lo tanto, la comunidad activa es principalmente heterótrofa, lo cual destaca la importancia de determinar los sustratos que las sustentan, ya que la escasa representación de posibles productores primarios presentes del dominio *Bacteria* encontrados en análisis anteriores y la limitada actividad de los representantes de estos suelos determinada mediante qPCR, hace difícil suponer que esta actividad pueda sustentar al resto de heterótrofos activos.

A partir de los perfiles de abundancia relativa del gen ARNr 16S en las fracciones de los gradientes de densidad obtenidos para cada muestra y observables en las Figuras 29 y 30, se seleccionaron tres rangos de densidades que representarían el ADN no marcado, o ligero (L), el medianamente marcado, denominado medianamente pesado (MP), y el ADN marcado, o pesado (P) para llevar a cabo secuenciación de amplicones. El ADN de la fracción ligera (L) corresponde a los microorganismos que no han incorporado H_2O^{18} en sus ácidos nucleicos dado que no han crecido en las condiciones ensayadas. Aunque no es lo habitual en estudios de marcaje con isótopos estables (SIP), en este proyecto la fracción pesada se dividió en dos partes (MP y P) dada la amplitud de esta fracción en el dominio *Archaea* y la distribución bimodal observada en ciertas ocasiones (Figuras 29 y 30), lo que nos hacía suponer que se trataba de poblaciones distintas con diferentes velocidades de crecimiento o incorporación de H_2O^{18} . Por motivos de presupuesto y, dado que Oren y colaboradores (2016) determinaron que el compuesto utilizado como inhibidor del fotosistema II no era sustrato de las principales haloarqueas, solo la fracción MP fue secuenciada de las muestras tratadas con H_2O^{18} +DCMU.

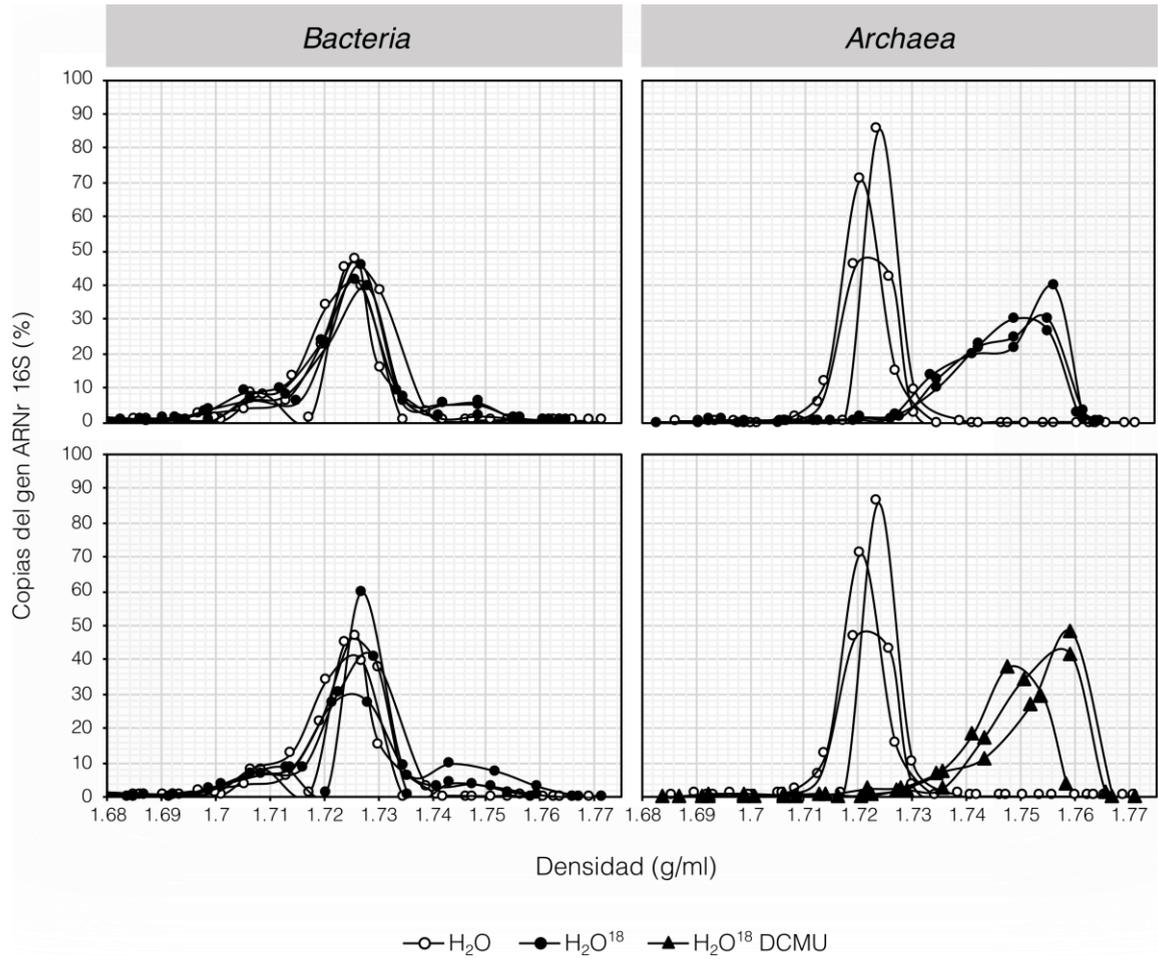


Figura 28. Abundancia relativa del gen ARNr 16S en las fracciones de diferente densidad obtenidas mediante centrifugación isopícnic de las muestras incubadas con H₂O, H₂O¹⁸, H₂O¹⁸+DCMU en condiciones de luz.

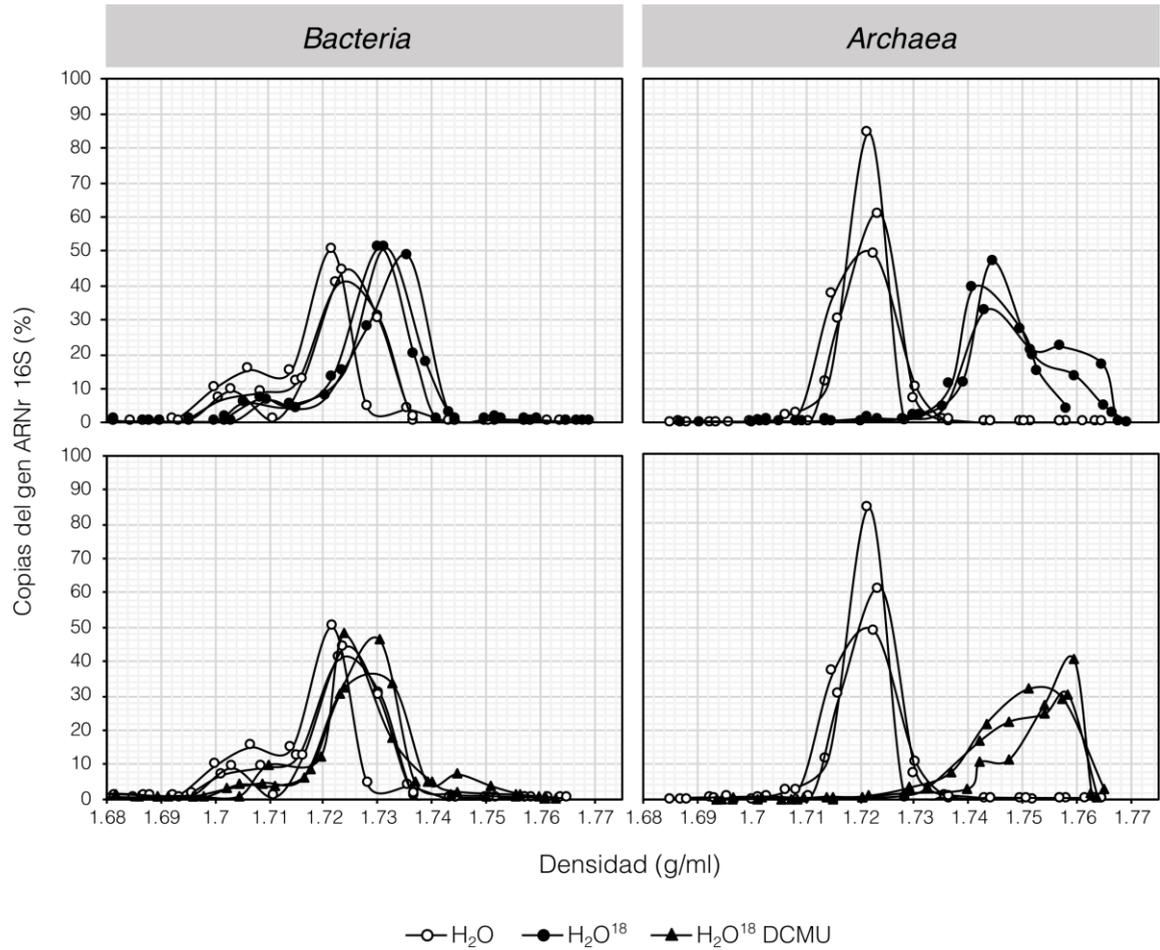


Figura 29. Abundancia relativa del gen ARNr 16S en las fracciones de diferente densidad obtenidas mediante centrifugación isopícnica de las muestras incubadas con H₂O, H₂O¹⁸, H₂O¹⁸+DCMU en condiciones de oscuridad.

En la Figura 32 se muestra el gráfico de ordenación basado en el índice de disimilitud Bray-Curtis de las fracciones MP de los tratamientos con H_2O^{18} en luz y oscuridad, con los 20 filotipos que más contribuyen a dicha separación representados sobre la ordenación. En esta fracción se encuentra el ADN de los microorganismos que han incorporado el H_2O^{18} y, por lo tanto, crecen activamente en las condiciones del estudio. Los resultados están en consonancia con los obtenidos en la incubación con H_2O en luz/oscuridad que se muestran en la Figura 28. Los filotipos de arqueas más representados en condiciones de luz son los nombrados con anterioridad. Sin embargo, en este caso puede observarse una contribución de ciertos filotipos de bacterias a la separación entre las muestras de estos dos tratamientos. Los OTUs 37 y 184 (relacionados con *Salinibacter*) y 42, se encuentran más representados en las muestras iluminadas que en las incubadas en la oscuridad.

Para determinar si estos filotipos obtienen ventaja directa (es decir, las condiciones en estos suelos activan el uso de sus rodopsinas) o bien se trata de un desarrollo debido a una mayor efectividad o preferencia por los sustratos sintetizados por los productores primarios debemos fijarnos en los resultados obtenidos para los pares H_2O^{18} (luz)- H_2O^{18} +DCMU (luz) (Figura 32), H_2O^{18} +DCMU (luz)- H_2O^{18} +DCMU (oscuridad) (Figura 33) así como en el par H_2O^{18} (oscuridad) y H_2O^{18} +DCMU (oscuridad) (Figura 34), que indicará el posible crecimiento de estos filotipos en presencia del compuesto DCMU.

En el gráfico de ordenación mostrado en la Figura 32 se observa que el filotipo OTU 2 (*Natronomonas*), así como el 37 y el 184 (*Salinibacter*) se encuentran más representados en las muestras incubadas con el inhibidor de la fotosíntesis, que en las que no lo tienen, lo que podría indicar que su desarrollo se encuentra más favorecido en condiciones de luz cuando no hay producción primaria que cuando la hay. El resto de OTUs que eran más abundantes en las muestras iluminadas que en las no iluminadas parecen ser más abundantes en las muestras donde se permite la producción primaria (H_2O^{18} en luz), por lo que podrían depender de ésta para crecer en estas condiciones. La comparación de la fracción MP de las muestras incubadas con H_2O^{18} en oscuridad con o sin DCMU permite discernir el efecto, como nutriente o como compuesto tóxico de especies que compiten por un mismo nicho, de este compuesto sobre los filotipos que nos ocupan. Como se observa en la Figura 34, la separación entre estas dos muestras no es muy grande. Mientras que el OTU 2 parece ser ligeramente más abundante en la muestra con DCMU, el OTU 37, 42 y *Pontibacillus* también se inclinan hacia la muestra con DCMU. Aunque estos resultados no implican indiscutiblemente el uso de DCMU como fuente de carbono y/o energía, pues podría también tratarse de un efecto tóxico sobre microorganismos que ocupan el mismo nicho que los que se encuentran aumentados (31, 36, 42), se han descrito con anterioridad microorganismos que son capaces de utilizarlo y, en todo caso, únicamente con estos datos no podemos discernir si el efecto observado en la figura 28 y 32 se debe a la luz directamente o al efecto de DCMU, ya sea directa o indirectamente. Para ello, es útil comparar las muestras tratadas con H_2O + DCMU e incubadas en luz y en oscuridad.

Dado que la comparación de las muestras incubadas con H_2O^{18} + DCMU en luz y en oscuridad (Figura 33) muestra que el OTU 2 (*Natronomonas*) es más abundante cuando la muestra se ilumina, podemos hipotetizar que *Natronomonas*, además de obtener una ventaja en presencia de DCMU (como nutriente o como compuesto tóxico para microorganismos que ocupan su mismo nicho),

obtiene también una ventaja directa de la luz, siendo probablemente capaz de utilizar sus rodopsinas en las condiciones de estos suelos ensayadas. Nuestros resultados sugieren que el género *Natronomonas* contiene filotipos muy versátiles (en concordancia con los resultados obtenidos en el Capítulo II), capaces de utilizar como fuente de energía la luz, diversos tipos de compuestos complejos (probablemente DCMU) y es muy eficiente utilizando los que provienen de la producción primaria.

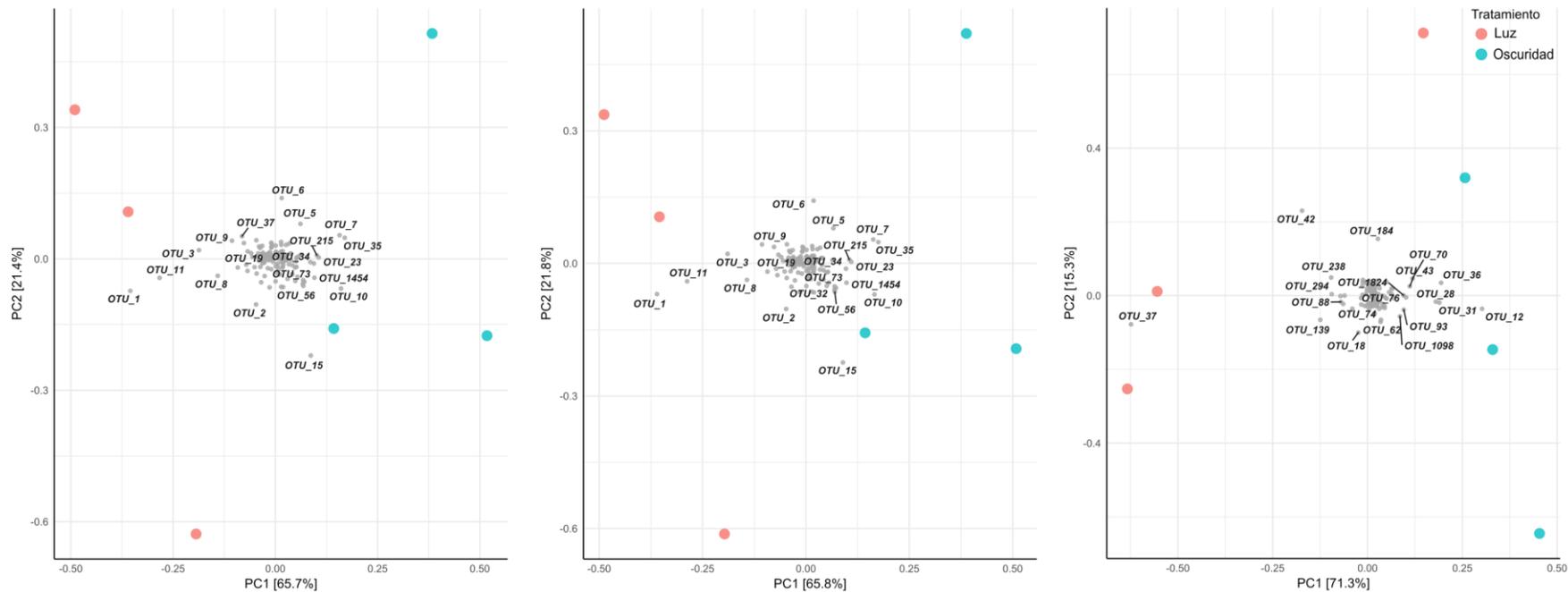


Figura 30. Gráficos de ordenación basados en Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B) y bacterias (C) de la fracción MP de las muestras incubadas con H₂O¹⁸ en luz y oscuridad. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado.

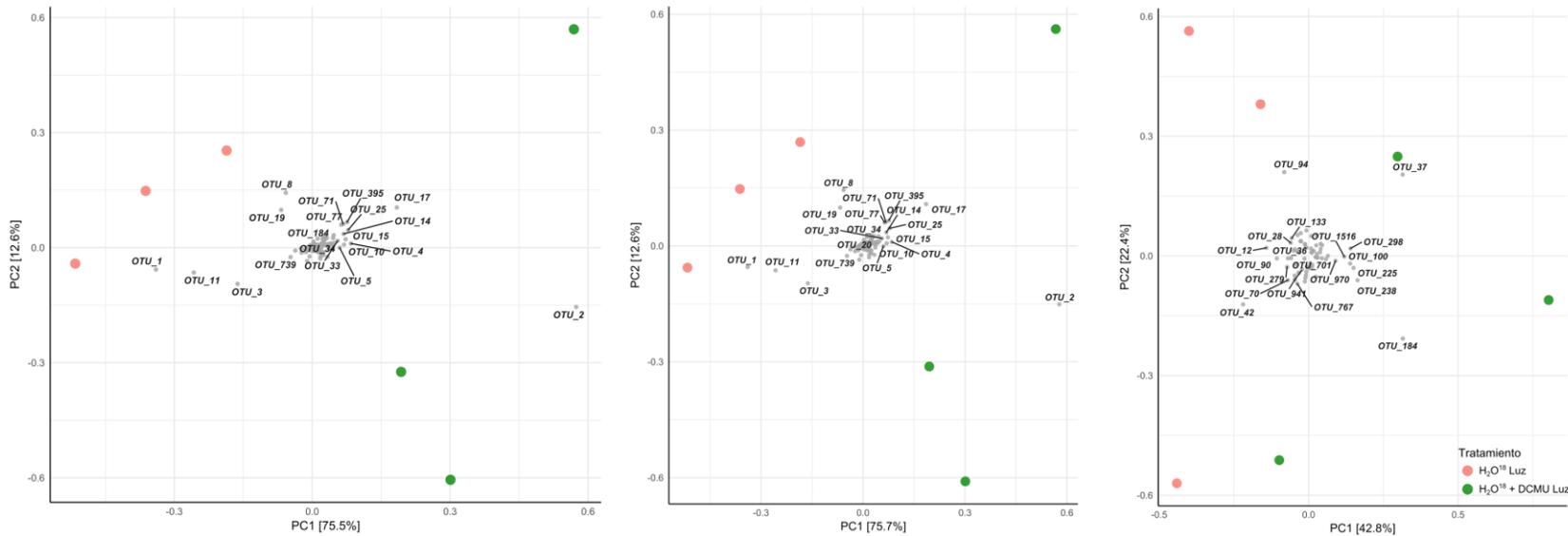


Figura 31. Gráficos de ordenación basados en el índice Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B) y bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H_2O^{18} en luz con y sin DCMU. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado.

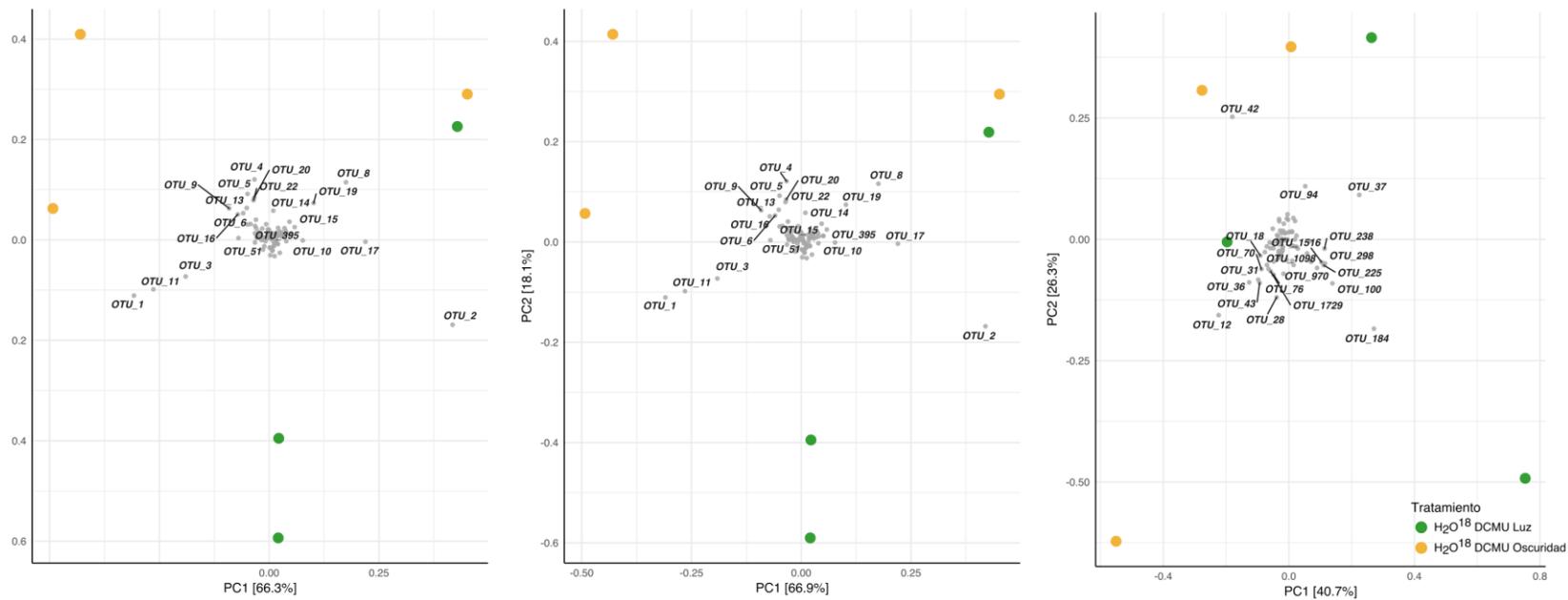


Figura 32. Gráficos de ordenación basados en el índice Bray-Curtis de la comunidad procariota (A), de arqueas (B), y bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H₂O¹⁸ y DCMU en luz y oscuridad. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado.

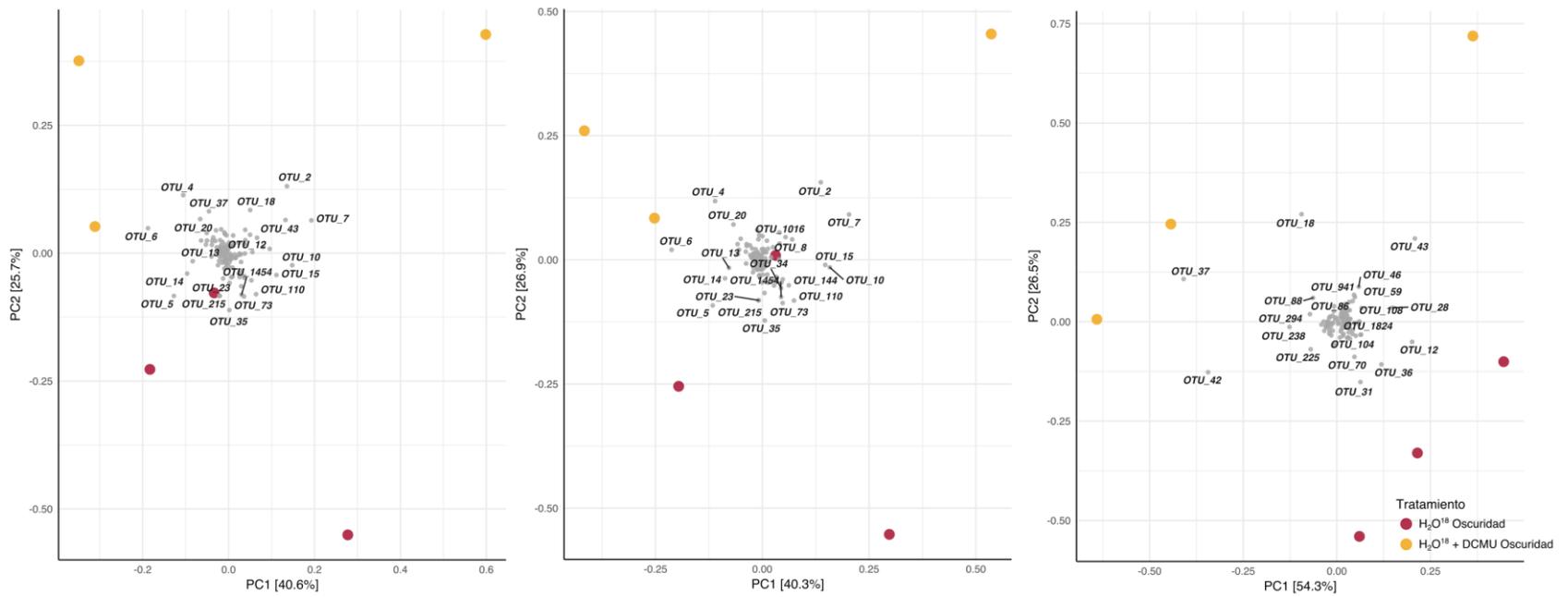


Figura 33. Gráficos de ordenación PCA basados en el índice Bray-Curtis de las comunidades procariotas (A), de arqueas (B) y de bacterias (C) de la fracción P de las muestras incubadas con H_2O^{18} en oscuridad con y sin DCMU. En ellos se indican los 20 OTUs que más contribuyen a la separación de las muestras en el espacio mostrado.

V. RESUMEN

El presente trabajo se ha centrado en la caracterización de la comunidad de bacterias y arqueas de suelos hipersalinos localizados en el Paraje Natural Marismas del Odiel.

Para ello, por un lado, se obtuvieron dos metagenomas completos por pirosecuenciación de una misma localización en dos momentos distintos (octubre de 2013 y noviembre de 2014), los cuales fueron analizados conjuntamente con otras bases de datos de ambientes hipersalinos acuáticos ampliamente estudiados que se habían obtenido mediante la misma técnica de secuenciación con el objetivo de identificar los sesgos en el conocimiento de los microorganismos halófilos y los ambientes hipersalinos derivados del estudio mayoritario de ambientes acuáticos, así como para establecer patrones comunes y específicos a hábitats hipersalinos con distinto tipo de sustrato (sólido/líquido). Los resultados revelaron que la comunidad procariota de los suelos estudiados era mayor que la encontrada en los ambientes acuáticos tomados como referencia, y englobaba microorganismos con diferentes susceptibilidades a la salinidad, lo cual se atribuyó al carácter heterogéneo de la estructura del suelo, especialmente de los no saturados como los que son objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, que propicia la aparición de micronichos con características fisicoquímicas diversas. Las secuencias metagenómicas y los *contigs* se afiliaban mayoritariamente a microorganismos halófilos de los phyla *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* y *Rhodothermaeota*. También se encontraron secuencias relacionadas con el phylum candidato "*Nanohaloarchaeota*", que no había sido detectado con anterioridad en suelos salinos. Aunque entre los géneros más representados en las dos bases de datos analizadas se encuentran grupos detectados frecuentemente en otros ambientes hipersalinos, como *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas* y *Salinibacter*, también se detectó una gran abundancia de secuencias relacionadas con géneros de los que se disponía escasa información ambiental, como es el caso de *Fodinibius* en SMO1 y *Salinimicrobium* en SMO2, además de un 15 % relacionadas con organismos no cultivados o que no pudieron ser clasificadas a este nivel con los parámetros utilizados. Estos resultados demuestran que un grupo de microorganismos halófilos es capaz de crecer tanto en ambientes acuáticos como terrestres, permaneciendo más o menos constantes las dos muestras analizadas, mientras que la característica estructura del suelo como hábitat podría estar propiciando el desarrollo de grupos de halófilos no tan versátiles de manera variable en el tiempo y probablemente en función de las condiciones fisicoquímicas de su microhábitat. La recuperación de genomas ambientales de buena calidad relacionados con estos dos últimos grupos de microorganismos a partir de los metagenomas permitió la evaluación de la fisiología y ecología de los mismos en otros ambientes hipersalinos. Ambos poseían la capacidad de acumular solutos compatibles, con probable utilización del mecanismo de osmoadaptación *salt-out*, y el relacionado con el phylum *Balneolaeota* podría utilizar la luz como fuente de energía por medio de rodopsinas.

El análisis de los parámetros ambientales relacionados con la distribución de la comunidad procariota y su diversidad en distintos suelos hipersalinos del citado Paraje mostró que la influencia del factor salinidad no era muy relevante dado que la comunidad estaba compuesta principalmente por microorganismos adaptados a estas condiciones, apoyando la hipótesis propuesta por un estudio anterior que indica que, superado un determinado nivel de salinidad, este factor ya no constituye la principal contribución a la estructura de la comunidad procariota. En esta

situación, otras propiedades geoquímicas del suelo, como la textura, el contenido en agua, carbono, azufre y metales constituyen los principales factores relacionados con los cambios en la distribución espacial de la comunidad procariota.

Los estudios de marcaje con H_2O^{18} de la comunidad de estos suelos permitieron determinar que la comunidad activa en estos suelos, tanto en luz como en oscuridad, estaba compuesta por arqueas, mientras que las bacterias no crecieron en las incubaciones, indicando que el primer grupo se encuentra bien adaptado a la vida en condiciones desfavorables de estos suelos, mientras que los miembros del dominio bacteria podrían encontrarse en un estado de latencia a la espera de condiciones ambientales más favorables. Las incubaciones en condiciones de luz y oscuridad demuestran que este tratamiento da lugar a comunidades procariotas diferentes en estos suelos. Además, la adición de un compuesto inhibidor del fotosistema I no provocó grandes cambios en la comunidad, sugiriendo que la amplia comunidad halófila heterótrofa encontrada no depende de la producción de compuestos carbonados como fuente de carbono y energía por parte de la escasa comunidad de organismos fotosintéticos presentes en estos suelos. Estos microorganismos, que poseen genes relacionados con rodopsinas, podrían, por tanto, obtener energía a partir de la luz, bien para procesos metabólicos o fisiológicos y aprovechar como fuente de energía los compuestos expulsados como consecuencia del cambio de osmolaridad y los que resultan más disponibles y próximas espacialmente al aumentar el contenido de agua del suelo con lluvias.

VI. SUMMARY

This PhD Thesis has focused on the characterisation of the bacterial and archaeal communities from hypersaline soils located in the natural area of the Odiel Saltmarshes (Huelva, southwest Spain).

For that purpose, two shotgun metagenomes were obtained by pyrosequencing from the same location in two time points (October 2013 and November 2014), which were analysed together with other metagenomic databases (sequenced in the same way) from hypersaline aquatic systems thoroughly studied from the microbiologic point of view as reference. The goal was to identify the biases in the current knowledge about halophiles and their environments derived from the priority study of hypersaline aquatic systems, as well as to establish patterns common and specific to hypersaline habitats of different type of substrate (solid/liquid). The results revealed that the diversity of the prokaryotic community from the studied soils was higher than the one found in the aquatic systems, and included microorganisms with different susceptibilities to salinity, both of which results reflect the heterogeneity of the structure of the soil habitat and the presence of disconnected micro-niches with diverse physicochemical conditions. The metagenomic sequences and *contigs* were affiliated to halophilic microorganisms from the phyla *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* and *Rhodothermaeota*. Sequences related to the candidate phylum “*Nanohaloarchaeota*”, which had not been detected in saline soils before, were also identified. Among the most represented genera we found groups frequently detected in other aquatic hypersaline environments, such as *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas* and *Salinibacter*, as well as a high proportion of reads related to genera from which limited environmental information is available (*Fodinibius* in SMO1 and *Salinimicrobium* in SMO2) and a 15 % of 16S rRNA reads not related to cultivated organisms. These results show that a group of halophilic microorganisms are able to thrive in both terrestrial and aquatic systems and maintain their abundances from one time point to the next one, while the characteristic soil structure as habitat may be fostering the development of other taxa in variable proportions in time. The retrieval of environmental genomes related with the two last groups of microorganisms from the metagenomic data allowed for the evaluation of their physiology as well as their ecology in other hypersaline habitats. Both of them possessed the potentiality for accumulating compatible solutes, suggesting the use of a *salt-out* osmoadaptation strategy, and the one related to the phylum *Balneolaeota* may be able to obtain energy from light by means of rhodopsins.

The analysis of the environmental variables related to the distribution of the prokaryotic communities and their diversity in several hypersaline soils from this natural area showed that the influence of salinity was not Paramount as the community was composed of microorganisms already adapted to life at those conditions, supporting the hypothesis from a previous study that indicated that, once surpassed a specific salinity threshold, this factor is not the main one contributing to the prokaryotic community structure. In this situation, other geochemical properties of the soil, such as texture, water content, and concentration in carbon, sulfur, or metals constitute the main factors related to shifts in the prokaryotic community with spatial distribution.

The labelling with H_2O^{18} of the community from these soils allowed for the determination that the active community in them, whether incubated in light or dark, was mainly composed of archaea, while bacterial representatives did not grow in the conditions used. This result suggested that the first group is highly adapted to life in those conditions, while *Bacteria* members may be in a dormant state in these soils, awaiting for more favorable conditions to resume growth. Incubations in the light and the dark showed that this treatment produces different prokaryotic communities in these soils. Furthermore, the addition of a compound for inhibiting photosystem I did not promote big changes in the community, suggesting that the abundant halophilic heterotrophic community found in these soils do not depend on the production of compounds as source of energy and carbon by the minor photosynthetic community present in these soils. The studied soil-borne microorganisms, that possess genes coding for rhodopsins, may obtain energy from light for metabolic or physiologic processes and hence, and use other compounds such as osmoprotectants exported by an osmotic downshock, which also become more readily available when water content in soils rise such as with rain events.

VII. CONCLUSIONES

1. La diversidad procariota, tanto taxonómica como funcional, de los suelos estudiados es superior a la encontrada en otros ambientes acuáticos hipersalinos tomados como referencia, probablemente debido a la mayor heterogeneidad del suelo como hábitat, frente a una columna de agua.
2. La comunidad procariota de los suelos salinos estudiados comprende principalmente microorganismos halófilos de los phyla *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* and *Rhodothermaeota*, aunque también se encuentran presentes otros grupos minoritarios sin representantes halófilos descritos. Algunos de los géneros mayoritarios detectados en los dos metagenomas completos se detectan también como abundantes en otros ambientes hipersalinos (*Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Salinibacter*) y su proporción se mantiene relativamente estable de un momento de muestreo al siguiente, mientras que la información disponible sobre otros grupos taxonómicos ampliamente representados (*Fodinibius* en SMO1 y *Salinimicrobium* en SMO2) es escasa, y sus abundancias variaron en los dos momentos de muestreo, probablemente en relación a las diferentes condiciones fisicoquímicas de una y otra muestra.
3. El uso de técnicas independientes de cultivo como la secuenciación metagenómica y de amplicones para la caracterización de la comunidad microbiana de estos suelos permitió la detección de una fracción importante de secuencias relacionadas con microorganismos no descritos o no cultivados, especialmente del dominio Bacteria. Por ello, aún se requiere un gran esfuerzo de estudios de aislamiento para caracterizar la comunidad presente en estos suelos.
4. El análisis del potencial metabólico de la comunidad procariota de estos suelos salinos refleja su naturaleza terrestre e hipersalina, de manera que coexisten características propias de suelos, como el alto número de genes relacionados con metabolismo secundario y virulencia, además de funciones de reconocida importancia para los microorganismos que viven a altas concentraciones salinas, como los involucrados en mecanismos de osmoadaptación.
5. Nuestros resultados muestran que, una vez sobrepasado cierto límite de salinidad u osmolaridad, este factor no juega un papel crítico en la estructuración de las comunidades microbianas o su diversidad en estos suelos. En estas condiciones, otros parámetros del suelo, como el contenido en agua, pH, textura y concentración de carbono y metales se relacionaban con los cambios en la estructura de la comunidad.
6. Ciertos filotipos, mayoritariamente afiliados a los géneros *Fodinibius* y *Natronomonas* se encontraron en un alto número de muestras y su abundancia no se correlacionaba con la salinidad, por lo que, de acuerdo con estudios anteriores, esto sugiere que los halófilos que habitan en suelos tienen un carácter más eurihalino que los que se encuentran en ambientes acuáticos.
7. Las incubaciones de muestras de estos suelos salinos con H₂O¹⁸ tras un período de desecación muestran que solo la comunidad de arqueas era capaz de crecer en dichas condiciones, mientras que la mayor parte de los representantes del dominio *Bacteria* no se marcaron, sugiriendo que se encuentran en un estado de latencia o bien no resistieron el período de desecación. Esto demuestra

que las arqueas encontradas en estos suelos son más resistentes a los períodos de desecación y/o se encuentran mejor adaptadas a la vida en las condiciones extremas que se dan en lo suelos estudiados.

8. La luz induce un cambio en la estructuración de la comunidad procariota de estos suelos hipersalinos y, por lo tanto, podría constituir una fuente de energía para los microorganismos halófilos de suelo que codifican rodopsinas cuando otros sustratos no se encuentran disponibles.

VIII. CONCLUSIONS

1. The taxonomic and functional prokaryotic community in the studied hypersaline soils from the Odiel Saltmarshes is more diverse than that of their counterparts' aquatic systems selected as reference, probably due to the high heterogeneity of these soils as microbial habitat, as compared with a water column.
2. The prokaryotic community of the studied soils was mainly composed of halophilic microorganisms from the phyla *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* and *Rhodothermaeota*, but also minor phyla without described halophilic representatives were identified. While some of the main genera detected in the two shotgun metagenomes were known to thrive in other hypersaline habitats (*Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Salinibacter*) and remained relatively stable from one time point to the next, limited environmental information was available from the other main genera (*Fodinibius* in SMO1 and *Salinimicrobium* in SMO2), which abundances are probably related to specific soil parameters different in the two sampling moments.
3. The use of high-throughput culture-independent methods for prospection of the microbial community from these soils permitted the detection of an important fraction of undescribed and uncultivated microorganisms in these soils, specially within the bacterial community. Thus, further exploration of these particular soils and other saline soils warrants further exploration.
4. The analysis of the metabolic potential of the microbial community from these soils reflected its terrestrial and hypersaline nature, revealing traits common to other soils, such as a high number of genes related to secondary metabolism and virulence, as well as functions of known importance for microorganisms living at high salinities, such as those involved in osmoadaptation processes.
5. Our results show that, once surpassed a certain salinity or osmolarity threshold this factor does not play a critical role in the structuring of the prokaryotic community or its diversity in the studied soils, but that, in these conditions, other soil parameters such as water content, pH, texture, and content in carbon and metals were related to shifts in the community structure.
6. As some phylotypes, especially those affiliated to *Fodinibius* and *Natronomonas*, occurred in a wide range of samples and salinity was not correlated with their abundance, we suggest, according to previous studies, that halophiles from soil may be more euryhaline than those inhabiting hypersaline aquatic systems.
7. Experimental incubations of saline soils with H_2O^{18} after a period of desiccation showed that the archaeal community was able to grow in the harsh conditions of these soils, while the most part of the bacterial community remained unlabeled, thus probably in dormant state or dead. Hence, archaeal representatives are either more resistant to desiccation and/or better adapted to thrive in the conditions found in the studied soils.
8. Light induces a change in the prokaryotic community structure from these hypersaline soils and therefore, it may constitute an energy source for soil-borne representatives coding for rhodopsins when other substrates are not available.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aanderud ZT, Vert JC, Lennon JT, Magnusson TW, Breakwell DP, et al.** Bacterial dormancy is more prevalent in freshwater than hypersaline lakes. *Front Microbiol* 2016;**7**:853.
- Abriouel H, Benomar N, Lucas R, & Gálvez A.** Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int J Food Microbiol* 2011;**144**:487–96.
- Abrol IP, Yadav JSP, & Massoud FI.** Salt-affected soils and their management. FAO soils bulletin 39. Rome: 1988.
- Abrudan MI, Smakman F, Grimbergen AJ, Westhoff S, Miller EL, et al.** Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;**112**:11054–9.
- Acosta JA, Jansen B, Kalbitz K, Faz A, & Martinez-Martinez S.** Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere* 2011;**85**:1318–24.
- Adam PS, Borrel G, Brochier-Armanet C, & Gribaldo S.** The growing tree of Archaea: New perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J* 2017;**11**:2407–25.
- Adamides NG.** Rio Tinto (Iberian Pyrite Belt): a world-class mineral field reopens. *Appl Earth Sci* 2013;**122**:2–15.
- Afihayati, Sato K, & Sakakibara Y.** MetaVelvet-SL: an extension of the Velvet assembler to a de novo metagenomic assembler utilizing supervised learning. *DNA Res* 2014;**22**:69–77.
- Aislabie JM, Chhour KL, Saul DJ, Miyauchi S, Ayton J, et al.** Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biol Biochem* 2006;**38**:3041–56.
- Al-Awadhi H, Dashti N, Khanafer M, Al-Mailem D, Ali N, et al.** Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: A representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. *Springerplus* 2013;**2**:1–11.
- Al-Mailem DM, Kansour MK, & Radwan SS.** Capabilities and limitations of DGGE for the analysis of hydrocarbonoclastic prokaryotic communities directly in environmental samples. *Microbiologyopen* 2017;**6**:1–12.
- Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW, et al.** Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* 2013;**31**:533–8.
- Albokari MA, Çinar S, & Mutlu MB.** Microbial characterization of Jazan sabkha in Saudi Arabia. *Appl Ecol Environ Res* 2017;**15**:1069–77.
- Alcántara-Hernández RJ, Valenzuela-Encinas C, Marsch R, & Dendooven L.** Respiratory and dissimilatory nitrate-reducing communities from an extreme saline alkaline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* 2009;**13**:169–78.
- Alexander E, Stock A, Breiner HW, Behnke A, Bunge J, et al.** Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environ Microbiol* 2009;**11**:360–81.
- Alipour S.** Hydrogeochemistry of seasonal variation of Urmia Salt Lake, Iran. *Saline Systems* 2006;**2**:9.
- Alneberg J, Bjarnason BS, de Bruijn I, Schirmer M, Quick J, et al.** Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nat Methods* 2014;**11**:1144.
- Amann R, Binder B, Olson R, Chisholm S, Devereux R, et al.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990;**56**:1919–25.

- Amils R.** Lessons learned from thirty years of geomicrobiological studies of Rio Tinto. *Res Microbiol* 2016;**167**:539–45.
- Amoozegar MA, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, & Ventosa A.** Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology* 2017;**163**:623–45.
- Anderson AW, Nordeon HC, Cain RF, Parrish G, & Duggan D.** Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation. *Food Technol* 1956;**10**:575–8.
- Anderson J.** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 2008;**26**:32–46.
- Andrei AŞ, Banciu HL, & Oren A.** Living with salt: Metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett* 2012;**330**:1–9.
- Antón J, Amann R, & Rosselló-Mora R.** *Salinibacter*. Bergey's Man. Syst. Archaea Bact., 2017.
- Anton J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, & Amann R.** Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* 1999;**1**:517–23.
- Antón J, Llobet-Brossa E, Rodríguez-Valera F, Amann R, Anton J, et al.** Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* 1999;**1**:517–23.
- Antón J, Lucio M, Peña A, Cifuentes A, Brito-Echeverría J, et al.** High metabolomic microdiversity within co-occurring isolates of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *PLoS One* 2013;**8**:1–14.
- Antón J, Oren A, Benlloch S, Rodríguez-Valera F, Amann R, et al.** *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;**52**:485–91.
- Antón J, Peña A, Santos F, Martínez-García M, Schmitt-Kopplin P, et al.** Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems* 2008;**4**:15.
- Antón J, Rosselló-Mora R, Rodríguez-Valera F, & Amann R.** Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:3052–7.
- Antony CP, Kumaresan D, Hunger S, Drake HL, Murrell JC, et al.** Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. *ISME J* 2013;**7**:468–76.
- Antunes A, Ngugi DK, & Stingl U.** Microbiology of the Red Sea (and other) deep-sea anoxic brine lakes. *Environ Microbiol Rep* 2011;**3**:416–33.
- Antunes A, Rainey FA, Wanner G, Taborda M, Pätzold J, et al.** A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 2008a;**190**:3580–7.
- Antunes A, Taborda M, Huber R, Moissl C, Nobre MF, et al.** *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented extremely halophilic archaeon from a deep-sea hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008b;**58**:215–20.
- Arahal D, & Ventosa A.** The family Halomonadaceae. *The Prokaryotes* 2006:811–35.
- Arahal DR.** La microbiota del Mar Muerto: 50 años después. Universidad de Sevilla, 1997.
- Arahal DR, Dewhirst FE, Paster BJ, Volcani BE, & Ventosa A.** Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 1996;**62**:3779–86.
- Arahal DR, García MT, Ludwig W, Schleifer KH, & Ventosa A.** Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and

Chromohalobacter israelensis comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001a;**51**:1443–8.

Arahal DR, García MT, Vargas C, Cánovas D, Nieto JJ, et al. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001b;**51**:1457–62.

Arahal DR, Vreeland RH, Litchfield CD, Mormile MR, Tindall BJ, et al. Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:2436–46.

Arenas M, Bañón PI, Copa-Patiño JL, Sánchez-Porro C, Ventosa A, et al. *Halomonas ilicicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;**59**:578–82.

Arias S, del Moral A, Ferrer MR, Tallon R, Quesada E, et al. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 2003;**7**:319–26.

Arnold JB. ggthemes: extra themes, scales and geoms for “ggplot2”. R package version 3.4.0 2017:<http://cran.r-project.org/package=ggthemes>.

Atanasova NS, Heiniö CH, Demina TA, Bamford DH, & Oksanen HM. The unexplored diversity of pleolipoviruses: The surprising case of two viruses with identical major structural modules. *Genes (Basel)* 2018;**9**:1–18.

Atanasova NS, Oksanen HM, & Bamford DH. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2015;**25**:40–8.

Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 2008;**9**:75.

Baati H, Guermazi S, Amdouni R, Gharsallah N, Sghir A, et al. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* 2008;**12**:505–18.

Baati H, Jarbouli R, Gharsallah N, Sghir A, & Ammar E. Molecular community analysis of magnesium-rich bittern brine recovered from a Tunisian solar saltern. *Can J Microbiol* 2011;**57**:975–81.

Ballav S, Kerkar S, Thomas S, & Augustine N. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *J Biosci Bioeng* 2015;**119**:323–30.

Banciu H, Sorokin DY, Galinski EA, Muyzer G, Kleerebezem R, et al. *Thialkalivibrio halophilus* sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, facultatively alkaliphilic, and extremely salt-tolerant, sulfur-oxidizing bacterium from a hypersaline alkaline lake. *Extremophiles* 2004;**8**:325–34.

Banciu HL, Sorokin DY, Tourova TP, Galinski EA, Muntyan MS, et al. Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium *Thioalkalibacter halophilus* gen. nov., sp. nov. from South-Western. *Extremophiles* 2008;**12**:391–404.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;**19**:455–77.

Barberán A, Fernández-Guerra A, Bohannan BJM, & Casamayor EO. Exploration of community traits as ecological markers in microbial metagenomes. *Mol Ecol* 2012;**21**:1909–17.

Baricz A, Coman C, Andrei AŞ, Muntean V, Keresztes ZG, et al. Spatial and temporal distribution of archaeal diversity in meromictic, hypersaline Ocnei Lake (Transylvanian Basin, Romania). *Extremophiles* 2014a;**18**:399–413.

Baricz A, Coman C, Andrei AŞ, Muntean V, Keresztes ZG, et al. Spatial and temporal distribution of archaeal diversity in meromictic, hypersaline Ocnei Lake (Transylvanian Basin, Romania). *Extremophiles* 2014b;**18**:399–413.

- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, et al.** Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J* 2011;**5171**:908–17.
- Becker EA, Seitzer PM, Tritt A, Larsen D, Krusor M, et al.** Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic osmo-response. *PLoS Genet* 2014;**10**:e1004784.
- Béjà O, Spudich E, Spudich J, Leclerc M, & Delong EF.** Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 2001;**411**:786–9.
- Béjar V, Llamas I, Calvo C, & Quesada E.** Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol* 1998;**61**:135–41.
- Beltrán R, de la Rosa JD, Santos JC, Beltrán M, & Gómez-Ariza JL.** Heavy metal mobility assessment in sediments from the Odiel River (Iberian Pyritic Belt) using sequential extraction. *Environ Earth Sci* 2010;**61**:1493–503.
- Benlloch S, Acinas SG, Antón J, López-López A, Luz SP, et al.** Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol* 2001;**41**:12–9.
- Benlloch S, Acinas SG, Martínez-Murcia AJ, & Rodríguez-Valera F.** Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *Hydrobiologia* 1996;**329**:19–31.
- Benlloch S, López-López A, Casamayor EO, Øvreås L, Goddard V, et al.** Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* 2002;**4**:349–60.
- Benlloch S, Martínez-Murcia AJ, & Rodríguez-Valera F.** Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Syst Appl Microbiol* 1995;**18**:574–81.
- Bhattacharyya A, Majumder NS, Basak P, Mukherji S, Roy D, et al.** Diversity and Distribution of Archaea in the Mangrove Sediment of Sundarbans. *Archaea* 2015;**2015**:968582.
- Birrien JL, Zeng X, Jebbar M, Cambon-Bonavita MA, Quérellou J, et al.** *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;**61**:2827–31.
- Blum JS, Han S, Lanoil B, Saltikov C, Witte B, et al.** Ecophysiology of “*Halarsenatibacter silvermanii*” strain SLAS-1 T, gen. nov., sp. nov., a facultative chemoautotrophic arsenate respirer from salt-saturated Searles Lake, California. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:1950–60.
- Bodaker I, Sharon I, Suzuki MT, Feingersch R, Shmoish M, et al.** Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J* 2010;**4**:399–407.
- Bodaker I, Suzuki MT, Oren A, & Béjà O.** Dead Sea rhodopsins revisited. *Environ Microbiol Rep* 2012;**4**:617–21.
- Boisvert S, Raymond F, Godzaridis É, Laviolette F, & Corbeil J.** Ray Meta: Scalable *de novo* metagenome assembly and profiling. *Genome Biol* 2012;**13**:R122.
- Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, & Martínez-Estévez M.** Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front Plant Sci* 2017a;**8**:1–18.
- Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, & Martínez-Estévez M.** Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front Plant Sci* 2017b;**8**:1–18.
- Bolhuis H, Palm P, Wende A, Falb M, Rampp M, et al.** The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* 2006;**7**:169.
- Bolívar JP, García-Tenorio R, Mas JL, & Vaca F.** Radioactive impact in sediments from an estuarine system affected by industrial wastes releases. *Environ Int* 2002;**27**:639–45.

- Borin S, Brusetti L, Mapelli F, D'Auria G, Brusa T, et al.** Sulfur cycling and methanogenesis primarily drive microbial colonization of the highly sulfidic Urania deep hypersaline basin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:9151–6.
- Borrego J, Morales J, de la Torre M, & Grande J.** Geochemical characteristics of heavy metal pollution in surface sediments of the Tinto and Odiel river estuary (southwestern Spain). *Environ Geol* 2002;**41**:785–96.
- Bose T, Haque MM, Cvsk R, & Mande SS.** COGNIZER: A framework for functional annotation of metagenomic datasets. *PLoS One* 2015;**10**:1–16.
- Boughalmi M, Saadi H, Pagnier I, Colson P, Fournous G, et al.** High-throughput isolation of giant viruses of the *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* families in the Tunisian environment. *Environ Microbiol* 2013;**15**:2000–7.
- Bougouffa S, Yang JK, Lee OO, Wang Y, Batang Z, et al.** Distinctive microbial community structure in highly stratified deep-sea brine water columns. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:3425–37.
- Boujelben I, Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Peña A, et al.** Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012a;**101**:845–57.
- Boujelben I, Yarza P, Almansa C, Villamor J, Maalej S, et al.** Virioplankton community structure in Tunisian solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 2012b;**78**:7429–37.
- Bouyoucos GJ.** Directions for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method. *Soil Sci* 1936;**4**:225–8.
- Bowers RM, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Harmon-Smith M, Doud D, et al.** Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nat Biotechnol* 2017;**35**:725–31.
- Bowman JP, McCammon SA, Rea SM, & McMeekin TA.** The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Lett* 2000;**183**:81–8.
- Brady A, & Salzberg SL.** Phymm and PhymmBL: metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models. *Nat Methods* 2009;**6**:673.
- Brandt KK, & Ingvorsen K.** *Desulfobacter halotolerans* sp. nov., a halotolerant acetate-oxidizing sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of Great Salt Lake, Utah. *Syst Appl Microbiol* 1997;**20**:366–73.
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, et al.** RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 2015;**5**:8365.
- Brito-Echeverría J, Lucio M, López-López A, Antón J, Schmitt-Kopplin P, et al.** Response to adverse conditions in two strains of the extremely halophilic species *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* 2011;**15**:379–89.
- Brito EMS, Guyoneaud R, Goñi-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere A, et al.** Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol* 2006;**157**:752–62.
- Britton KL, Baker PJ, Fisher M, Ruzheinikov S, Gilmour DJ, et al.** Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:4846–51.
- Brock TD.** Ecology of saline lakes. In: Shilo M, editor. *Strateg. Microb. Life Extrem. Environ.*, Weinheim: Verlag Chem; 1979, p. 29–47.

- Brock TD, & Freeze H.** *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 1969;**98**:289–97.
- Bryant DA, & Frigaard N-U.** Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends Microbiol* 2006;**14**:488–96.
- Buchfink B, Xie C, & Huson DH.** Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 2014;**12**:59.
- Buenger J, & Driller H.** Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 2004;**17**:232–7.
- Burmølle M, Johnsen K, Al-Soud WA, Hansen LH, & Sørensen SJ.** The presence of embedded bacterial pure cultures in agar plates stimulate the culturability of soil bacteria. *J Microbiol Methods* 2009;**79**:166–73.
- Burns DG, Janssen PH, Itoh T, Kamekura M, Li Z, et al.** *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:387–92.
- Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, & Gunde-Cimerman N.** Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* 2005a;**244**:229–34.
- Butinar L, Sonjak S, Zalar P, Plemenitaš A, & Gunde-Cimerman N.** Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Mar* 2005b;**48**:73–9.
- Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, & Gunde-Cimerman N.** The genus *Eurotium* — Members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiol Ecol* 2005c;**51**:155–66.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, et al.** BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009;**10**:1–9.
- Cambrollé J, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Luque T, & Figueroa ME.** The role of two *Spartina* species in phytostabilization and bioaccumulation of Co, Cr, and Ni in the Tinto–Odiel estuary (SW Spain). *Hydrobiologia* 2011;**671**:95.
- Cambrollé J, Redondo-Gómez S, Mateos-Naranjo E, & Figueroa ME.** Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Mar Pollut Bull* 2008;**56**:2037–42.
- Canfora L, Bacci G, Pinzari F, Lo Papa G, Dazzi C, et al.** Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PLoS One* 2014;**9**:e106662.
- Canfora L, Lo Papa G, Vittori Antisari L, Bazan G, Dazzi C, et al.** Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Appl Soil Ecol* 2015;**93**:120–9.
- Cánovas CR, Hubbard CG, Olías M, Nieto JM, Black S, et al.** Hydrochemical variations and contaminant load in the Río Tinto (Spain) during flood events. *J Hydrol* 2008;**350**:25–40.
- Cao SJ, Qu JH, Yang JS, Sun Q, & Yuan HL.** *Halolactibacillus alkaliphilus* sp. nov., a moderately alkaliphilic and halophilic bacterium isolated from a soda lake in Inner Mongolia, China, and emended description of the genus *Halolactibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;**58**:2169–73.
- Cao SJ, Qu JH, Yuan HL, & Li BZ.** *Salsuginibacillus halophilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;**60**:1339–43.
- Carden DE, Walker DJ, Flowers TJ, & Miller AJ.** Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiol* 2003;**131**:676–83.

- Cardenas E, & Tiedje JM.** New tools for discovering and characterizing microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 2008;**19**:544–9.
- Carro B, Borrego J, López-González N, Grande JA, Gómez T, et al.** Impact of acid mine drainage on the hydrogeochemical characteristics of the Tinto-Odiel estuary (SW Spain). *J Iber Geol* 2011;**37**:87–96.
- Carson JK, Gonzalez-Quiñones V, Murphy D V., Hinz C, Shaw JA, et al.** Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:3936–42.
- Casamayor EO, Calderón-Paz JI, & Pedrós-Alió C.** 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiol Ecol* 2000;**34**:113–9.
- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Øvreås L, Díez B, et al.** Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* 2002;**4**:338–48.
- Casamayor EO, Triadó-Margarit X, & Castañeda C.** Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;**85**:503–18.
- Casanueva A, Galada N, Baker GC, Grant WD, Heaphy S, et al.** Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles* 2008;**12**:651–6.
- Castellanos EM.** Colonización, dinámica poblacional y papel en la sucesión de *Spartina maritima* en las Marismas del Odiel. Universidad de Sevilla, 1992.
- Castellanos EM, Figueroa ME, & Davy AJ.** Nucleation and facilitation in saltmarsh succession: interactions between *Spartina maritima* and *Arthrocnemum perenne*. *J Ecol* 1994;**82**:239–248.
- Castelle CJ, & Banfield JF.** Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell* 2018;**172**:1181–97.
- Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Hug LA, Brown CT, et al.** Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol* 2015;**25**:690–701.
- Castillo J, Rubio-Casal A, Luque CJ, Nieva F, & Figueroa M.** Wetland loss by erosion in Odiel Marshes (SW Spain). *J Coast Res* 2002;**36**:134–8.
- Castillo JM.** Tipificación, cartografía y contenido en metales pesados de comunidades vegetales de las Marismas del Odiel. Dinámica poblacional de diferentes especies del género *Spergularia*. Universidad de Sevilla, 2001.
- Castillo JM, & Figueroa E.** Effects of abiotic factors on the life span of the invasive cordgrass *Spartina densiflora* and the native *Spartina maritima* at low salt marshes: Changes in life span of cordgrasses. *Aquat Ecol* 2009a;**43**:51–60.
- Castillo JM, & Figueroa E.** Restoring salt marshes using small cordgrass, *Spartina maritima*. *Restor Ecol* 2009b;**17**:324–6.
- Caton TM, Caton IR, Witte LR, & Schneegurt MA.** Archaeal diversity at the Great Salt Plains of Oklahoma described by cultivation and molecular analyses. *Microb Ecol* 2009;**58**:519–28.
- Caton TM, Witte LR, Ngyuen HD, Buchheim JA, Buchheim MA, et al.** Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microb Ecol* 2004;**48**:449–62.
- Cha I-T, Yim KJ, Song HS, Lee H-W, Hyun D-W, et al.** *Halolamina rubra* sp. nov., a haloarchaeon isolated from non-purified solar salt. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014;**105**:907–14.
- Chaban B, Ng SYM, & Jarrell KF.** Archaeal habitats-from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* 2006;**52**:73–116.

- Chambers LG, Guevara R, Boyer JN, Troxler TG, & Davis SE.** Effects of salinity and inundation on microbial community structure and function in a mangrove peat soil. *Wetlands* 2016;**36**:361–71.
- Chao A.** Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 1987;**43**:783–91.
- Cho BC.** Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: Gunde-Cimerman N, Oren A, & Plemenitaš A, editors. *Adapt. to Life High Salt Conc. Archaea, Bact. Eukarya*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2005, p. 541–9.
- Cho G-Y, Lee J-C, & Whang K-S.** *Aliifodinibius salicampi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a grey saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;**67**:2598–603.
- Choi J, Yang F, Stepanauskas R, Cardenas E, Williams R, et al.** RefSoil: A reference database of soil microbial genomes. *bioRxiv* 2016:533997.
- Chowdhury N, Marschner P, & Burns R.** Response of microbial activity and community structure to decreasing soil osmotic and matric potential. *Plant Soil* 2011;**344**:241–54.
- Ciulla RA, Diaz MR, Taylor BF, & Roberts MF.** Organic osmolytes in aerobic bacteria from Mono Lake, an alkaline, moderately hypersaline environment. *Appl Environ Microbiol* 1997;**63**:220–6.
- Çinar S, & Mutlu MB.** Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles* 2016;**20**:589–601.
- Clark DR, Mathieu M, Mourot L, Dufossé L, Underwood GJC, et al.** Biogeography at the limits of life: Do extremophilic microbial communities show biogeographical regionalization? *Glob Ecol Biogeogr* 2017;**26**:1435–46.
- Claus D, Fahmy F, Rolf HJ, & Tosunoglu N.** *Sporosarcina halophila* sp. nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *Syst Appl Microbiol* 1983;**4**:496–506.
- Cleary B, Brito IL, Huang K, Gevers D, Shea T, et al.** Detection of low-abundance bacterial strains in metagenomic datasets by eigengene partitioning. *Nat Biotechnol* 2016;**33**:1053–60.
- Cocolin L, Mataragas M, Bourdichon F, Doulgeraki A, Pilet MF, et al.** Next generation microbiological risk assessment meta-omics: The next need for integration. *Int J Food Microbiol* 2017:0–1.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, et al.** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:633–42.
- La Cono V, Smedile F, Bortoluzzi G, Arcadi E, Maimone G, et al.** Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part I: Prokaryotes and environmental settings. *Environ Microbiol* 2011;**13**:2250–68.
- Constancias F, Prévost-Bouré NC, Terrat S, Aussems S, Nowak V, et al.** Microscale evidence for a high decrease of soil bacterial density and diversity by cropping. *Agron Sustain Dev* 2014;**34**:831–40.
- Cray JA, Russell JT, Timson DJ, Singhal RS, & Hallsworth JE.** A universal measure of chaotropy and kosmotropy. *Environ Microbiol* 2013;**15**:287–96.
- Cruz-Martínez K, Suttle KB, Brodie EL, Power ME, Andersen GL, et al.** Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *ISME J* 2009;**3**:738–44.
- Cui H-L, Gao X, Yang X, & Xu X-W.** *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;**61**:1617–21.
- Curado G, Rubio-Casal AE, Figueroa E, & Castillo JM.** Potential of *Spartina maritima* in restored salt marshes for phytoremediation of metals in a highly polluted estuary. *Int J Phytoremediation* 2014a;**16**:1209–20.

- Curado G, Sánchez-Moyano UE, Figueroa E, & Castillo JM.** Do *Spartina maritima* plantations enhance the macroinvertebrate community in European salt marshes? *Estuaries and Coasts* 2014b;37:589–601.
- Curtis TP, Sloan WT, & Scannell JW.** Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10494–9.
- Czech L, & Bremer E.** With a pinch of extra salt—Did predatory protists steal genes from their food? *PLoS Biol* 2018;16:e2005163.
- Czech L, Hermann L, Stöveken N, Richter AA, Höppner A, et al.** Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: Genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes (Basel)* 2018;9:1–58.
- Daffonchio D, Borin S, Brusa T, Brusetti L, Van Der Wielen PWJJ, et al.** Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature* 2006;440:203–7.
- Danovaro R, Corinaldesi C, Dell’Anno A, Fabiano M, & Corselli C.** Viruses, prokaryotes and DNA in the sediments of a deep-hypersaline anoxic basin (DHAB) of the Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* 2005;7:586–92.
- Danson MJ, & Hough DW.** The structural basis of protein halophilicity. *Comp Biochem Physiol - A Physiol* 1997;117:307–12.
- Darling AE, Jospin G, Lowe E, Matsen FA, Bik HM, et al.** PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes. *PeerJ* 2014;2:e243.
- DasSarma S, & DasSarma P.** Halophiles and their enzymes: Negativity put to good use. *Curr Opin Microbiol* 2015;25:120–6.
- Davis Jr. RA, Welty AT, Borrego J, Morales JA, Pendon JG, et al.** Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environ Geol* 2000;39:1107–16.
- dC Rubin SS, Marín I, Gómez MJ, Morales EA, Zekker I, et al.** Prokaryotic diversity and community composition in the Salar de Uyuni, a large scale, chaotropic salt flat. *Environ Microbiol* 2017;19:3745–54.
- Delmont TO, Eren AM, Maccario L, Prestat E, Esen ÖC, et al.** Reconstructing rare soil microbial genomes using in situ enrichments and metagenomics. *Front Microbiol* 2015;6:358.
- Delmont TO, Prestat E, Keegan KP, Faubladiet M, Robe P, et al.** Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME J* 2012;6:1677–87.
- DeMaere MZ, Williams TJ, Allen MA, Brown M V., Gibson JAE, et al.** High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:16939–44.
- Deole R, Challacombe J, Raiford DW, & Hoff WD.** An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. *J Biol Chem* 2013;288:581–8.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, et al.** Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5069–72.
- Desjardins PR, & Conklin DS.** Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* 2011;45:e2565.
- Desmarais D, Jablonski PE, Fedarko NS, & Roberts MF.** 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. *J Bacteriol* 1997;179:3146–53.
- Dickson JL, Head JW, Levy JS, & Marchant DR.** Don Juan Pond, Antarctica: Near-surface CaCl₂-brine feeding Earth’s most saline lake and implications for Mars. *Sci Rep* 2013;3:1–7.
- Dillon JG, Carlin M, Gutierrez A, Nguyen V, & McLain N.** Patterns of microbial diversity along a salinity

gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico. *Front Microbiol* 2013;**4**:399.

Ditzler C, Scheffe K, & Monger HC, editors. Soil survey manual. USDA Handb. Washington, D.C.: Government Printing Office; 2017.

Dufrêne M, & Legendre P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol Monogr* 1997;**67**:345–66.

Edgcomb V, Orsi W, Leslin C, Epstein SS, Bunge J, et al. Protistan community patterns within the brine and halocline of deep hypersaline anoxic basins in the eastern Mediterranean Sea. *Extremophiles* 2009;**13**:151–67.

Edgerton ME, & Brimblecombe P. Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol* 1981;**27**:899–909.

Edwards DJ, & Holt KE. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb Inform Exp* 2013;**3**:2.

Eisen JA. Environmental Shotgun Sequencing: Its Potential and Challenges for Studying the Hidden World of Microbes. *PLoS Biol* 2007;**5**:157–62.

Eisenberg H, & Wachtel EJ. Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1987;**16**:69–92.

Elevi Bardavid R, Khristo P, & Oren A. Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 2008;**12**:5–14.

Elevi Bardavid R, & Oren A. The amino acid composition of proteins from anaerobic halophilic bacteria of the order *Halanaerobiales*. *Extremophiles* 2012a;**16**:567–72.

Elevi Bardavid R, & Oren A. Acid-shifted isoelectric point profiles of the proteins in a hypersaline microbial mat: an adaptation to life at high salt concentrations? *Extremophiles* 2012b;**16**:787–92.

Ellis DG, Bizzoco RW, & Kelley ST. Halophilic *Archaea* determined from geothermal steam vent aerosols. *Environ Microbiol* 2008;**10**:1582–90.

Van Elsas JD, Jansson J, & Trevors J, editors. Modern soil microbiology. 2nd ed. Nueva York: CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton; 2007.

Elshahed MS, Najar FZ, Roe B a., Oren A, Dewers T a., et al. Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic archaea in a low-salt, sulfide- and sulfur-rich spring. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:2230–9.

Emerson JB, Norman A, Allen EE, Tyrrell HL, Emerson JB, et al. Virus-host and CRISPR dynamics in Archaea-dominated hypersaline Lake Tyrrell, Victoria, Australia. *Archaea* 2013;**2013**:370871.

Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2003;**75**:293–320.

Ernst OP, Lodowski DT, Elstner M, Hegemann P, & Brown LS. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* 2014;**114**:126–63.

Estrada M, Henriksen P, Gasol JM, Casamayor EO, & Pedrós-Alió C. Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 2004;**49**:281–93.

Fang T, Pan R, Jiang J, He F, & Wang H. Effect of salinity on community structure and naphthalene dioxygenase gene diversity of a halophilic bacterial consortium. *Front Environ Sci Eng* 2016;**10**:16.

Fernandez-Castillo R, Rodriguez-Valera F, Gonzalez-Ramos J, & Ruiz-Berraquero F. Accumulation of Poly (β -Hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Appl Environ Microbiol* 1986;**51**:214–6.

Fernández-Remolar DC, Gómez F, Prieto-Ballesteros O, Schelble RT, Rodríguez N, et al. Some ecological mechanisms to generate habitability in planetary subsurface areas by chemolithotrophic communities: the Río Tinto subsurface ecosystem as a model system. *Astrobiology* 2008;**8**:157–73.

Fernández AB, Ghai R, Martin-Cuadrado AB, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, et al. Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol* 2014a;**88**:623–35.

Fernández AB, León MJ, Vera B, Sánchez-Porro C, & Ventosa A. Metagenomic sequence of prokaryotic microbiota from an intermediate-salinity pond of a saltern in Isla Cristina, Spain. *Genome Announc* 2014b;**2**:e00045-14.

Fernández AB, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, Ghai R, Papke RT, et al. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front Microbiol* 2014c;**5**:196.

Ferrer M, Werner J, Chernikova TN, Bargiela R, Fernández L, et al. Unveiling microbial life in the new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part II: A metagenomic study. *Environ Microbiol* 2012;**14**:268–81.

Fiala G, & Stetter KO. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch Microbiol* 1986;**145**:56–61.

Ficha informativa de los Humedales de Ramsar en Andalucía. Sitio Ramsar Marismas del Odiel. Junta de Andalucía; 2007.

Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Thomas S, et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:21390–5.

Finstad KM, Probst AJ, Thomas BC, Andersen GL, Demergasso C, et al. Microbial community structure and the persistence of cyanobacterial populations in salt crusts of the hyperarid Atacama desert from genome-resolved metagenomics. *Front Microbiol* 2017;**8**:1435.

Forsyth MP, & Kushner DJ. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can J Microbiol* 1970;**13**:142–7.

Fox-Powell MG, Hallsworth JE, Cousins CR, & Cockell CS. Ionic strength is a barrier to the habitability of Mars. *Astrobiology* 2016;**16**:427–42.

Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, & Nishikawa K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J Mol Biol* 2003;**327**:347–57.

Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A, & Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* 2005;**9**:85–9.

Galinski EA, & Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 1994;**15**:95–108.

Garabito MJ, Márquez M, & Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can J Microbiol* 1998;**44**:95–102.

Garbayo I, Torronteras R, Forján E, Cuaresma M, Casal C, et al. Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *J Phycol* 2012;**48**:607–14.

García-Heredia I, Martin-Cuadrado AB, Mojica FJM, Santos F, Mira A, et al. Reconstructing viral genomes from the environment using fosmid clones: The case of haloviruses. *PLoS One* 2012;**7**:e33802.

García-Moyano A, González-Toril E, Aguilera Á, & Amils R. Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**81**:303–14.

- Ge Y, He JZ, Zhu YG, Zhang JB, Xu Z, et al.** Differences in soil bacterial diversity: Driven by contemporary disturbances or historical contingencies? *ISME J* 2008;**2**:254–64.
- Gensemer RW, & Playle RC.** The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit Rev Environ Sci Technol* 1999;**29**:315–450.
- Ghai R, Martin-Cuadrado A-B, Molto AG, Heredia IG, Cabrera R, et al.** Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. *ISME J* 2010;**4**:1154–66.
- Ghai R, Pašić L, Fernández AB, Martin-Cuadrado A-B, Mizuno CM, et al.** New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 2011;**1**:135.
- Gibtan A, Park K, Woo M, Shin JK, Lee DW, et al.** Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. *Front Microbiol* 2017;**8**:1–11.
- Gilbert JA, Jansson JK, & Knight R.** The Earth Microbiome Project: successes and aspirations. *BMC Biol* 2014;**12**:69.
- Gimmler H, Weis U, Weis C, Kugel H, & Treffny B.** *Dunaliella acidophila* (Kalina) Masyuk — an alga with a positive membrane potential. *New Phytol* 1989;**113**:175–84.
- Glatz RE, Lepp PW, Ward BB, & Francis CA.** Planktonic microbial community composition across steep physical/chemical gradients in permanently ice-covered Lake Bonney, Antarctica. *Geobiology* 2006;**4**:53–67.
- Gochnauer MB, Leppard GG, Komarata P, Kates M, Novitsky T, et al.** Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol* 1975;**21**:1500–11.
- Goh F, Jeon YJ, Barrow K, Neilan BA, & Burns BP.** Osmoadaptive strategies of the archaeon *Halococcus hamelinensis* isolated from a hypersaline stromatolite environment. *Astrobiology* 2011;**11**:529–36.
- Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Rodríguez F, Capella-Gutiérrez S, et al.** From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic Bacteroidetes generalists. *ISME J* 2015;**9**:16–31.
- Gorbushina A., & Krumbein WE.** The poikilotrophic micro-organism and its environment. In: Seckbach J, editor. *Enigm. Microorg. Life Extrem. Environ. (Cellular Orig. life Extrem. habitats Astrobiol.*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1999, p. 175–85.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, et al.** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:81–91.
- Goris J, Vos P De, Coenye T, Hoste B, Janssens D, et al.** Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001:1773–82.
- Graf R, Anzali S, Buenger J, Pfluecker F, & Driller H.** The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* 2008;**26**:326–33.
- Grant S, Grant WD, Jones BE, Kato C, & Li L.** Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles* 1999;**3**:139–45.
- Grant WD, Gemmell RT, & McGenity TJ.** Halophiles. In: Horikoshi K, & Grant WD, editors. *Extrem. Microb. Life Extrem. Environ.*, Nueva York: Wiley-Liss; 1998, p. 93–132.
- Grant WD, Pagaling E, Ma MC, Cowan DA, Ma Y, et al.** The hypersaline lakes of Inner Mongolia: The MGAtch Project. In: Ventosa A, Oren A, & Ma Y, editors. *Halophiles Hypersaline Environ.*, Berlin, Heidelberg: Springer; 2011, p. 65–107.

- Grant WD, & Tindall BJ.** The alkaline saline environment. In: Codd GA, & Herbert RA, editors. *Microorg. Extrem. Environ.* Academic P, London: 1986, p. 25–54.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M, et al.** The bacterial biogeography of British soils. *Environ Microbiol* 2011;**13**:1642–54.
- Groffman PM, & Bohlen PJ.** Soil and sediment biodiversity: Cross-system comparisons and large-scale effects. *Bioscience* 1999;**49**:139–48.
- Grote M.** Enlightening the life sciences: the history of halobacterial and microbial rhodopsin research. *FEMS Microbiol Rev* 2011;**35**:1082–99.
- Guixa-Boixareu N, Calderón-Paz JI, Haldal M, Bratbak G, & Pedrós-Alió C.** Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquat Microb Ecol* 1996;**11**:215–27.
- Gunde-Cimerman N, Oren A, & Plemenitaš A.** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev* 2018;**42**:353–75.
- Gupta RS, Naushad S, & Baker S.** Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: A proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. . *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;**65**:1050–69.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, & Tesler G.** QAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;**29**:1072–5.
- Gutiérrez MC, Castillo AM, Pagaling E, Heaphy S, Kamekura M, et al.** *Halorubrum kocurii* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;**58**:2031–5.
- Gutleben J, Chaib De Mares M, van Elsas JD, Smidt H, Overmann J, et al.** The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Crit Rev Microbiol* 2018;**44**:212–29.
- Haber M, Shefer S, Giordano A, Orlando P, Gambacorta A, et al.** *Luteivirga sdotyamensis* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the phylum Bacteroidetes isolated from the Mediterranean sponge *Axinella polypoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:939–45.
- Hallsworth JE, Heim S, & Timmis KN.** Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 2003;**5**:1270–80.
- Hallsworth JE, Yakimov MM, Golyshin PN, Gillion JLM, D’Auria G, et al.** Limits of life in MgCl₂-containing environments: Chaotropicity defines the window. *Environ Microbiol* 2007;**9**:801–13.
- Han R, Zhang X, Liu J, Long Q, Chen L, et al.** Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke Salt Lake environments. *Can J Microbiol* 2017;**63**:895–908.
- Hauswedell H, Singer J, & Reinert K.** Lambda: the local aligner for massive biological data. *Bioinformatics* 2014;**30**:349–55.
- Hawkes RB, Franzmann PD, O’hara G, & Plumb JJ.** *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap. *Extremophiles* 2006;**10**:525–30.
- Hawley ER, & Hess M.** Metagenome sequencing of the prokaryotic microbiota of the hypersaline and meromictic Soap Lake, Washington. *Genome Announc* 2014;**2**:e01212-13.
- Hawley ER, Schackwitz W, & Hess M.** Metagenomic sequencing of two Salton sea microbiomes. *Genome Announc* 2014;**2**:e01208-13.
- He Y, DeSutter T, Hopkins D, Jia X, & Wysocki DA.** Predicting EC_e of the saturated paste extract from value of EC_{1:5}. *Can J Soil Sci* 2013;**93**:585–94.
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, & Van Straalen NM.** The unseen majority: soil microbes as

drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 2008;**11**:296–310.

Henriet O, Fourmentin J, Delincé B, & Mahillon J. Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. *Int J Food Microbiol* 2014;**191**:36–44.

Hierro A, Olías M, Ketterer ME, Vaca F, Borrego J, et al. Geochemical behavior of metals and metalloids in an estuary affected by acid mine drainage (AMD). *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;**21**:2611–27.

Hildebrand F, Tadeo R, Voigt AY, Bork P, & Raes J. LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline. *Microbiome* 2014;**2**:30.

Hitch TCA, & Creevey CJ. Spherical: An iterative workflow for assembling metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* 2018;**19**:1–8.

Hoefl SE, Blum JS, Stolz JF, Tabita FR, Witte B, et al. *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:504–12.

Hoffmann T, Wensing A, Brosius M, Steil L, Völker U, et al. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol* 2013;**195**:510–22.

Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME J* 2010a;**4**:829–38.

Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME J* 2010b;**4**:829–38.

Holtmann G, & Bremer E. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* 2004;**186**:1683–93.

Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, & Stetter KO, editors. Extremophiles Handbook. Tokyo: Springer; 2011.

Hosseini Tafreshi A, & Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *J Appl Microbiol* 2009;**107**:14–35.

Howe AC, Jansson JK, Malfatti SA, Tringe SG, Tiedje JM, et al. Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:4904–9.

Hu P, Tom L, Singh A, Thomas B, Baker B, et al. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs. *MBio* 2016;**7**:1–12.

Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L, & Li W. CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 2010;**26**:680–2.

Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, et al. A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 2016;**1**:1–6.

Hugerth LW, Larsson J, Alneberg J, Lindh M V., Legrand C, et al. Metagenome-assembled genomes uncover a global brackish microbiome. *Genome Biol* 2015;**16**:279.

Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, et al. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 2010;**11**:bbx098.

Imelfort M, Parks D, Woodcroft BJ, Dennis P, Hugenholtz P, et al. GroopM: an automated tool for the

recovery of population genomes from related metagenomes. *PeerJ* 2014;**2**:e603.

Imhoff JF, Sahl HG, Soliman GSH, & Trüper HG. The Wadi Natrun: Chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of Eutrophic Desert Lakes. *Geomicrobiol J* 1979;**1**:219–34.

Infante-Domínguez C, Corral P, Sánchez-Porro C, & Ventosa A. *Halovenus salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;**65**:3016–23.

Inoue K, Itoh T, Ohkuma M, & Kogure K. *Halomarina oriensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a seawater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011;**61**:942–6.

Irshad A, Ahmad I, & Kim SB. Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian J Microbiol* 2014;**45**:563–71.

IUSS Working Group WRB. World reference base for soil resources 2006, first update. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2007.

Jacob JH, Hussein EI, Shakhathreh MAK, & Cornelison CT. Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *Microbiologyopen* 2017;**6**:1–6.

Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:2391–6.

Jansson JK, & Baker ES. A multi-omic future for microbiome studies. *Nat Microbiol* 2016;**1**:16049.

Jarrell KF, Walters AD, Bochiwal C, Borgia JM, Dickinson T, et al. Major players on the microbial stage: Why Archaea are important. *Microbiology* 2011;**157**:919–36.

Javor B. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1989a.

Javor B. Solar salterns. In: Javor B, editor. Hypersaline Environ. Microbiol. Biogeochem., Berlin: Springer-Verlag; 1989b, p. 189–204.

Jeffries TC, Seymour JR, Gilbert J a., Dinsdale EA, Newton K, et al. Substrate type determines metagenomic profiles from diverse chemical habitats. *PLoS One* 2011;**6**:e25173.

Jolivet E, L'Haridon S, Corre E, Forterre P, & Prieur D. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:847–51.

Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, & Owenson GG. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 1998;**2**:191–200.

Jones BF, Naftz DL, Spencer RJ, & Oviatt CG. Geochemical evolution of Great Salt Lake, Utah, USA. *Aquat Geochemistry* 2009;**15**:95–121.

Jung JY, Lee SH, Lee HJ, & Jeon CO. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: Traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol* 2013;**34**:360–8.

Kalwasińska A, Deja-Sikora E, Burkowska-But A, Szabó A, Felföldi T, et al. Changes in bacterial and archaeal communities during the concentration of brine at the graduation towers in Ciechocinek spa (Poland). *Extremophiles* 2018;**22**:233–46.

Kambura AK, Mwirichia RK, Kasili RW, Karanja EN, Makonde HM, et al. Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC Microbiol* 2016;**16**:1–12.

Kamekura M, Dyall-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, & Kates M. Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and

Natronobacterium pharaonis to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respect. *Int J Syst Bacteriol* 1997;**47**:853–7.

Kamekura M, Hamakawa T, & Onishi H. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol* 1982;**44**:994–5.

Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, & Park CB. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett* 2005;**579**:4775–80.

Kang DD, Froula J, Egan R, & Wang Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ* 2015;**3**:e1165.

Karlin S, Mrázek J, & Campbell M. Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications. *J Bacteriol* 1997;**179**:3899–913.

Kastritis PL, Papandreou NC, & Hamodrakas SJ. Haloadaptation: Insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. *Int J Biol Macromol* 2007;**41**:447–53.

Kelly DP, & Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;**50**:511–6.

Kempf B, & Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 1998;**170**:319–30.

Kilmer BR, Eberl TC, Cunderla B, Chen F, Clark BC, et al. Molecular and phenetic characterization of the bacterial assemblage of Hot Lake, WA, an environment with high concentrations of magnesium sulphate, and its relevance to Mars. *Int J Astrobiol* 2014;**13**:69–80.

Kim J, Enache E, & Hayman MSE. Halophilic and osmophilic microorganisms. In: Salfinger Y, & Tortorello MT, editors. *Compend. Methods Microbiol. Exam. Foods*. 5th ed., Washington, D.C.: APHA Press; 2015, p. 213–22.

Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift Für Anal Chemie* 1883;**22**:366–83.

Koh HW, Song HS, Song U, Yim KJ, Roh SW, et al. *Halolamina sediminis* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;**65**:2479–84.

Koops H-P, Böttcher B, Möller UC, Pommerening-Röser A, & Stehr G. Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Arch Microbiol* 1990;**154**:244–8.

Koukkou AI, & Vandera E. Hydrocarbon-degrading soil bacteria: current research. In: Koukkou AI, editor. *Microb. bioremediation non-metals Curr. Res.*, Caister Academic Press; 2011, p. 280.

Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W, Klinkhamer PGL, & van Veen JA. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;**81**:509.

Krause L, Diaz NN, Goesmann A, Kelley S, Nattkemper TW, et al. Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:2230–9.

Kruskal WH, & Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;**47**:583–621.

Kunin V, Raes J, Harris JK, Spear JR, Walker JJ, et al. Millimeter-scale genetic gradients and community-level molecular convergence in a hypersaline microbial mat. *Mol Syst Biol* 2008;**4**:1–6.

Kurm V, Van Der Putten WH, De Boer W, Naus-Wiezer S, & Gera Hol WH. Low abundant soil bacteria can be metabolically versatile and fast growing. *Ecology* 2017;**98**:555–64.

- Kushner DJ, & Kamekura M.** Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valera F, editor. *Halophilic Bact.* vol. I, Boca Raton, FL: CRC Press; 1988, p. 109–38.
- Kuzyakov Y, & Blagodatskaya E.** Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol Biochem* 2015;**83**:184–99.
- de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, & Ventosa A.** Taxonomy of halophiles. In: Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, & Stetter KO, editors. *Extrem. Handbook*, Tokyo: Springer; 2011, p. 255–309.
- De La Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, & Ventosa A.** Taxonomic study of the genus *Salinicola*: Transfer of *Haloarchaea salaria* and *Chromohalobacter salarius* to the genus *Salinicola* as *Salinicola salarius* comb. nov. and *Salinicola halophilus* nom. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;**60**:963–71.
- de la Vega M, Sayago A, Ariza J, Barneto AG, & León R.** Characterization of a bacterioruberin-producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnol Prog* 2016;**32**:592–600.
- Laczny CC, Sternal T, Plugaru V, Gawron P, Atashpendar A, et al.** VizBin - an application for reference-independent visualization and human-augmented binning of metagenomic data. *Microbiome* 2015;**3**:1.
- Ladd J, Foster R, Nannipieri P, & Oades J.** Soil structure and biological activity. In: Stotzky G, & Bollag J-M, editors. *Soil Biochem.* vol. 9, New York: Marcel Dekker; 1996, p. 23–78.
- Du Laing G, De Vos R, Vandecasteele B, Lesage E, Tack FMG, et al.** Effect of salinity on heavy metal mobility and availability in intertidal sediments of the Scheldt estuary. *Estuar Coast Shelf Sci* 2008;**77**:589–602.
- Lanyi JK.** Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 1974;**38**:272–90.
- Larson CA, & Belovsky GE.** Salinity and nutrients influence species richness and evenness of phytoplankton communities in microcosm experiments from Great Salt Lake, Utah, USA. *J Plankton Res* 2013;**35**:1154–66.
- Lattanzio VMT, Baronio M, Oren A, Russell NJ, & Corcelli A.** Characterization of polar membrane lipids of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber* and possible role of cardiolipin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2009;**1791**:25–31.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, & Fierer N.** Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:5111–20.
- Lay CY, Mykytczuk NCS, Yergeau É, Lamarche-Gagnon G, Greer CW, et al.** Defining the functional potential and active community members of a sediment microbial community in a high-arctic hypersaline subzero spring. *Appl Environ Microbiol* 2013;**79**:3637–48.
- Laybourn-Parry J, & Wadham J.** Saline lakes. *Antarct. Lakes*, Oxford: Oxford University Press; 2014, p. 91–132.
- Leblanc M, Morales JA, Borrego J, & Elbaz-Poulichet F.** 4,500-year-old mining pollution in Southwestern Spain: long-term implications for modern mining pollution. *Econ Geol* 2000;**95**:655–62.
- Legault BA, Lopez-Lopez A, Alba-Casado JC, Doolittle WF, Bolhuis H, et al.** Environmental genomics of "*Haloquadratum walsbyi*" in a saltern crystallizer indicates a large pool of accessory genes in an otherwise coherent species. *BMC Genomics* 2006;**7**:171.
- León M.** De la metagenómica al cultivo puro: *Spiribacter salinus*. Universidad de Sevilla, 2015.

- León M, Sánchez-Porro C, & Ventosa A.** *Marinobacter aquaticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;**67**:2622–7.
- León M, Vera-Gargallo B, Sánchez-Porro C, & Ventosa A.** *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;**66**:4218–24.
- León MJ, Fernández AB, Ghai R, Sánchez-Porro C, Rodríguez-Valera F, et al.** From metagenomics to pure culture: Isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 2014;**80**:3850–7.
- León MJ, Martínez-Checa F, Ventosa A, & Sánchez-Porro C.** *Idiomarina aquatica* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;**65**:4595–600.
- Leong SL, Pettersson OV, Rice T, Hocking AD, & Schnürer J.** The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus* — Growth and competition at various water activities. *Int J Food Microbiol* 2011;**145**:57–63.
- Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, & Lam T-W.** MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 2015;**31**:1674–6.
- Li X, Wang X, Zhang Y, Zhao Q, Yu B, et al.** Salinity and conductivity amendment of soil enhanced the bioelectrochemical degradation of petroleum hydrocarbons. *Sci Rep* 2016;**6**:1–11.
- Liao J, Wang J, & Huang Y.** Bacterial community features are shaped by geographic location, physicochemical properties, and oil contamination of soil in main oil fields of China. *Microb Ecol* 2015;**70**:380–9.
- Lillo JG, & Rodríguez-Valera F.** Effects of Culture Conditions on Poly(beta-Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* 1990;**56**:2517–21.
- de Lima Alves F, Stevenson A, Baxter E, Gillion JLM, Hejazi F, et al.** Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr Genet* 2015;**61**:457–77.
- Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ, & Cruz S.** Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr* 2015;**3**:1–30.
- Lindemann SR, Moran JJ, Stegen JC, Renslow RS, Hutchison JR, et al.** The epsomitic phototrophic microbial mat of Hot Lake, Washington: Community structural responses to seasonal cycling. *Front Microbiol* 2013;**4**:1–17.
- Litzner BR, Caton AETM, & Schneegurt MA.** Carbon substrate utilization, antibiotic sensitivity, and numerical taxonomy of bacterial isolates from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Arch Microbiol* 2006;**185**:286–96.
- Liu K, Ding X, Tang X, Wang J, Li W, et al.** Macro and microelements drive diversity and composition of prokaryotic and fungal communities in hypersaline sediments and saline–alkaline soils. *Front Microbiol* 2018;**9**:352.
- Liu Y, Priscu JC, Xiong J, Conrad R, Vick-Majors T, et al.** Salinity drives archaeal distribution patterns in high altitude lake sediments on the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:1–10.
- Llamas I, del Moral A, Martínez-Checa F, Arco Y, Arias S, et al.** *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006;**89**:395–403.
- Lloret J, Bolanos L, Lucas MM, Peart JM, Brewin NJ, et al.** Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Appl Environ Microbiol* 1995;**61**:3701–4.
- Lombard N, Prestat E, van Elsas JD, & Simonet P.** Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol* 2011;**78**:31–49.

- López-González N, Borrego J, Ruiz F, Carro B, Lozano-Soria O, et al.** Geochemical variations in estuarine sediments: Provenance and environmental changes (Southern Spain). *Estuar Coast Shelf Sci* 2006;**67**:313–20.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Bayliss SC, Feil EJ, et al.** Draft genome sequences of *Salinivibrio proteolyticus*, *Salinivibrio sharmensis*, *Salinivibrio siamensis*, *Salinivibrio costicola* subsp. *alcaliphilus*, *Salinivibrio costicola* subsp. *vallismortis*, and 29 new isol. *Genome Announc* 2017a;**5**:1–3.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, & Ventosa A.** *Salinivibrio kushneri* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns. *Syst Appl Microbiol* 2017b:S0723-2020-5.
- López-Pérez M, Ghai R, Leon MJ, Rodríguez-Olmos Á, Copa-Patiño JL, et al.** Genomes of “Spiribacter”, a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics* 2013;**14**:787.
- Love MI, Huber W, & Anders S.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;**15**:550.
- Lozupone CA, & Knight R.** Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:11436–40.
- Lu Q, Han J, Zhou L, Zhou J, & Xiang H.** Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *J Bacteriol* 2008;**190**:4173–80.
- Lucena-Padrós H, & Ruiz-Barba JL.** Diversity and enumeration of halophilic and alkaliphilic bacteria in Spanish-style green table-olive fermentations. *Food Microbiol* 2016;**53**:53–62.
- Lupwayi NZ, Rice WA, & Clayton GW.** Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol Biochem* 1998;**30**:1733–41.
- Luque CJ, Castellanos EM, Castillo JM, Gonzalez M, Gonzalez-Vilches MC, et al.** Metals in halophytes of a contaminated estuary (Odiel Saltmarshes, SW Spain). *Mar Pollut Bull* 1999;**38**:49–51.
- Luque CJ, Castellanos EM, Castillo JM, González M, Vilches MCG, et al.** Distribución de metales pesados en sedimentos de las Marismas del Odiel (Huelva, SO. España). *Cuaternario Y Geomorfol* 1998;**12**:77–85.
- Luque CJ, Vaca F, García-Trapote A, Hierro A, Bolívar JP, et al.** Radionuclides transfer into halophytes growing in tidal salt marshes from the Southwest of Spain. *J Environ Radioact* 2015;**150**:179–88.
- Luque R, Béjar V, Quesada E, & Llamas I.** Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Can J Microbiol* 2014;**60**:839–46.
- Luque R, Béjar V, Quesada E, Martínez-Checa F, & Llamas I.** *Halomonas ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from Rambla Salada, a Mediterranean hypersaline rambla. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012a;**62**:2903–9.
- Luque R, González-Domenech CM, Llamas I, Quesada E, & Béjar V.** Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles* 2012b;**16**:205–13.
- Ma’Or Z, Meshulam-Simon G, Yehuda S, Gavrieli JA, & Sea D.** Antiwrinkle and skin-moisturizing effects of a mineral-algal-botanical complex. *J Cosmet Sci* 2000;**51**:27–36.
- Ma B, & Gong J.** A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;**29**:2325–34.
- Ma Y, Galinski E a., Grant WD, Oren a., & Ventosa a.** Halophiles 2010: Life in Saline Environments. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:6971–81.
- Mackelprang R, Saleska SR, Jacobsen CS, Jansson JK, & Taş N.** Permafrost meta-omics and climate change. *Annu Rev Earth Planet Sci* 2016;**44**:439–62.

- Macumber PG.** Hydrological processes in the Tyrrell Basin, southeastern Australia. *Chem Geol* 1992;**96**:1–18.
- Madern D, Ebel C, & Zaccai G.** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 2000;**4**:91–8.
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, & Dunthorn M.** Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014;**2**:e593.
- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Kazemi B, Pai C L, Ventosa A, et al.** Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes Environ* 2012a;**27**:87–93.
- Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, & Ventosa A.** *Salinibacter iranicus* sp. nov. and *Salinibacter luteus* sp. nov., isolated from a salt lake, and emended descriptions of the genus *Salinibacter* and of *Salinibacter ruber*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012b;**62**:1521–7.
- Mancinelli RC, & Hochstein LI.** The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1986;**35**:55–7.
- Mani K, Salgaonkar BB, & Braganca JM.** Culturable halophilic archaea at the initial and crystallization stages of salt production in a natural solar saltern of Goa, India. *Aquat Biosyst* 2012;**8**:15.
- Mann HB, & Whitney DR.** On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* 1947;**18**:50–60.
- Mapelli F, Borin S, & Daffonchio D.** Microbial diversity in deep hypersaline anoxic basins. In: Stan-Lotter H, & Fendrihan S, editors. *Adapt. Microb. Life to Environ. Extrem.*, Wien: Springer-Verlag; 2012, p. 21–33.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al.** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2006;**441**:120–120.
- Marini A, Reinelt K, Krutmann J, & Bilstein A.** Ectoic acid-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: A randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. *Skin Pharmacol Physiol* 2014;**27**:57–65.
- Marion GM, Fritsen C, Eicken H, & Payne MC.** The search for life on Europa: limiting environmental factors, potential habitats, and Earth analogues. *Astrobiology* 2003;**3**:785–811.
- Marquez MC, Ventosa A, & Ruiz-Berraquero F.** A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic Bacteria from a solar saltern. *Microbiology* 1987;**133**:45–56.
- Martin DD, Ciulla RA, & Roberts MF.** Osmoadaptation in Archaea. *Appl Environ Microbiol* 1999;**65**:1815–25.
- Martínez-García M, Santos F, Moreno-Paz M, Parro V, & Antón J.** Unveiling viral-host interactions within the “microbial dark matter.” *Nat Commun* 2014;**5**:1–8.
- Mascellani N, Liu X, Rossi S, Marchesini J, Valentini D, et al.** Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol* 2007;**7**:1–6.
- Máthé I, Borsodi AK, Tóth EM, Felföldi T, Jurecska L, et al.** Vertical physico-chemical gradients with distinct microbial communities in the hypersaline and heliothermal Lake Ursu (Sovata, Romania). *Extremophiles* 2014;**18**:501–14.
- Matsuzaki M, Kubota K, Satoh T, Kunugi M, Ban S, et al.** Dimethyl sulfoxide-respiring bacteria in Suribati lagoon, a hypersaline lake, in Antarctica and the marine environment. *Polar Biosci* 2006;**20**:73–81.
- Mavromatis K, Ivanova N, Barry K, Shapiro H, Goltsman E, et al.** Use of simulated data sets to evaluate the fidelity of metagenomic processing methods. *Nat Methods* 2007;**4**:495.
- McHardy AC, Martín HG, Tsirigos A, Hugenholtz P, & Rigoutsos I.** Accurate phylogenetic classification of variable-length DNA fragments. *Nat Methods* 2006;**4**:63.

- McMurdie PJ, & Holmes S.** phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;**8**:e61217.
- Medina E, Ruiz-Bellido MA, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Montes-Borrego M, et al.** Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *Int J Food Microbiol* 2016;**236**:47–55.
- Di Meglio L, Santos F, Gomariz M, Almansa C, López C, et al.** Seasonal dynamics of extremely halophilic microbial communities in three Argentinian salterns. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:1–15.
- Mesbah NM, Abou-El-Ela SH, & Wiegel J.** Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. *Microb Ecol* 2007;**54**:598–617.
- Mesbah NM, & Wiegel J.** Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:4074–82.
- Mesbah NM, & Wiegel J.** *Natronovirga wadinatrunensis* gen. nov., sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., halophilic, alkalithermophilic micro-organisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;**59**:2042–8.
- Miller JR, Koren S, & Sutton G.** Assembly algorithm for next-generation sequencing data. *Genomics* 2010;**95**:315–27.
- Miller K, Leschine S, & Huguenin R.** Characterization of a halotolerant-psychrotolerant bacterium from Dry Valley Antarctic soil. *Adv Sp Res* 1983;**3**:43–7.
- Miller KJ, & Leschine SB.** A halotolerant *Planococcus* from Antarctic Dry Valley soil. *Curr Microbiol* 1984;**11**:205–9.
- Mitsch W, & Gosselink J.** Wetlands. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
- Moffett KB, Robinson DA, & Gorelick SM.** Relationship of salt marsh vegetation zonation to spatial patterns in soil moisture, salinity, and topography. *Ecosystems* 2010;**13**:1287–302.
- Mongodin EF, Nelson KE, Daugherty S, DeBoy RT, Wister J, et al.** The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;**102**:18147–52.
- Montes-Botella C, & Tenorio MD.** Water characterization and seasonal heavy metal distribution in the Odiel River (Huelva, Spain) by means of principal component analysis. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;**45**:436–44.
- Mora-Ruiz M de R, Cifuentes A, Font-Verdera F, Pérez-Fernández C, Farias ME, et al.** Biogeographical patterns of bacterial and archaeal communities from distant hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol* 2018;**41**:139–50.
- Moreno M de L, García MT, Ventosa A, Iglesias-Guerra F, & Mellado E.** The extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10 accumulates the compatible solute betaine. *Syst Appl Microbiol* 2010;**33**:308–10.
- Morillo J, Usero J, & Gracia I.** Partitioning of metals in sediments from the Odiel River (Spain). *Environ Int* 2002;**28**:263–71.
- Morillo J, Usero J, & Rojas R.** Fractionation of metals and As in sediments from a biosphere reserve (Odiel salt marshes) affected by acidic mine drainage. *Environ Monit Assess* 2008;**139**:329–37.
- Mosier AC, Murray AE, & Fritsen CH.** Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;**59**:274–88.
- Mota RR, Márquez MC, Arahál DR, Mellado E, & Ventosa A.** Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia*

halobia. *Int J Syst Bacteriol* 1997;**47**:1231–5.

Müller V, & Oren A. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles* 2003;**7**:261–6.

Munns R, & Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 2008;**59**:651–81.

Munoz R, Rosselló-Móra R, & Amann R. Revised phylogeny of Bacteroidetes and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including Rhodothermaeota phyl. nov. *Syst Appl Microbiol* 2017;**40**:190.

Munson MA, Nedwell DB, & Embley TM. Phylogenetic diversity of *Archaea* in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl Environ Microbiol* 1997;**63**:4729–33.

Murray AE, Kenig F, Fritsen CH, McKay CP, Cawley KM, et al. Microbial life at -13°C in the brine of an ice-sealed Antarctic lake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:2–7.

Myrold DD, & Nannipieri P. Classical techniques versus omics approaches. In: Nannipieri P, Pietramellara G, & Renella G, editors. *Omi. Soil Sci.*, Norfolk: Caister Academic Press; 2014, p. 179–87.

Naganuma T, Hua PN, Okamoto T, Ban S, Imura S, et al. Depth distribution of euryhaline halophilic bacteria in Suribati Ike, a meromictic lake in East Antarctica. *Polar Biol* 2005;**28**:964–70.

Nagarajan N, & Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet* 2013;**14**:157–67.

Najjari A, Elshahed MS, Cherif A, & Youssef H. Patterns and determinants of halophilic *Archaea* (Class *Halobacteria*) diversity in Tunisian endorheic salt lakes and sebkhet systems 2015;**81**:4432–41.

Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, & Esumi M. Pitfalls of DNA quantification using dnabinding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One* 2016;**11**:1–12.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, et al. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 2003;**54**:655–70.

Nannipieri P, Pietramellara G, & Renella G. Soil as a biological system. In: Nannipieri P, Pietramellara G, & Renella G, editors. *Omi. Soil Sci.*, Norfolk: Caister Academic Press; 2014, p. 1–7.

Narasingarao P, Podell S, Ugalde JA, Brochier-Armanet C, Emerson JB, et al. *De novo* metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities. *ISME J* 2012;**6**:81–93.

Narayan A, Patel V, Singh P, Patel A, Jain K, et al. Response of microbial community structure to seasonal fluctuation on soils of Rann of Kachchh, Gujarat, India: Representing microbial dynamics and functional potential. *Ecol Genet Genomics* 2018;**6**:22–32.

Nau-Wagner G, Boch J, Le Good JA, & Bremer E. High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 1999;**65**:560–8.

Navarro-Noya YE, Valenzuela-Encinas C, Sandoval-yuriar A, Jiménez-bueno NG, Marsch R, et al. Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea* 2015a;**2015**:646820.

Navarro-Noya YE, Valenzuela-Encinas C, Sandoval-Yuriar A, Jiménez-Bueno NG, Marsch R, et al. Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea* 2015b;**2015**:646820.

Nesme J, Achouak W, Agathos SN, Bailey M, Baldrian P, et al. Back to the future of soil metagenomics. *Front Microbiol* 2016;**7**:73.

Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, et al. DNA stable-isotope probing. *Nat Protoc* 2007;**2**:860–6.

Neuwirth E. RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R package version 1.1-2 2014:<http://cran.r-project.org/package=RColorBrewer>.

Nicolaus B, Marsiglia F, Esposito E, Lama L, Trincone A, et al. Isolation of extremely halotolerant

cocci from Antarctica. *FEMS Microbiol Lett* 1992;**99**:145–9.

Nieto JM, Sarmiento AM, Olías M, Canovas CR, Riba I, et al. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environ Int* 2007;**33**:445–55.

Nieva FJ. Aspectos ecológicos en *Spartina densiflora* Brong. Universidad de Sevilla, 1996.

Nieva FJJ, Díaz-Espejo A, Castellanos EM, & Figueroa ME. Field variability of invading populations of *Spartina densiflora* Brong. in different habitats of the Odiel Marshes (SW Spain). *Estuar Coast Shelf Sci* 2001;**52**:515–27.

Nissenbaum A. The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microb Ecol* 1975;**2**:139–61.

Nocete F, Álex E, Nieto JM, Sáez R, & Bayona MR. An archaeological approach to regional environmental pollution in the south-western Iberian Peninsula related to Third millennium BC mining and metallurgy. *J Archaeol Sci* 2005;**32**:1566–76.

Nogi Y, Hosoya S, Kato C, & Horikoshi K. *Psychromonas hadalis* sp. nov., a novel piezophilic bacterium isolated from the bottom of the Japan Trench. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:1360–4.

Nunan N. The microbial habitat in soil: Scale, heterogeneity and functional consequences. *J Plant Nutr Soil Sci* 2017;**180**:425–9.

O’Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:D733–45.

Oggerin M, Rodríguez N, Moral C del, & Amils R. Fungal jarosite biomineralization in Río Tinto. *Res Microbiol* 2014;**165**:719–25.

Oh D, Porter K, Russ B, Burns D, & Dyall-Smith M. Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* 2010;**14**:161–9.

Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, et al. vegan: community ecology. R package version 2.4-2 2017:<http://cran.r-project.org/package=vegan>.

Olías M, Cánovas CR, Nieto JM, & Sarmiento AM. Evaluation of the dissolved contaminant load transported by the Tinto and Odiel rivers (South West Spain). *Appl Geochemistry* 2006;**21**:1733–49.

Olías M, & Nieto J. Background conditions and mining pollution throughout history in the Río Tinto (SW Spain). *Environments* 2015;**2**:295–316.

Ollivier B, Fardeau M, Cayol J, Magot M, Patel BKC, et al. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. *Int J Syst Evol Microbiol* 1997;**48**:821–8.

Ollivier B, Hatchikian CE, Prensier G, Guezennec J, & Garcia J. Sulfate-reducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* 1991;**2**:74–81.

Olson ND, Treangen TJ, Hill CM, Cepeda-Espinoza V, Ghurye J, et al. Metagenomic assembly through the lens of validation: recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes. *Brief Bioinform* 2017:bbx098.

Orellana M V., Pang WL, Durand PM, Whitehead K, & Baliga NS. A role for programmed cell death in the microbial loop. *PLoS One* 2013;**8**:e62595.

Oremland RS, & King G. Methanogenesis in hypersaline environments. In: Cohen Y, & Rosenberg E, editors. *Microb. Mats. Physiol. Ecol. Benthic Microb. Communities*, Washington: American Society for Microbiology; 1989, p. 180–90.

Oremland RS, Kulp TR, Blum JS, Hoefft SE, Baesman S, et al. Microbiology: A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science (80-)* 2005;**308**:1305–8.

- Oren A.** Probing saltern brines with an oxygen electrode: what can we learn about the community metabolism in hypersaline systems? *Life* 2016;**6**:23.
- Oren A.** Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotechnol* 2015a;**33**:119–24.
- Oren A.** Pyruvate: a key nutrient in hypersaline environments? *Microorganisms* 2015b;**3**:407–16.
- Oren A.** Taxonomy of halophilic *Archaea*: current status and future challenges. *Extremophiles* 2014a;**18**:825–34.
- Oren A.** The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *J Biol Res* 2014b;**21**:23.
- Oren A.** *Salinibacter*: An extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett* 2013a;**342**:1–9.
- Oren A.** Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol* 2013b;**4**:1–6.
- Oren A.** Diversity of halophiles. In: Horikoshi K, editor. *Extrem. Handb.*, Tokyo: Springer Japan; 2011a, p. 309–25.
- Oren A.** Ecology of Halophiles. In: Horikoshi K, editor. *Extrem. Handb.*, Tokyo: Springer Japan; 2011b, p. 343–61.
- Oren A.** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* 2010;**31**:825–34.
- Oren A.** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 2008;**4**:2.
- Oren A.** Life in the Dead Sea - past, present and future. In: Navon O, editor. *Salt Earth*, vol 3, Jerusalem: Magnes Press; 2007.
- Oren A.** Two and a half centuries of qualitative and quantitative chemical analyses of Dead Sea water. *Isr J Chem* 2006a;**46**:69–77.
- Oren A.** The Order Halobacteriales. *Prokaryotes Vol 3* 2006b:113–64.
- Oren A.** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* 2005;**1**:2.
- Oren A.** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002;**28**:56–63.
- Oren A.** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999a;**63**:334–48.
- Oren A.** Benjamin Elazari Volcani (1915-1999): Sixty-three years of studies of the microbiology of the Dead Sea. *Int Microbiol* 1999b;**2**:195–8.
- Oren A.** The role of glycerol in the nutrition of halophilic archaeal communities: a study of respiratory electron transport. *FEMS Microbiol Ecol* 1995;**16**:281–9.
- Oren A.** The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* 1994;**13**:415–40.
- Oren A.** The microbial ecology of the Dead Sea. In: Marshall KC, editor. *Adv. Microb. Ecol.* vol. 10, New York: Plenum Publishing; 1988, p. 193–229.
- Oren A.** Population dynamics of halobacteria in the Dead Sea water column. *Limnol Oceanogr* 1983;**28**:1094–103.
- Oren A, Arahal DR, & Ventosa A.** Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;**59**:637–42.
- Oren A, Gavrieli I, Gavrieli J, Kohen M, Lati J, et al.** Biological effects of dilution of Dead Sea brine with

seawater: implications for the planning of the Red Sea–Dead Sea “Peace Conduit.” *J Mar Syst* 2004a;**46**:121–31.

Oren A, Rodríguez-Valera F, & Antón J. Red, extremely halophilic, but not archaeal: the physiology and ecology of *Salinibacter ruber*, a bacterium isolated from saltern crystallizer ponds. In: Ventosa A, editor. Halophilic Microorg., Springer Berlin Heidelberg; 2004b, p. 63–76.

Oren A, Ventosa A, & Kamekura M. *Halobacteria*. Bergey’s Man. Syst. Archaea Bact., 2017.

Ortega G, Laín A, Tadeo X, López-Méndez B, Castaño D, et al. Halophilic enzyme activation induced by salts. *Sci Rep* 2011;**1**:1–6.

Oueriaghli N, Béjar V, Quesada E, & Martínez-Checa F. Molecular ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities within the athallassohaline environment of Rambla Salada, Spain. *Microb Ecol* 2013;**66**:297–311.

Oueriaghli N, González-Domenech CM, Martínez-Checa F, Muyzer G, Ventosa A, et al. Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment in the southeast of Spain. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;**87**:460–74.

Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri J V, Chuang H-Y, et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:5691–702.

Pagaling E, Haigh RD, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, et al. Sequence analysis of an Archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics* 2007;**8**:1–13.

Pagaling E, Wang H, Venables M, Wallace A, Grant WD, et al. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:5750–60.

Palacios C, Zettler E, Amils R, & Amaral-Zettler L. Contrasting microbial community assembly hypotheses: A reconciling tale from the Río Tinto. *PLoS One* 2008;**3**:e3853.

Pandit AS, Joshi MN, Bhargava P, Shaikh I, Ayachit GN, et al. A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the world. *Extremophiles* 2015;**19**:973–87.

Papendick RI, & Camprell GS. Theory and measurement of water potential. Water Potential Relations Soil Microbiol., Madison, WI: Soil Science Society of America; 1981, p. 1–22.

Papke RT, Koenig JE, Rodríguez-Valera F, & Doolittle WF. Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*. *Science (80-)* 2004;**306**:1928–9.

Papke RT, Zhaxybayeva O, Feil EJ, Sommerfeld K, Muise D, et al. Searching for species in haloarchaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:14092–7.

Papudeshi B, Haggerty JM, Doane M, Morris MM, Walsh K, et al. Optimizing and evaluating the reconstruction of metagenome-assembled microbial genomes. *BMC Genomics* 2017;**18**:1–13.

Paredes-Páliz KI, Caviedes MA, Doukkali B, Mateos-Naranjo E, Rodríguez-Llorente ID, et al. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environ Sci Pollut Res* 2016;**23**:19825–37.

Park JS. Effects of different ion compositions on growth of obligately halophilic protozoan *Halocafeteria seosinensis*. *Extremophiles* 2012;**16**:161–4.

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, & Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 2015;**25**:1043–55.

Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, Chaumeil PA, Woodcroft BJ, et al. Recovery of nearly 8,000

metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat Microbiol* 2017;**2**:1.

Parte AC. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:613–6.

Pašić L, Bartual SG, Ulrih NP, Grabnar M, & Velikonja BH. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;**54**:491–8.

Pašić L, Rodriguez-Mueller B, Martin-Cuadrado A-B, Mira A, Rohwer F, et al. Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. *BMC Genomics* 2009;**10**:570.

Pašić L, Ulrih NP, Crnigoj M, Grabnar M, & Velikonja BH. Haloarchaeal communities in the crystallizers of two Adriatic solar salterns. *Can J Microbiol* 2007;**53**:8–18.

Patel R, Mevada V, Prajapati D, Dudhagara P, Koringa P, et al. Metagenomic sequence of saline desert microbiota from wild ass sanctuary, Little Rann of Kutch, Gujarat, India. *Genomics Data* 2015;**3**:137–9.

Patel V, Munot H, Shouche YS, & Madamwar D. Response of bacterial community structure to seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang–Sosiya ship breaking yard, Bhavnagar, India. *Bioresour Technol* 2014;**161**:362–70.

Paul D, Kumbhare S V., Mhatre SS, Chowdhury SP, Shetty SA, et al. Exploration of microbial diversity and community structure of Lonar Lake: The only hypersaline meteorite crater lake within basalt rock. *Front Microbiol* 2016;**6**:1–12.

Paul S, Bag SK, Das S, Harvill ET, & Dutta C. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol* 2008;**9**:R70.

Pedrós-Alió C. Diversity of microbial communities: the case of solar salterns. In: Gunde-Cimerman N, Oren A, & Plemenitaš A, editors. *Adapt. to Life High Salt Conc. Archaea, Bact. Eukarya*, Dordrecht: Springer; 2005, p. 71–90.

Pedrós-Alió C, Calderón-Paz JI, MacLean MH, Medina G, Marrasé C, et al. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol* 2000;**32**:143–55.

Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, & Chin FYL. IDBA – A practical iterative de Bruijn graph *de novo* assembler. In: Berger B, editor. *Res. Comput. Mol. Biol.*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010, p. 426–40.

Peña A, Teeling H, Huerta-Cepas J, Santos F, Yarza P, et al. Fine-scale evolution: Genomic, phenotypic and ecological differentiation in two coexisting *Salinibacter ruber* strains. *ISME J* 2010;**4**:882–95.

Perreault NN, Andersen DT, Pollard WH, Greer CW, & Whyte LG. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:1532–43.

Pham VHT, & Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol* 2018;**30**:475–84.

Pinhassi J, DeLong EF, Bèjà O, González JM, & Pedrós-Alió C. Marine bacterial and archaeal ion-pumping rhodopsins: genetic diversity, physiology, and ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;**80**:929–54.

Piña GR, & Cervantes C. Microbial interactions with aluminium. *Biometals* 1996;**9**:311–6.

Pitt JI. Two new species of *Chrysosporium*. *Trans Br Mycol Soc* 1966;**49**:467–70.

Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Paraje Natural Marismas del Odiel y de las Reservas Naturales Isla de Enmedio y Marisma de El Burro. 2017.

Plominsky AM, Delherbe N, Ugalde JA, Allen EE, Blanchet M, et al. Metagenome sequencing of the microbial community of a solar saltern crystallizer pond at Cahuil Lagoon, Chile. *Genome Announc* 2014;**2**:e01172-14.

- Podell S, Emerson JB, Jones CM, Ugalde JA, Welch S, et al.** Seasonal fluctuations in ionic concentrations drive microbial succession in a hypersaline lake community. *ISME J* 2014;**8**:979–90.
- Podell S, Ugalde J a., Narasingarao P, Banfield JF, Heidelberg KB, et al.** Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. *PLoS One* 2013;**8**:e61692.
- Pontefract A, Zhu TF, Walker VK, Hepburn H, Lui C, et al.** Microbial diversity in a hypersaline sulfate lake: A terrestrial analog of ancient mars. *Front Microbiol* 2017;**8**:1–12.
- Post FJ.** The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol* 1977;**3**:143–65.
- Prangishvili D.** The wonderful world of archaeal viruses. *Annu Rev Microbiol* 2013;**67**:565–85.
- Price MN, Dehal PS, & Arkin AP.** FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;**5**:e9490.
- Pride DT, Meinersmann RJ, Wassenaar TM, & Blaser MJ.** Evolutionary implications of microbial genome tetranucleotide frequency biases. *Genome Res* 2003;**13**:145–56.
- Prosser JI.** Replicate or lie. *Environ Microbiol* 2010;**12**:1806–10.
- Purdy KJ, Cresswell-Maynard TD, Nedwell DB, McGenity TJ, Grant WD, et al.** Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environ Microbiol* 2004;**6**:591–5.
- Pushkarev A, & Béjà O.** Functional metagenomic screen reveals new and diverse microbial rhodopsins. *ISME J* 2016;**10**:2331–5.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, et al.** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:590–6.
- Quesada E, Bejar V, Valderrama MJ, Ventosa A, & Ramos Cormenzana AR.** Isolation and characterization of moderately halophilic nonmotile rods from different saline habitats. *Microbiologia* 1985;**1**:89–96.
- Quesada E, Ventosa A, Rodriguez-Valera F, Megias L, & Ramos-Cormenzana A.** Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. *Microbiology* 1983;**129**:2649–57.
- Quesada E, Ventosa A, Rodriguez-Valera F, & Ramos-Cormenzana A.** Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* 1982;**53**:155–61.
- Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, & Hatti-Kaul R.** Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;**85**:1687–96.
- Quince C, Curtis TP, & Sloan WT.** The rational exploration of microbial diversity. *ISME J* 2008;**2**:997–1006.
- R Core Team.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015:<http://www.R-project.org/>.
- Radwan M, Hanora A, Zan J, Mohamed NM, Abo-Elmatty DM, et al.** Bacterial community analyses of two red sea sponges. *Mar Biotechnol* 2010;**12**:350–60.
- Radwan SS, & Al-Mailem DM.** Microbial hydrocarbon-removal under halostress. In: Maheshwari D, & Saraf M, editors. Halophiles Biodivers. Sustain. Exploit, Springer; 2015, p. 323–54.
- Ramirez-Juidias E.** Study of erosion processes in the Tinto salt-marshes with remote sensing images. *Adv Image Video Process* 2014;**2**:39–52.
- Ramos-Cormenzana A.** Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. In: Da Costa MS, Duarte JC, & Williams RAD, editors. Microbiol. Extrem. Environ. its

Potential Biotechnol., London: Elsevier Applied Science; 1989, p. 289–309.

Ranjard L, Poly F, Combrisson J, Richaume A, Gourbière F, et al. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol* 2000;**39**:263–72.

Raymond JC, & Sistrom WR. *Ectothiorhodospira halophila*: A new species of the genus *Ectothiorhodospira*. *Arch Mikrobiol* 1969;**69**:121–6.

Redondo-Gómez S, Castillo JM, Luque CJ, Luque T, Figueroa ME, et al. Fundamental niche differentiation in subspecies of *Sarcocornia perennis* on a salt marsh elevational gradient. *Mar Ecol Prog Ser* 2007;**347**:15–20.

Redondo-Gómez S, Wharmby C, Castillo JM, Mateos-Naranjo E, Luque CJ, et al. Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia fruticosa*. *Physiol Plant* 2006;**128**:116–24.

Redondo S, Rubio-Casal AE, Castillo JM, Luque CJ, Álvarez AA, et al. Influences of salinity and light on germination of three *Sarcocornia* taxa with contrasted habitats. *Aquat Bot* 2004;**78**:255–64.

Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 2006;**57**:1017–23.

Rhoades JD. Soluble salts. In: Page AL, Miller RH, & Keeney DR, editors. *Methods Soil Anal. Part 2*, Madison, WI: ASA-SSSA; 1982, p. 167–78.

Rhoades JD, Chanduvi F, & Lesch S. Soil salinity assessment. Methods and interpretation of electrical conductivity measurements. Rome: FAO; 1999.

Rhodes ME, Fitz-Gibbon ST, Oren A, & House CH. Amino acid signatures of salinity on an environmental scale with a focus on the Dead Sea. *Environ Microbiol* 2010;**12**:2613–23.

Rhodes ME, Oren A, & House CH. Dynamics and persistence of Dead Sea microbial populations as shown by high-throughput sequencing of rRNA. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:2489–92.

Rice P, Longden I, & Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 2000;**16**:276–7.

Richards L, editor. US Salinity Laboratory Staff. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Agriculture Handbook No. 60. rev. ed. Washington: US Govt. Printing Office; 1954.

Ricotta C. Of beta diversity, variance, evenness, and dissimilarity. *Ecol Evol* 2017;**7**:4835–43.

Rietz DN, & Haynes RJ. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biol Biochem* 2003;**35**:845–54.

Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 2013;**499**:431–7.

Roberts DW. labdsv: ordination and multivariate analysis for ecology. R package version 1.8-0 2016:<http://cran.r-project.org/package=labdsv>.

Rodriguez-Brito B, Li L, Wegley L, Furlan M, Angly F, et al. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *ISME J* 2010;**4**:739–51.

Rodríguez-Valera F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Rodríguez-Valera F, editor. *Halophilic Bact.*, Fla: CRC Press, Boca Raton; 1988, p. 3–30.

Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, & Ramos-Cormenzana A. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* 1981;**7**:235–43.

Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, & Ramos-Cormenzana A. Isolation of extreme halophiles

from seawater. *Appl Environ Microbiol* 1979;**38**:164–5.

Rodríguez-Valera F, Ventosa A, Juez G, & Imhoff JF. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microb Ecol* 1985;**11**:107–15.

Roeßler M, & Müller V. Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**:3813–7.

Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, & Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 2016;**4**:e2584.

Romanovskaia VA, Avdeeva LV, Gladka GV, Pritula IR, Kharkhota MA, et al. Resistance of microorganisms of coastal ecosystems of the Dead Sea to extremal factors. *Mikrobiol Z* 2013;**75**:3–11.

Rosselló-Mora R, Lee N, Antón J, & Wagner M. Substrate uptake in extremely halophilic microbial communities revealed by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Extremophiles* 2003;**7**:409–13.

Rosselló-Mora R, Lucio M, Pêa A, Brito-Echeverría J, López-López A, et al. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME J* 2008;**2**:242–53.

Rothschild LJ, & Mancinelli RL. Life in extreme environments. *Nature* 2001;**409**:1092–101.

Rubio-Casal AE, Castillo JM, Luque CJ, & Figueroa ME. Nucleation and facilitation in salt pans in Mediterranean salt marshes. *J Veg Sci* 2001;**12**:761–70.

Ruiz F, Borrego J, González-Regalado ML, López-González N, Carro B, et al. Interaction between sedimentary processes, historical pollution and microfauna in the Tinto Estuary (SW Spain). *Environ Geol* 2009;**58**:779–83.

Ruiz F, Gonzalez-Regalado ML, Borrego J, Morales JA, Pendon JG, et al. Stratigraphic sequence, elemental concentrations and heavy metal pollution in Holocene sediments from the Tinto-Odiel Estuary, southwestern Spain. *Environ Geol* 1998;**34**:270–8.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol* 2007;**5**:0398–431.

Russell NJ. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenerg Biomembr* 1989;**21**:93–113.

Russell NJ, & Kogut M. Haloadaptation: salt sensing and cell-envelope changes. *Microbiol Sci* 1985;**2**:345–50.

Sainz A, Grande JA, & de la Torre ML. Characterisation of heavy metal discharge into the Ria of Huelva. *Environ Int* 2004;**30**:557–66.

Sánchez-Porro C, de la Haba RR, Soto-Ramírez N, Márquez MC, Montalvo-Rodríguez R, et al. Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;**59**:397–405.

Sánchez-Román M, Fernández-Remolar D, Amils R, Sánchez-Navas A, Schmid T, et al. Microbial mediated formation of Fe-carbonate minerals under extreme acidic conditions. *Sci Rep* 2014;**4**:1–7.

Sandaa R-AA, Skjoldal EF, Bratbak G, Foss Skjoldal E, & Bratbak G. Virioplankton community structure along a salinity gradient in a solar saltern. *Extremophiles* 2003;**7**:347–51.

Sangwan N, Xia F, & Gilbert JA. Recovering complete and draft population genomes from metagenome datasets. *Microbiome* 2016;**4**:1–11.

Santos-Bermejo JC, Beltrán R, & Gómez-Ariza JL. Spatial variations of heavy metals contamination in sediments from Odiel river (Southwest Spain). *Environ Int* 2003;**29**:69–77.

- Santos F, Yarza P, Parro V, Briones C, Antón J, et al.** The metavirome of a hypersaline environment. *Environ Microbiol* 2010;**12**:2965–76.
- Santos F, Yarza P, Parro V, Meseguer I, Inmaculada, Rosselló-Móra R, et al.** Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:1635–43.
- Sarmiento AM, Nieto JM, Olías M, & Cánovas CR.** Hydrochemical characteristics and seasonal influence on the pollution by acid mine drainage in the Odiel river Basin (SW Spain). *Appl Geochemistry* 2009;**24**:697–714.
- Saum SH, & Müller V.** Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: Chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems* 2008a;**4**:1–15.
- Saum SH, & Müller V.** Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: Ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol* 2008b;**10**:716–26.
- Savage KN, Krumholz LR, Oren A, & Elshahed MS.** *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:19–24.
- Schlöter M.** Structure and function of prokaryotes in soil. In: Huang P, Li Y, & Summer M, editors. *Handb. Soil Sci. Prop. Process.* 2nd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton; 2012, p. 24.11–24.18.
- Schmidt TM, & Schaechter M.** Sediment habitats. In: Schmidt TM, & Schaechter M, editors. *Top. Ecol. Environ. Microbiol.*, Amsterdam: Academic Press; 2012, p. 749.
- Schneegurt MA.** Colorimetric microbial diversity analysis and halotolerance along a soil salinity gradient at the Great Salt Plains of Oklahoma. *Res Microbiol* 2013;**164**:83–9.
- Schoenborn L, Yates PS, Bronwyn E, Hugenholtz P, Janssen PH, et al.** Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;**70**:4363–6.
- Seck EH, Dufour J-C, Raoult D, & Lagier J-C.** Halophilic & halotolerant prokaryotes in humans. *Future Microbiol* 2018:Epub ahead of print.
- Shannon C, & Weaver W.** The mathematical theory of communication. University of Illinois Press; 1949.
- Sharon I, & Banfield JF.** Genomes from metagenomics. *Science (80-)* 2013;**342**:1057–8.
- Shen C, Zhang C, Xin P, Kong J, & Ling L.** Salt dynamics in coastal marshes: formation of hypersaline zones. *Water Resour Res* 2018.
- Shi W, Takano T, & Liu S.** Isolation and characterization of novel bacterial taxa from extreme alkaline soil. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;**28**:2147–57.
- Shi Y, Adams JM, Ni Y, Yang T, Jing X, et al.** The biogeography of soil archaeal communities on the eastern Tibetan Plateau. *Nat Publ Gr* 2016;**6**:1–8.
- Shivaji S, Reddy GSN, Suresh K, Gupta P, Chintalapati S, et al.** *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;**55**:757–62.
- Siegel BZ, McMurty G, Siegel SM, Chen J, & Larock P.** Life in the calcium chloride environment of Don Juan Pond, Antarctica. *Nature* 1979;**280**:828.
- Silva GGZ, Cuevas DA, Dutilh BE, & Edwards RA.** FOCUS: an alignment-free model to identify organisms in metagenomes using non-negative least squares. *PeerJ* 2014;**2**:e425.
- Silva GGZ, Green KT, Dutilh BE, & Edwards RA.** SUPER-FOCUS: A tool for agile functional analysis of shotgun metagenomic data. *Bioinformatics* 2015;**32**:354–61.

- Simon Andrews.** FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010.
- Sinsuwan S, Rodtong S, & Yongsawatdigul J.** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochem* 2008;**43**:185–92.
- Smalla K, & van Elsas JD.** The soil environment. In: Liu WT, & Jansson JK, editors. *Environ. Mol. Microbiol.*, Norfolk: Caister Academic Press; 2010, p. 111–30.
- Smith P, House JI, Bustamante M, Sobocká J, Harper R, et al.** Global change pressures on soils from land use and management. *Glob Chang Biol* 2016;**22**:1008–28.
- Smucker AJM, Wang W, Kravchenko AN, & Dick WA.** Forms and functions of meso and micro-niches of carbon within soil aggregates. *J Nematol* 2010;**42**:84–6.
- Soil Survey Staff.** Keys to soil taxonomy. 12th ed. Washington DC: United States Department of Agriculture-Natural Resources Conservation Service; 2014.
- Soil Survey Staff.** Keys to soil taxonomy. vol. 153. 11th ed. Washington DC: USDA-Natural Resources Conservation Service; 2010.
- Solden LM, & Wrighton KC.** Finding life's missing pieces. *Nat Microbiol* 2017;**2**:1458–9.
- Soliman GSH, & Trüper HG.** *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaeobacterium with low magnesium requirement. *Zentralbl Bakteriol Hyg Abt I Orig* 1982;**C3**:318–29.
- Soo RM, Skennerton CT, Sekiguchi Y, Imelfort M, Paech SJ, et al.** An expanded genomic representation of the phylum Cyanobacteria. *Genome Biol Evol* 2014;**6**:1031–45.
- Sorokin DY, & Kuenen JG.** Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS Microbiol Rev* 2005;**29**:685–702.
- Sorokin DY, Makarova KS, Abbas B, Ferrer M, Golyshin PN, et al.** Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the euryarchaea evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol* 2017;**2**:17081.
- Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G, & Kuenen GJ.** *Thiohalospira halophila* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalospira alkaliphila* sp. nov., novel obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacteria from hypersaline habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008a;**58**:1685–92.
- Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G, & Kuenen GJ.** *Thiohalospira halophila* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalospira alkaliphila* sp. nov., novel obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacteria from hypersaline habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008b;**58**:1685–92.
- Sorokin ID, Kravchenko IK, Doroshenko E V., Boulygina ES, Zadorina E V., et al.** Haloalkaliphilic diazotrophs in soda solonchak soils. *FEMS Microbiol Ecol* 2008c;**65**:425–33.
- Souza-Egipsy V, González-Toril E, Zettler E, Amaral-Zettler L, Aguilera A, et al.** Prokaryotic community structure in algal photosynthetic biofilms from extreme acidic streams in Río Tinto (Huelva, Spain). *Int Microbiol* 2008;**11**:251–60.
- Spang A, Saw JH, Jørgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, et al.** Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 2015;**521**:173–9.
- Spanheimer R, & Müller V.** The molecular basis of salt adaptation in *Methanosarcina mazei* Gö1. *Arch Microbiol* 2008;**190**:271.
- Spring S, Bunk B, Spritzler C, Schumann P, Rohde M, et al.** Characterization of the first cultured representative of Verrucomicrobia subdivision 5 indicates the proposal of a novel phylum. *ISME J* 2016;**10**:2801–16.
- Starr EP, Shi S, Blazewicz SJ, Alexander J, Herman DJ, et al.** Stable isotope informed genome-resolved

metagenomics reveals that Saccharibacteria utilize microbially processed plant derived carbon. *bioRxiv* 2017:211649.

Stein L. Genome annotation: From sequence to biology. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:493–503.

Stephens DW, & Gillespie DM. Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnol Oceanogr* 1976;**21**:74–87.

Stock A, Breiner H-W, Pachiadaki M, Edgcomb V, Filker S, et al. Microbial eukaryote life in the new hypersaline deep-sea basin Thetis. *Extremophiles* 2012;**16**:21–34.

Sudo Y, Mizuno M, Wei Z, Takeuchi S, Tahara T, et al. The early steps in the photocycle of a photosensor protein sensory rhodopsin i from *Salinibacter ruber*. *J Phys Chem B* 2014;**118**:1510–8.

Sumner DY, Jungblut AD, Hawes I, Andersen DT, Mackey TJ, et al. Growth of elaborate microbial pinnacles in Lake Vanda, Antarctica. *Geobiology* 2016;**14**:556–74.

Sutton GC, Russell NJ, & Quinn PJ. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1991;**1061**:235–46.

Swan BK, Ehrhardt CJ, Reifel KM, Moreno LI, & Valentine DL. Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:757–68.

Switzer Blum J, Stolz JF, Oren A, & Oremland RS. *Selenihalanaerobacter shriftii* gen. nov., sp. nov., a halophilic anaerobe from Dead Sea sediments that respire selenate. *Arch Microbiol* 2001;**175**:208–19.

Takai K, Komatsu T, Inagaki F, & Horikoshi K. Distribution of Archaea in a black smoker chimney structure. *Appl Environ Microbiol* 2001;**67**:3618–29.

Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 2016;**44**:6614–24.

Tazi L, Breakwell DP, Harker AR, & Crandall KA. Life in extreme environments: Microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles* 2014;**18**:525–35.

Tecon R, & Or D. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiol Rev* 2017;**41**:599–623.

Teeling H, Waldmann J, Lombardot T, Bauer M, & Glöckner FO. TETRA: a web-service and a stand-alone program for the analysis and comparison of tetranucleotide usage patterns in DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 2004;**5**:163.

Teramoto M, Queck SY, & Ohnishi K. Specialized hydrocarbonoclastic bacteria prevailing in seawater around a port in the strait of Malacca. *PLoS One* 2013;**8**:2–8.

Thanki N, Thornton JM, & Goodfellow JM. Distributions of water around amino acid residues in proteins. *J Mol Biol* 1988;**202**:637–57.

Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, & Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2013;**14**:178–92.

Torsvik V, & Øvreås L. Microbial diversity, life strategies, and adaptations to life in extreme soils. In: Dion P, & Nautiyal S, editors. *Microbiol. Extrem. Soils*, Berlin: Springer-Verlag; 2008, p. 15–43.

Torsvik V, Øvreås L, & Thingstad TF. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science (80-)* 2002;**296**:1064–6.

Treves DS, Xia B, Zhou J, & Tiedje JM. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microb Ecol* 2003;**45**:20–8.

- Triadó-Margarit X, & Casamayor EO.** High genetic diversity and novelty in planktonic protists inhabiting inland and coastal high salinity water bodies. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;**85**:27–36.
- Trigui H, Masmoudi S, Brochier-Armanet C, Barani A, Grégori G, et al.** Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis. *Extremophiles* 2011;**15**:347–58.
- Trotsenko YA, & Khmelenina VN.** Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch Microbiol* 2002;**177**:123–31.
- Trüper HG, & Galinski EA.** Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* 1986;**42**:1182–7.
- Tschapek B, Pittelkow M, Sohn-Bösser L, Holtmann G, Smits SHJ, et al.** Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein *AfProX* into its high affinity, closed state. *J Mol Biol* 2011;**411**:36–52.
- Tschitschko B, Williams TJ, Allen MA, Zhong L, Raftery MJ, et al.** Ecophysiological distinctions of haloarchaea from a hypersaline Antarctic lake as determined by metaproteomics. *Appl Environ Microbiol* 2016;**82**:3165–73.
- Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, & Garbeva P.** The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol* 2018;**25**:280–92.
- Upasani VN, & Desai S.** Sambhar salt lake. Chemical composition of the brines and studies on haloalkaliphilic archaeobacteria. *Arch Microbiol* 1990;**154**:589–93.
- Valdenegro-Vega V, Naeem S, Carson J, Bowman JP, Tejedor del Real JL, et al.** Culturable microbiota of ranches southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii* Castelnau). *J Appl Microbiol* 2013;**115**:923–32.
- Valderrama MJ, Quesada E, Bejar V, Ventosa A, Gutierrez MC, et al.** *Deleya salina* sp. nov., a moderately halophilic Gram-negative bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1991;**41**:377–84.
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández R, JA E-A, Estrada-Alvarado I, et al.** Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* 2008;**12**:247–54.
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, Estrada-Alvarado I, Zavala-Díaz de la Serna FJ, et al.** Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 2009;**13**:609–21.
- Valles-Colomer M, Darzi Y, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, et al.** Meta-omics in inflammatory bowel disease research: Applications, challenges, and guidelines. *J Crohn's Colitis* 2016;**10**:735–46.
- Vartoukian SR, Palmer RM, & Wade WG.** Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2010;**309**:1–7.
- Vauclare P, Marty V, Fabiani E, Martinez N, Jasnin M, et al.** Molecular adaptation and salt stress response of *Halobacterium salinarum* cells revealed by neutron spectroscopy. *Extremophiles* 2015;**19**:1099–107.
- Vavourakis CD, Ghai R, Rodriguez-Valera F, Sorokin DY, Tringe SG, et al.** Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Front Microbiol* 2016;**7**:211.
- Ventosa A.** Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: Logan N, Lappin-Scott H, & Oyston P, editors. *Prokaryotic Divers. Mech. Significance*, Cambridge: Cambridge University Press; 2006, p. 223–53.
- Ventosa A, & Arahall DR.** Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their diversity. In: Gerday C, & Glansdorff N, editors. *Encycl. Life Support Syst.*, Oxford: UNESCO Publishing-

Eolss Publishers; 2002, p. 10010–9.

Ventosa A, Fernández AB, León MJ, Sánchez-Porro C, & Rodríguez-Valera F. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* 2014;**18**:811–24.

Ventosa A, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, & Papke RT. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr Opin Microbiol* 2015;**25**:80–7.

Ventosa A, Mellado E, Sánchez-Porro C, & Márquez MC. Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In: Dion P, & Nautiyal CS, editors. *Microbiol. Extrem. Soils*. 2nd ed., Berlin: Springer; 2008, p. 87–115.

Ventosa A, Nieto J, & Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;**62**:504–44.

Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, & Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* 1982;**128**:1959–68.

Ventosa A, Ramos-Cormenzana A, & Kocur M. Moderately halophilic Gram-positive cocci from hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol* 1983;**4**:564–70.

Ventosa A, Rodríguez-Valera F, Poindexter JS, & Reznikoff WS. Selection for moderately halophilic bacteria by gradual salinity increases. *Can J Microbiol* 1984;**30**:1279–82.

Vera-Gargallo B, Navarro-Sampedro L, Carballo M, & Ventosa A. Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline soils of the Odiel salt marshes in Huelva, southwestern Spain. *Genome Announc* 2018;**6**:e00140-18.

Vera-Gargallo B, & Ventosa A. Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel Saltmarshes (SW Spain). *Genes (Basel)* 2018;**9**:152.

Vestergaard G, Schulz S, Schöler A, & Schloter M. Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality. *Biol Fertil Soils* 2017;**53**:479–84.

Virgin HW, & Todd JA. Metagenomics and personalized medicine. *Cell* 2011;**147**:44–56.

Viver T, Orellana L, González-Torres P, Díaz S, Urdiain M, et al. Genomic comparison between members of the Salinibacteraceae family, and description of a new species of Salinibacter (*Salinibacter altiplanensis* sp. nov.) isolated from high altitude hypersaline environments of the Argentinian Altiplano. *Syst Appl Microbiol* 2018.

Vogt JC, Abed RMM, Albach DC, & Palinska KA. Bacterial and Archaeal diversity in hypersaline cyanobacterial mats along a transect in the intertidal flats of the Sultanate of Oman. *Microb Ecol* 2018;**75**:331–47.

Volcani BE. Studies on the microflora of the Dead Sea. The Hebrew University of Jerusalem, 1940.

Vollmers J, Wiegand S, & Kaster AK. Comparing and evaluating metagenome assembly tools from a microbiologist's perspective - Not only size matters! *PLoS One* 2017;**12**:1–31.

Voroney RP. The soil habitat. In: Eldor A P, editor. *Soil Microbiol. Ecol. Biochem*. 3rd ed., San Diego: Academic Press; 2007, p. 25–49.

Vos M, Wolf AB, Jennings SJ, & Kowalchuk GA. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Rev* 2013;**37**:936–54.

Van de Vossenberg JLCM, Driessen AJM, & Konings WN. The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 1998;**2**:163–70.

Vreeland RH. Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 1987;**14**:311–56.

- Walkley A, & Black IA.** An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid tritration method. *Soil Sci* 1934;**37**:29–38.
- Wallace RJ, Snelling TJ, McCartney CA, Tapio I, & Strozzi F.** Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genet Sel Evol* 2017;**49**:1–11.
- Walsh DA, Papke RT, & Doolittle WF.** Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. *Environ Microbiol* 2005;**7**:1655–66.
- van der Walt AJ, van Goethem MW, Ramond JB, Makhalanya TP, Reva O, et al.** Assembling metagenomes, one community at a time. *BMC Genomics* 2017;**18**:1–13.
- Wang X, Han Z, Bai Z, Tang J, Ma A, et al.** Archaeal community structure along a gradient of petroleum contamination in saline-alkali soil. *J Environ Sci* 2011;**23**:1858–64.
- Wang Y-X, Liu J-H, Xiao W, Zhang X-X, Li Y-Q, et al.** *Fodinibius salinus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt mine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012a;**62**:390–6.
- Wang Y, Leung HCM, Yiu SM, & Chin FYL.** Metacluster 5.0: A two-round binning approach for metagenomic data for low-abundance species in a noisy sample. *Bioinformatics* 2012b;**28**:356–62.
- Wang YX, Liu JH, Xiao W, Ma XL, Lai YH, et al.** *Aliifodinibius roseus* gen. nov., sp. nov., and *Aliifodinibius sediminis* sp. nov., two moderately halophilic bacteria isolated from salt mine samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:2907–13.
- Ward BB, Martino DP, Diaz MC, & Joye SB.** Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 2000;**66**:2873–81.
- White RA, Bottos EM, Roy Chowdhury T, Zucker JD, Brislawn CJ, et al.** Molecule long-read sequencing facilitates assembly and genomic binning from complex soil metagenomes. *mSystems* 2016;**1**:e00045-16.
- Whitman WB, Coleman DC, & Wiebe WJ.** Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:6578–83.
- Whittaker RH.** Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 1972;**21**:213–51.
- Wickham H.** tidy: Easily tidy data with “spread()” and “gather()” functions. R package version 0.6.0 2016:<http://cran.r-project.org/package=tidy>.
- Wickham H.** ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York; 2009.
- Van Der Wielen PWJJ, Bolhuis H, Borin S, Daffonchio D, Corselli C, et al.** The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science (80-)* 2005;**307**:121–3.
- Van Der Wielen PWJJ, & Heijs SK.** Sulfate-reducing prokaryotic communities in two deep hypersaline anoxic basins in the Eastern Mediterranean deep sea: Brief report. *Environ Microbiol* 2007;**9**:1335–40.
- Williams JP, & Hallsworth JE.** Limits of life in hostile environments: No barriers to biosphere function? *Environ Microbiol* 2009;**11**:3292–308.
- Williams TJ, Allen MA, DeMaere MZ, Kyrpides NC, Tringe SG, et al.** Microbial ecology of an Antarctic hypersaline lake: genomic assessment of ecophysiology among dominant haloarchaea. *ISME J* 2014;**8**:1645–58.
- Williams TJ, Allen M, Tschitschko B, & Cavicchioli R.** Glycerol metabolism of haloarchaea. *Environ Microbiol* 2016;**19**:1–28.
- Williams WD.** Anthropogenic salinisation of inland waters. *Hydrobiologia* 2001;**466**:329–37.
- Wood JM.** Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev*

Microbiol 2011;**65**:215–38.

Wu Y-W, Simmons BA, & Singer SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2016;**32**:605–7.

Xiao W, Wang ZG, Wang YX, Schneegurt MA, Li ZY, et al. Comparative molecular analysis of the prokaryotic diversity of two salt mine soils in southwest China. *J Basic Microbiol* 2013;**53**:942–52.

Xie K, Deng Y, Zhang S, Zhang W, Liu J, et al. Prokaryotic community distribution along an ecological gradient of salinity in surface and subsurface saline soils. *Sci Rep* 2017;**7**:13332.

Xie W, Zhang C, Zhou X, & Wang P. Salinity-dominated change in community structure and ecological function of Archaea from the lower Pearl River to coastal South China Sea. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;**98**:7971–82.

Xiong J, Liu Y, Lin X, Zhang H, Zeng J, et al. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Environ Microbiol* 2012;**14**:2457–66.

Xu J, Li Y, Lü Z-Z, Zhou Y, Hou J, et al. *Halolamina litorea* sp. nov., a haloarchaeon isolated from a marine solar saltern. *Microbiol China* 2016;**43**:899–906.

Xu Y, Nogi Y, Kato C, Liang Z, Rüger HJ, et al. *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:533–8.

Yakimov MM, La Cono V, Slepak VZ, La Spada G, Arcadi E, et al. Microbial life in the Lake Medee, the largest deep-sea salt-saturated formation. *Sci Rep* 2013;**3**:1–9.

Yakimov MM, Giuliano L, Chernikova TN, Gentile G, Abraham WR, et al. *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;**51**:2133–43.

Yang J, Jiang H, Wu G, & Liu W. Phylum-level archaeal distributions in the sediments of Chinese lakes with a large range of salinity. *Geomicrobiol J* 2018;**35**:404–10.

Yang J, Ma L, Jiang H, Wu G, & Dong H. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Sci Rep* 2016;**6**:25078.

Yau S, Lauro FM, DeMaere MZ, Brown M V., Thomas T, et al. Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:6163–8.

Yau S, Lauro FM, Williams TJ, DeMaere MZ, Brown M V, et al. Metagenomic insights into strategies of carbon conservation and unusual sulfur biogeochemistry in a hypersaline Antarctic lake. *ISME J* 2013;**7**:1944.

Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, & Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2017;**110**:1–6.

Youssef NH, Ashlock-Savage KN, & Elshahed MS. Phylogenetic diversities and community structure of members of the extremely halophilic *Archaea* (Order *Halobacteriales*) in multiple saline sediment habitats. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:1332–44.

Youssef NH, Savage-Ashlock KN, McCully AL, Luedtke B, Shaw EI, et al. Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the *Halobacteriales*. *ISME J* 2014;**8**:636–49.

Yu Y, Lee C, Kim J, & Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* 2005;**89**:670–9.

- Zavarzin G, Zhilina T, & Pusheva M.** Halophilic acetogenic bacteria. In: Drake H, editor. *Acetogenesis*, New York: Chapman & Hall; 1994, p. 432–44.
- Zhang L, Kang M, Xu J, Xu J, Shuai Y, et al.** Bacterial and archaeal communities in the deep-sea sediments of inactive hydrothermal vents in the Southwest India Ridge. *Sci Rep* 2016;**6**:1–11.
- Zhang WY, Huo YY, Zhang XQ, Zhu XF, & Wu M.** *Halolamina salifodinae* sp. nov. and *Halolamina salina* sp. nov., two extremely halophilic archaea isolated from a salt mine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:4380–5.
- Zhao S, Liu J-J, Banerjee S, Zhou N, Zhao Z-Y, et al.** Soil pH is equally important as salinity in shaping bacterial communities in saline soils under halophytic vegetation. *Sci Rep* 2018;**8**:4550.
- Zhao Y, Tang H, & Ye Y.** RAPSearch2: A fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 2012;**28**:125–6.
- Zhaxybayeva O, Stepanauskas R, Mohan NR, & Papke RT.** Cell sorting analysis of geographically separated hypersaline environments. *Extremophiles* 2013;**17**:265–75.
- Zheng W, Chen C, Cheng Q, Wang Y, & Chu C.** Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (*Chroococcales*) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *Int Immunopharmacol* 2006;**6**:1093–9.
- Zhilina T, & Zavarzin G.** *Methanohalobium evestigatum* gen. nov., sp. nov., extremely halophilic methane-producing archaeobacteria. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1987;**293**:464–8.
- Zhong ZP, Liu Y, Miao LL, Wang F, Chu LM, et al.** Prokaryotic community structure driven by salinity and ionic concentrations in plateau lakes of the Tibetan Plateau. *Appl Environ Microbiol* 2016;**82**:1846–58.