

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIVERSIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL DOMINIO ARCHAEA EN
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA

Por

NAHUI OLIN MEDINA CHÁVEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

DICIEMBRE, 2019

DIVERSIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL DOMINIO ARCHAEA EN
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA



SUSANA DE LA TORRE ZAVALA
PRESIDENTE



HAMLET AVILÉS ARNAUT
SECRETARIO



ELVA TERESA ARECHIGA CARVAJAL
VOCAL 1



RICARDO CANALES DEL CASTILLO
VOCAL 2



PATRICIA TAMEZ GUERRA
VOCAL 3

DIVERSIDAD Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL DOMINIO ARCHAEA EN
CUATRO CIÉNEGAS, COAHUILA



SUSANA DE LA TORRE ZAVALA
DIRECTOR DE LA TESIS



VALERIA SOUZA SALDÍVAR
DIRECTORA EXTERNA DE LA TESIS

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Richard y Rosa

Por su gran amor siempre y en todo momento, haciéndome feliz todos los días por tenerlos a mi lado. Gracias por sus enseñanzas y consejos que he recibido de ustedes toda mi vida y que me han permitido seguir en esta.

Por los besos y abrazos infinitos

Por compartirme su gusto por las cosas extraordinarias

Por cuidarme y protegerme de adversidades y enfermedades

Por compartir su visión de la vida y la familia que lo es todo.

Por alentarme a realizar el doctorado y apoyarme cada segundo de él.

Por darme una vida en la que puedo disfrutar ustedes, mi hermana, Jake, Nina, Lilu y más recientemente de Rooney peluchin.

Los amo más de lo que pueden imaginar

A mi hermana, Olin.

Por tu amor incondicional, por tu compañía física y mental.

Por ser no sólo mi hermana, sino mi mejor amiga y confidente, my partner in crime, the ying to my yang, my ride or die forever.

Te amo emana

A mi asesora, Susana

Quien sin antecedentes decidió creer en mí y en compartir la locura de estudiar el enigmático tercer dominio de la vida conmigo.

Por apoyarme cuando no me aceptaron en el programa de maestría “porque la Astrobiología no era una línea de investigación del programa”.

Por enseñarme de ciencia, de la vida, de la vida en la ciencia y la ciencia en la vida.

Por escucharme y abrazarme cada vez que lo necesité.

Por impulsarme y motivarme con sus acciones en el día a día.

Por dejarme ser parte de su familia de lombricientos.

Por los logros alcanzados e inesperados

Por mi doctorado

Agradezco profunda y eternamente al Dr. *Hamlet Avilés Arnaut* por apoyarme desde el primer día.

Por sus enseñanzas en Cultivo de Tejidos (¡ya tengo muchas plantitas!)

Por su tiempo y sabios consejos.

Por su confianza y amistad.

Por los buenos momentos y pláticas en la hora de comida junto a la Dra. Susy

Por comprar galletas o dulces y tener siempre algo para darme de comer (la lombriz nunca se llena).

Agradezco a *Héctor Arocha*, mi hermanastro mayor, que siempre me apoyó en el laboratorio, me contagió de su sarcasmo y gusto culinario. Gracias Héctor por ser mi amigo y compañero.

Gracias a *Mercedes Cortés* por su eterna y mágica amistad. Por los momentos vividos en el TIB mientras te rompías la pierna. Por ser la primera valiente en querer aprenderme a ensamblar genomas, y por las borracheras infernales que compartimos.

A *Teresa Briones*, que me enseñó desde mis primeros semestres la logística del laboratorio y quien encuentro una gran amiga y compañera.

A la mejor dueña del changarro, mi *Cynthia Oviedo* que me apoyó, enseñó y cuidó en el laboratorio. Con quien compartí experiencias, chismes, complots navideños y muchas pulpas de tamarindo. *Cynthia* en ti encontré una amiga a quien debí conocer antes para alegrar mi vida.

A *Carlos*, por su amistad, confianza y compañía desde tiempos memorables, y de paso por ser el bebé del laboratorio.

Agradezco a mis chiquillas “Arqueanas” de servicio social y voluntarias: *Jacqueline González*, *Martita Manzanares*, *Paloma Souto*, *Fernanda*, *Valeria Magaña* y *Abigail Torres*, y en especial y con mucho cariño a *Kendra Rivera* quien por más de un año estuvo conmigo apoyándome en el proyecto. Con quien sufrí y padecí los horrores de los experimentos fallidos y mejor aún la maravilla de los buenos resultados.

Gracias *Josué Corona*, que, aunque te conocí en mis últimos años de doctorado conservo lindos momentos a lado de tu valiosa compañía y amistad.

A *Javier Cruz*, por tu compañerismo, amistad y ayuda no sólo a mí, sino a la Dra. Susy. *Alexa Peña* y *Jorge Pinzón*, que con su ayuda mis archaeas no perecieron durante mi último semestre.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio: *Alberto Ramos*, *Janneth Escudero*, *Max* y a todos aquellos que hayan estado a mi lado apoyándome.

A mi queridísima *Mariette Viladomat Jasso*, mi comadre de paper quien fue parte esencial de mi proyecto y que con mucho cariño me enseñó bioinformática desde cero cuando ella apenas iniciaba su posgrado. Gracias Mary por la amistad y cariño.

A mi otro compadre de paper, *Manuel Ullua-Gamiz*, que sin previo aviso me ayudó y enseñó a reconstruir las filogenias raras con bichos raros.

Agradezco a mi comité de tesis conformado por el Dr. *Ricardo Canales del Castillo* e Irene Ruvalcaba Ortega, por su ayuda y apoyo durante mi doctorado, por darme la oportunidad de conocer lo que es tener hijos.

A la Dra. *Patricia Tamez Guerra*, por su sabiduría, consejos y amor. Le agradezco por todos estos años de abrigo y apoyo en el ámbito académico y personal.

Por último, pero no menos importante, la Dra. *Valeria Souza* y el Dr. *Luis Eguiarte Fruns*, que con su entusiasmo y carisma logramos obtener bichas que son el remanente del paraíso que intentamos salvar. Por no sólo preocuparse por el sitio sino por las personas que viven en él y las que la rodean. Por enseñarnos a ser felices (si no hay más gente como usted, todos vamos a perecer).

DEDICATORIA

A mis padres, Richard y Rosa

A mi hermana, Olin

A mi asesora, Susana

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Extremofilia	8
2.2 Halofilia	13
2.2.1 Adaptaciones haloflicas de las arqueas.....	14
2.2.2 Metabolismo.....	15
2.2.3 Aislamiento y secuenciación de genes halófilos	16
2.2.4 La diversidad microbiológica en ambientes hipersalinos	16
2.2.5 Microorganismos halófilos como propuesta de vida en exoplanetas	18
2.3 Archaea	19
2.3.1 Sistemática del dominio Archaea	22
2.3.2 Las arqueas en los ecosistemas.	25
2.3.3 Aislamiento de arqueas	28
2.4 Aplicaciones y usos industriales de los procariotes halófilos	31
2.5 Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	34
2.5.1 Condiciones Ambientales	35
2.5.2 Organismos endémicos de Cuatro Ciénegas, Coahuila	35
2.5.3 Diversidad procariota en Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	37
2.5.4 Organismos procariotes cultivables de Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	38
2.6 Condiciones de Cultivo para arqueas halófilos	41
2.6.1 Sales.....	41
2.6.2 Temperatura.	41
2.6.3 pH	42
2.6.4 Estabilidad genética.....	42
2.6.5 Fuente de Carbono.....	42

3.	JUSTIFICACIÓN	43
4.	HIPÓTESIS	44
5.	OBJETIVOS	45
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
6.1.	Área de estudio.....	46
6.2	Muestreo	46
6.3	Medición de parámetros fisicoquímicos ambientales.....	47
I.	Enfoque dependiente de cultivo	47
6.4	Aislamiento primario de procariotes halófilos	47
6.5	Aislamiento secundario de procariotes halófilos	48
6.6	Identificación de las cepas aisladas	48
6.6.1	Identificación macroscópica.....	48
6.6.2	Pruebas bioquímicas	48
6.6.3	Ensayos enzimáticos preliminares.....	48
6.6.4	Extracción de DNA genómico de colonia	49
6.6.5	Reacción en Cadena de la polimerasa o PCR	50
6.6.6	Electroforesis.....	50
6.6.7	Clonación y transformación	51
6.6.8	Extracción de plásmido.....	51
6.6.9	Restricción enzimática con EcoR1	52
6.6.10	Secuenciación de amplicones del 16S rRNA	52
6.6.11	Procesamiento de secuencias de 16S	52
6.6.12	Secuenciación de genomas de aislados	52
6.6.13	Ensamble y Anotación de genomas	53
6.6.14	Inferencia del core genómico del género <i>Halorubrum</i>	53
6.6.15	Reconstrucción filogenética de las cepas 133 y 140	53
6.6.16	Criopreservación de cepas y consorcios microbianos	54
II.	Enfoque independiente de cultivo: Metagenómica	54
6.7	Extracción de DNA genómico de sedimento.....	54
6.8	PCR con oligonucleótidos específicos de Phyla.	54
6.9	Análisis bioinformático de metagenomas.....	56

6.10	Curva de acumulación de especies	56
6.11	Filogenia de especies obtenidas a través de perfil taxonómico de metagenomas 56	
6.12	Números de acceso de metagenomas	57
6.13	Nombres y números de acceso de los genes del core arqueano	57
6.14	Números de acceso de los genomas de referencia	57
7.	RESULTADOS.....	60
7.1	Identificación y caracterización de los aislados	60
7.2	Ensayos enzimáticos.....	63
7.3	Ensamblajes de genomas de arqueas cultivadas	65
7.4	Genes del core de las cepas 133 y 140 cultivadas con el género <i>Halorubrum</i> ... 66	
7.5	Reconstrucción filogenética de las arqueas cultivadas 133 y 140	67
7.6	Identificación de phyla presentes en sedimento por PCR	68
7.7	El Dominio Archaea en los Domos del Arqueano	68
7.8	Índices de diversidad	78
7.9	Reconstrucción filogenética.....	78
8.	DISCUSIÓN	79
8.1	Análisis de metagenómica	81
8.2	Los Domos del Arqueano en el Valle de Cuatro Ciénegas son buenos modelos del periodo arqueano, y son uno de los ambientes más diversos y abundantes del Dominio Archaea.....	82
8.3	La biosfera rara en la comunidad de los DA.....	86
8.4	Arqueas halófilas y metanógenas en los DA.	87
8.5	Termófilos y otros linajes de arqueas de los DA.	89
9.	CONCLUSIONES	91
	REFERENCIAS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de extremófilos en la industria y biotecnología (Rothschild & Mancinelli, 2001).....	11
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos y abundancia de arqueas en cuatro tapetes microbianos hipersalinos.....	17
Tabla 3. Datos utilizados para la identificación de los phyla de archaeas.	55
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos medidos en los Domos del Arqueano en Abril 2016. IBV (volts); Temp: temperatura °C; SPC: conductancia específica (µS/cm); Salinidad (psu); TDS: sólidos disueltos totales (g/L); pH (0-14); LDO: oxígeno disuelto (mg/L); CH4 (µg/L).....	60
Tabla 5. Genes core del género Halorubrum utilizados para la filogenia	66
Tabla 6. Índices de diversidad alfa y beta.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperaturas límite para la vida. Se muestra un rango de temperaturas, mostrando la más alta y más baja para cada taxón. Arqueas se muestran en rojo, bacterias en azul, algas en verde claro, hongos en café, protozoarios en amarillo, plantas en verde oscuro y animales en púrpura (Rothschild & Mancinelli, 2001).	9
Figura 2. Límites de pH para la vida. Ejemplos de taxones y sus pH óptimos. Las Arqueas se muestran en rojo, bacterias en azul, algas en verde claro, protistas en amarillo, hongos en café, plantas en verde oscuro y animales en púrpura (Rothschild & Mancinelli, 2001).....	9
Figura 3. Representación de la corteza terrestre que muestra la diversidad de ambientes extremos y su ubicación aproximada (Merino et al., 2019).	10
Figura 4. Simbiosis metabólica del origen de los eucariotes (Lopez-Garcia & Moreira, 2019)	20
Figura 5. Actual árbol de la vida, incluyendo la diversidad total representada por genomas secuenciados (Hug et al., 2016).	24
Figura 6. Representación esquemática de tres estrategias propuestas para mejorar el aislamiento de arqueas. a) Refinamiento del cultivo selectivo basado en la información genética y transcripcional b) Búsqueda de condiciones, medio e incubación con variantes en la composición de los medios de cultivo, temperaturas, pH y salinidad c) combinación de técnicas de cultivo (1) co-cultivo, (2) aplicación de DIET (Trasferencia Directa de Electrones entre Especies), (3) aislamiento de células únicas, (4) HTC (Cultivo de alto rendimiento), (5) simulación de ambientes naturales (Sun et al., 2019).	30
Figura 7. Tapete microbiano.	46
Figura 8. A) Localización de Cuatro Ciénegas, Coahuila en México; B) Tapetes microbianos de los Domos del Arqueano con una capa superficial muy flexible, conteniendo una burbuja encontrada dentro del Rancho Pozas Azules en la región del Desierto Chihuahense. C) Muestreo de tres temporadas continuas en los Domos del Arqueano: DA1 (abril 2016), DA2 (septiembre 2016), DA3 (febrero 2017), de los tapetes microbianos y su estructura de la comunidad microbiana en su respectiva temporada.....	61

Figura 9. Fotografías de cultivos aislados de Domos del Arqueano, con sus morfologías macro y microscópicas y sus respectivas tinciones gram.	62
Figura 10. Ensayos enzimáticos preliminares de los arqueanos aislados.	64
Figura 11. Visualización de los genomas 133 y 140 mediante DNAPlot de Artemis. Del ensamble del genoma 133 se obtuvieron 5070 contigs, mientras que del genoma 140 se obtuvieron 1547 contigs.	65
Figura 12. Reconstrucción filogenética a partir de 23 genes concatenados del core del género Halorubrum mediante el algoritmo Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo evolutivo TVM+I+G (Modelo de transversión + p-inv* + distribución gamma) con 100 bootstraps. *p-inv: proporción de sitios invariables	67
Figura 13. Electroforesis 1% agarosa. Carril MPM: Marcador de peso molecular; Carril 2: 16s Bacteria Control +; Carril 3: Fila Crenarchaeota; Carril 4: Fila Korarchaeota; Carril 5: 16S Bacteria Control -; Carril 6: 16S de Archaea control -; Carril 7: 16S Archaea control +; Carril 8: Fila Euryarchaeota; Carril 9; Fila Thaumarchaeota; Carril 10: Control Negativo.....	68
Figura 14. a) Representación de la diversidad total promedio de los tres metagenomas, b) representación de la diversidad de los phyla del Dominio Archaea.	69
Figura 15. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de clase.	70
Figura 16. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de orden.	71
Figura 17. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de familia.	72
Figura 18. Especies más abundantes y su cambio a través del tiempo.	73
Figura 19. Abundancias relativas de taxones arqueanos condicionalmente raros a través de los tres muestreos en los Domos del Arqueano.	74
Figura 20. Abundancias relativas de taxones arqueanos transitoriamente raros a través de los muestreos de los Domos del Arqueano.....	75
Figura 21. Arqueas raras sin clasificación de los Domos del Arqueano.	76
Figura 22. Reconstrucción filogenética del Dominio Archaea encontrada en DA1, DA2 y DA3, mediante el perfil taxonómico dado por MetaPhlAn2, basado en secuencias completas del gen 16S, usando el método maximum likelihood, construido con el modelo evolutivo K-2 +G con 1000 replicados.	77

RESUMEN

En este trabajo describimos la diversidad de Archaea en un estanque poco profundo en el Valle de Cuatro Ciénegas (VCC) al noreste de México, con condiciones hipersalinas fluctuantes que contienen esteras microbianas elásticas que pueden formar pequeños domos donde su interior anóxico nos recuerda las características del Eón Arqueano, rico en gases de metano y azufre; así, llamamos a este sitio los Domos del Arqueano (DA). Estos domos solo se forman después de fuertes lluvias que son raras en el desierto de Chihuahuense. El VCC es un oasis único con cientos de pozas que contiene especies endémicas de animales, plantas y comunidades microbianas muy diversas y únicas, a pesar de su estequiometría muy sesgada, debido principalmente al contenido extremadamente bajo de fósforo (suelos, columnas de agua y sedimentos). Esta oligotrofia extrema ha favorecido la supervivencia de microorganismos ancestrales. En este proyecto, se realizó un enfoque de secuenciación de metagenomas completos para este sitio inusual en tres estaciones diferentes, así como un enfoque dependiente de cultivo, en el cual se lograron aislar y describir 4 cultivos arqueanos para evaluar la extensión de la biodiversidad de Archaea, ya que los miembros de este Dominio han estado sub-representados en diferentes sitios de estudio dentro del oasis. Encontramos una comunidad Arqueana muy diversa que abarca ~ 5% de los metagenomas. En los tres metagenomas la comunidad arqueana mantuvo su abundancia y la mayoría de las cepas mostraron formar un núcleo resistente durante tres muestreos estacionales (2016-2017), a pesar de las fluctuaciones ambientales. Sin embargo, las abundancias relativas de las 230 OTU arqueanas (usando un cutoff de 97%) fueron lo suficientemente bajas (<0.1%) para ser consideradas parte de la biosfera rara. El hallazgo de AD y su descripción dentro de CCB confirma que este sitio en particular es el más diverso para el Dominio Archaea que conocemos y abre nuevos caminos para comprender las fuerzas que una vez impulsaron y siguen formando el ensamblaje de la comunidad microbiana.

ABSTRACT

Herein we describe the Archaea diversity in a shallow pond in the Cuatro Ciénegas Basin (CCB), Northeast Mexico, with fluctuating hypersaline conditions containing elastic microbial mats that can form small domes where their anoxic inside reminds us of the characteristics of the Archaean Eon, rich in methane and sulfur gases; thus, we named this site the Archaean Domes (AD). These domes only form after heavy rains that are rare in the Chihuahuan desert. CCB is a unique oasis with hundreds of ponds, containing endemic species of animals, plants and highly diverse and unique microbial communities, despite its very biased stoichiometry, due mostly to extreme low phosphorus content (soils, water columns and sediments). This extreme oligotrophy has favored survival of ancestral microorganisms. Whole metagenome sequencing approach was performed for this unusual site in three different seasons as well as a culture-dependent approach, in which 4 archaean cultures were isolated and described to assess the extent of the Archaea biodiversity, with a focus on extremophiles, since members of the Archaea had been underrepresented in different study sites within the oasis. We found a highly diverse Archaea community compassing ~5% of the metagenomes. The archaeal portion in all three metagenomes maintained its abundance and most of the strains showed to form a resilient core during three seasonal samplings (2016-2017), despite environmental fluctuations. However, relative abundances of all 230 archaeal OTUs (defined using a 97% cutoff) were low enough (<0.1%) to be considered part of the rare biosphere. AD finding and their description within CCB confirms that this particular pond is the most diverse for Archaea that we are aware of and opens new paths for understanding the forces that once drove and keep shaping microbial community assemblage.

1. INTRODUCCIÓN

Los ambientes hipersalinos se han encontrado en una gran variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres. En estos habitan no solo microorganismos halotolerantes sino también se pueden encontrar microorganismos halófilos. De estos ecosistemas extremos se han logrado aislar organismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos pertenecientes a los dominios *Archaea* que participan en la oxidación total de la materia orgánica, así como microorganismos que utilizan compuestos inorgánicos reducidos. Para adaptarse a las condiciones de alta salinidad, los microorganismos halófilos han desarrollado varias estrategias bioquímicas incluyendo la síntesis de solutos para mantener su función y estructura celular. Estos solutos, junto con otros compuestos (bacteriodopsina, exopolisacáridos, hidrolasas y biosurfactantes) producidos por microbios halófilos son claramente de interés industrial (Hedi et al., 2009).

El Valle de Cuatro Ciénegas es uno de los más importantes humedales dentro del Desierto Chihuahuense y pertenece a un área semidesértica ya que se presentan lluvias de verano con una precipitación anual inferior a 150 mm (CONANP, 2006); dentro de este humedal se encuentra el sistema acuático Churince, el cual consiste en un manantial y dos lagunas disecadas. La explotación de agua subterránea ha disminuido significativamente el volumen de agua dentro del sistema. La importancia de esta zona es su biodiversidad terrestre y acuática, ya que habitan especies endémicas y en peligro de extinción (V. Souza et al., 2006) a pesar del alto grado de oligotrofia, especialmente en fósforo.

Los estudios realizados durante los últimos años han revelado que las arqueas marinas son un componente esencial del sistema planctónico y que su abundancia y composición cambia según escalas espaciales y temporales identificables. Las arqueas marinas constituyen un claro ejemplo de un grupo de organismos hasta hace poco totalmente desconocidos, pero con una relevancia indiscutible en la naturaleza. El objetivo de este estudio fue explorar la diversidad filogenética y funcional de archaeas halofílicas aisladas de sedimentos superficiales de la zona de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Para lograr el objetivo, se llevó a cabo la exploración del dominio Archaea a partir de datos de metagenoma obtenidos de una secuenciación de nueva generación de la zona llamada “Domos del Arqueano” (DA), y además se implementaron estrategias de aislamiento para cultivar y aislar microorganismos halófilos pertenecientes al dominio Archaea, así como la aplicación de técnicas para estudiar la actividad (o función) de los microorganismos *in vitro*. El cultivo de dichos microorganismos permitirá la caracterización bioquímica y molecular, así como el diseño de nuevos marcadores para utilizarlos en la biología molecular arqueas, así como la exploración del potencial biotecnológico de dichos aislados microbianos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Extremofilia

La vida en el planeta Tierra es un fenómeno de versatilidad muy elevada (Minelli, 2005). Sus límites, esto es, en los rangos de los parámetros ambientales físico-químicos, tales como pH, temperatura, concentración de oxígeno, niveles de radiación, salinidad, presión atmosférica e incluso disponibilidad de nutrientes y agua son algunos de los hábitats y nichos para aquellos seres vivos capaces de crecer y desarrollarse mediante mecanismos de adaptación (Harrison et al., 2013; Pikuta et al., 2007). Éstos, en su mayoría microorganismos, se les conoce como extremófilos y abarcan los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya (Macelroy, 1974). De manera inicial, hay que distinguir entre microorganismos que toleran o se adaptan a condiciones extremas y aquellos que requieren de condiciones extremas para su óptimo desarrollo, éstos últimos son los estrictamente extremófilos (Low-Decarie et al., 2016). De acuerdo con el tipo de hábitat en el que prosperan, se dividen en termófilos (altas temperaturas), psicrófilos (muy fríos) (Figura 1), acidófilos (altamente ácidos), alcalófilos (muy alcalinos) (Figura 2), halófilos (de alta salinidad), barófilos (de altísima presión).

Estos hábitats incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales (donde pueden encontrarse microorganismos a temperaturas que exceden los 100° C) (Stetter, 1999). También se encuentran organismos extremófilos en lagos salinos, a veces en condiciones de salinidad casi de saturación, y en ambientes con valores del pH extremo, sea ácido (zonas de solfataras) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras alcalinas, lagos de carbonato de sodio)(Merino et al., 2019; Pikuta et al., 2007; Rampelotto, 2013). Los hábitats de los organismos psicrófilos incluyen los mares y tierras polares fríos y los glaciares alpinos, así como sedimentos del fondo del mar (Deming, 2009) (Figura 3).

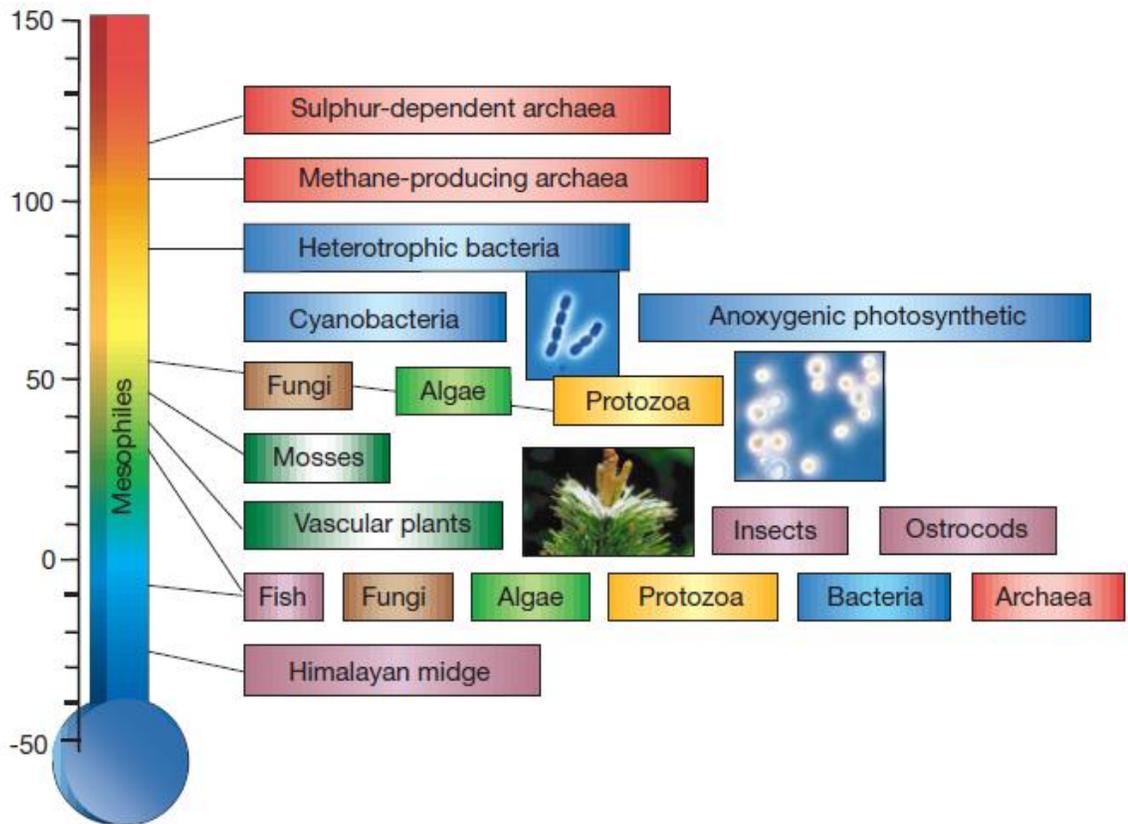


Figura 1. Temperaturas límite para la vida. Se muestra un rango de temperaturas, mostrando la más alta y más baja para cada taxón. Arqueas se muestran en rojo, bacterias en azul, algas en verde claro, hongos en café, protozoarios en amarillo, plantas en verde oscuro y animales en púrpura (Rothschild & Mancinelli, 2001).

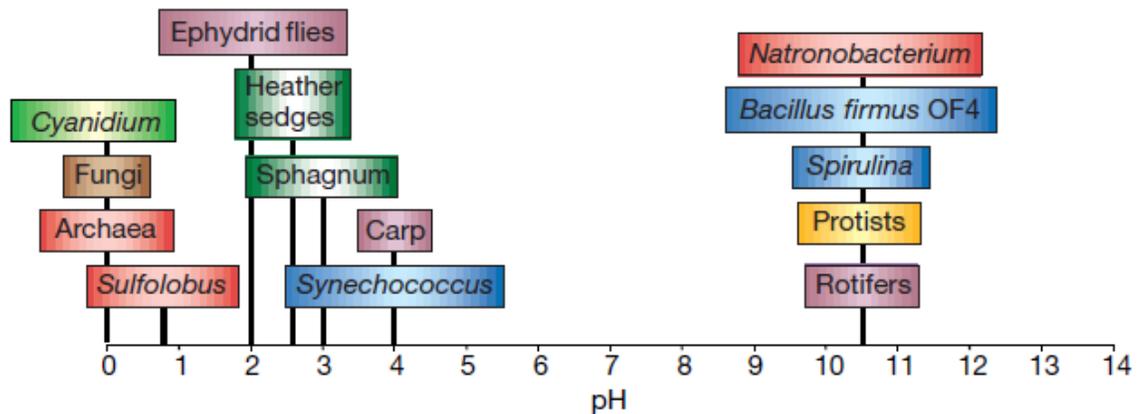


Figura 2. Límites de pH para la vida. Ejemplos de taxones y sus pH óptimos. Las Arqueas se muestran en rojo, bacterias en azul, algas en verde claro, protistas en amarillo, hongos en café, plantas en verde oscuro y animales en púrpura (Rothschild & Mancinelli, 2001).

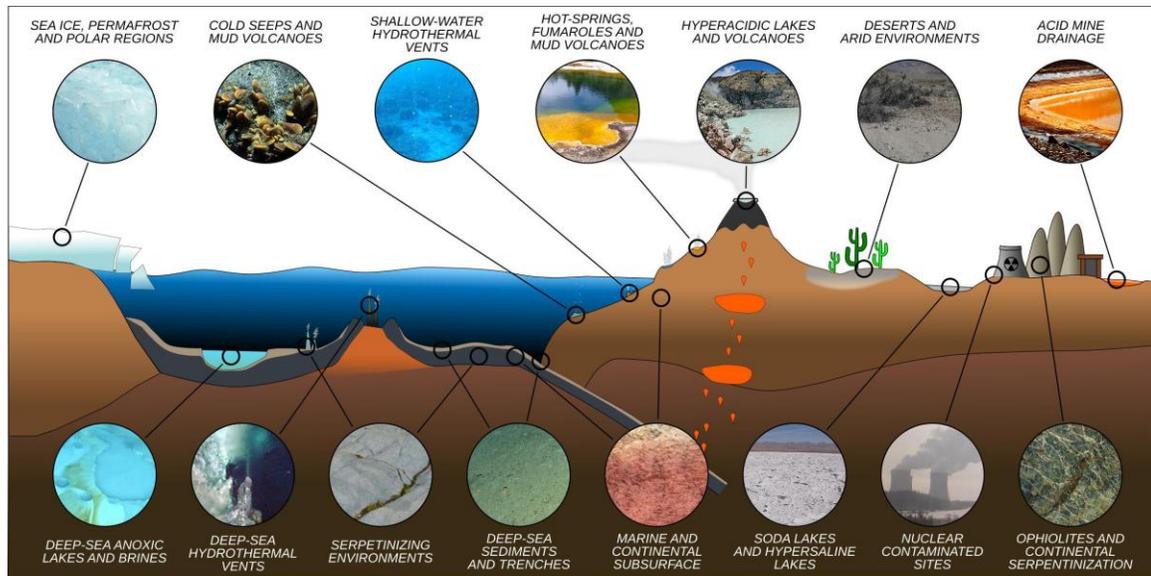


Figura 3. Representación de la corteza terrestre que muestra la diversidad de ambientes extremos y su ubicación aproximada (Merino et al., 2019).

La supervivencia de los extremófilos es posible debido a que sus células tienen componentes y propiedades específicas, por ejemplo, poseen enzimas estables y funcionales a condiciones extremas, y sus paredes celulares están construidas a partir de uniones químicas distintas que las convencionales otorgándoles mayor (Kates, 1992; Stetter, 1999); además de sintetizar y acumular intracelularmente solutos que les permiten mantener un equilibrio osmótico cuando se encuentran en condiciones salinas (Roberts, 2005) o que impiden que se congelen y se lisen en condiciones de baja temperatura (De Maayer et al., 2014). Si tomamos en cuenta que las particularidades de los seres vivos están determinadas en gran parte por la información genética, las propiedades peculiares de los extremófilos estarían representadas en sus genes, representando un gran interés para el estudio genómico.

Los microorganismos extremófilos han supuesto una revolución en áreas tales como: astrobiología, biología molecular y sorprendentemente en varios sectores industriales (Coker, 2016; L. Kumar, Awasthi, G. and Singh B., 2011). Debido a que muchos procesos industriales requieren altas o bajas temperaturas o pH ácidos o alcalinos, los extremófilos se han convertido para las industrias en atractivas fuentes de biocatalizadores (enzimas) estables a condiciones extremas (Elleuche et al., 2014). Por

ejemplo, en la industria de los detergentes y jabones para la ropa de uso hogareño se utilizan biocatalizadores que quiten las manchas a baja temperatura, mientras que en tratamientos de esterilización de ropa de quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas (Elleuche et al., 2014; Sarmiento et al., 2015). La industria del cuero y las pieles requiere enzimas que degraden proteínas de la piel de los animales en condiciones de alta salinidad o minerales. En cada caso se emplearán enzimas provenientes de diferentes extremófilos. En una primera instancia, los propios organismos eran la fuente de donde se extraían las enzimas. Luego, se clonaron los genes de los extremófilos que codifican dichas enzimas y actualmente se las produce a escala industrial en microorganismos recombinantes que fueron transformados para que sobre produzcan la enzima de interés en biorreactores. Algunas de las enzimas más empleadas son (Adams, 1995; Dumorne et al., 2017).

- ⇒ Proteasas: degradan proteínas, por ejemplo, la hemoglobina de la mancha de sangre.
- ⇒ Celulasas: degradan celulosa, principal componente de la pared de la célula vegetal.
- ⇒ Xilanasas y hemicelulasas: degradan componentes de la pared vegetal y se utilizan en la obtención de productos panificados y de jugo de frutas.
- ⇒ Lipasas: degradan ácidos grasos, aceites y otras grasas.
- ⇒ Amilasas: se utilizan en la industria alimenticia para degradar el almidón de los cereales a azúcares más simples.

Otra aplicación de las enzimas obtenidas de los extremófilos es la investigación básica. Por ejemplo, en laboratorios de biología molecular se utilizan técnicas que requieren de enzimas estables a altas o bajas temperaturas. Un caso puntual es la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), en la cual se requiere una enzima (ADN polimerasa) que produce cadenas de ADN a 94 °C. Para lograrlo se utiliza el ADN polimerasa obtenida del termófilo *Thermus aquaticus* (Tindall & Kunkel, 1988).

Tabla 1. Ejemplos de extremófilos en la industria y biotecnología (Rothschild & Mancinelli, 2001)

Proceso industrial	Biomoléculas	Ventaja	Organismos fuente
Hidrólisis de almidón para producir dextrinas, solubles, maltodextrinas y jarabe de maíz	α - Amilasa	Alta estabilidad, ácido úrico, amilasa de bacteria	<i>Bacillus stearothermophilus</i> G-ZYME G995 (Enzyme Bio-System Ltd)

Blanqueamiento de papel	Xylanasas	Se utiliza menor cantidad de blanqueador	Termófilos
Evitar el estancamiento en la gama de productos	α - Amilasa	Da un impulso a la fermentación de levadura	Amilasa bacteriana más estable disponible, G-ZYME G-995
Procesamiento de alimentos, horneado y fabricación de cerveza, detergentes	Proteasas	Estable a altas temperaturas	Termófilos
Reacción de PCR	ADN polimerasa	Sin necesidad de agregar enzimas adicionales a cada ciclo	Termófilos
Maduración de queso en la producción diaria	Proteasas neutrales	Estables a bajas temperaturas	Psicrófilos
Degradación de polímeros en detergentes	Proteasas, amilasas y lipasas	Mejoran el funcionamiento de detergentes	Psicrófilos
Degradación de polímeros en detergentes	Celulasas, proteasas, amilasas y lipasas	Estable a pH altos	Alcalófilos
Maricultura	Ácidos grasos poli insaturados	Producido a bajas temperaturas	Psicrófilos
Biorremediación	Reducción de derrames de petróleo	Trabaja eficientemente en aguas de baja temperatura	Psicrófilos
Biosensores	Deshidrogenasas		Psicrófilos
Desulfuración de carbón	Oxidación de azufre		Acidófilos
Producción de antibióticos	Antibióticos		Alcalófilos
Coloración de alimentos	Caroteno	Producción de bajo costo	Halófilos
Farmacéuticos	Glicerol, solutos compatibles	Producción de bajo costo	Halófilos
Surfactantes para farmacéuticos	Membranas		Halófilos

2.2 Halofilia

Los ambientes hipersalinos son muy poco conocidos para la sociedad y como su nombre lo indica, son aquellos sitios con concentraciones de sales elevadas mayores al 10% (Ma et al., 2010; Oren, Heldal, et al., 2002; Paul & Mormile, 2017). Pueden encontrarse en lagunas costeras, salinas, salmuera, zonas litorales, suelos desiertos salinos, lagunas salobres etc.; por ejemplo, la salinidad del agua de mar está compuesta principalmente de cloruro de sodio en una concentración de alrededor 3.5% (Ma et al., 2010; Paul & Mormile, 2017).

La vida en los ambientes hipersalinos es difícil ya que la salinidad origina un estrés osmótico, haciendo que la gran mayoría de seres vivos sean incapaces de vivir en estos ecosistemas. Si el entorno es salino, con mucha concentración de sales, el agua del interior de las células tiende a salir hacia su exterior. Es decir, se desecan y mueren. Sin embargo, en los microorganismos halófilos esto no ocurre (DasSarma & DasSarma, 2012; Ma et al., 2010).

La vida microbiana ha sido capaz de adaptarse y sobrevivir bajo estas condiciones extremas (Kerkar, 2004). Halófilo es el adjetivo que se aplica a los organismos que viven en estos ecosistemas (Oren, Eleri, et al., 2002). La palabra proviene del griego *halos* (sal), y *filo* (amante de), por lo que literalmente significa 'amante de la sal' (DasSarma & DasSarma, 2012).

Aunque las sales se requieren para todas las formas de vida, los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento: los halófilos ligeros muestran crecimiento óptimo dentro de una concentración de NaCl que oscila entre 0.2 y 0.85 M (2-5%); los halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20 %) de NaCl y, por último, los halófilos extremos, que crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl. En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de

concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (DasSarma & DasSarma, 2012).

Un dato interesante de estos microorganismos es que incluso se propone que podrían ser la base de la vida en otros planetas. Geoffrey A. Landis de la NASA Glenn Research Center, opinó que el agua en las condiciones de temperatura y presión en Marte podría ser altamente salina, y por tanto las formas de vida serían halófilas. Los halófilos extremos son fuente de estudio de proyectos de astrobiología en tanto que son formas antiguas de vida en la Tierra y se podrían trazar analogías, o al menos dar pistas con vida en otros planetas (Oren, 2014).

Específicamente los miembros del Dominio Archaea son los modelos por excelencia de esta extremofilia. Las Arqueas viven donde otros organismos morirían, y todo esto es posible gracias a diversas adaptaciones fisiológicas que les permiten retener agua.

2.2.1 Adaptaciones halofílicas de las arqueas

Las arqueas tienen la capacidad de balancear el efecto osmótico del ambiente externas y resistir contra los efectos deshidratantes de las sales; incluso algunas son capaces de vivir en condiciones salinas previniendo la desecación de su citoplasma (DasSarma & DasSarma, 2012).

Las arqueas halófilas moderadas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles, que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos (DasSarma & DasSarma, 2012; Khanafari, 2010). Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad (Jaakkola et al., 2016). También se han descrito sus posibles aplicaciones en tecnología enzimática (biosensores, PCR, etc.) y en la industria farmacéutica y cosmética (Madigan et al., 2004).

Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. Así, en diversos estudios en los que se comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina-betaína, trehalosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores del calor y los procesos de congelación y descongelación (da Costa et al., 1998; De Maayer et al., 2014; Roberts, 2005).

2.2.2 Metabolismo

Las haloarqueas por lo general son microorganismos quimioheterótrofos aerobios, es decir, utilizan materia orgánica como fuente de carbono y energía, siendo el O₂ el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. No obstante, en condiciones de iluminación y de baja presión de O₂ pueden comportarse como fotótrofos (pueden realizar la fotofosforilación a través de la bacteriodopsina). No son capaces de crecer autotróficamente (con CO₂ como única fuente de carbono), pero algunas pueden hacer fijación no reductora del CO₂ a glicina en presencia de amonio y propionato (Javor, 1989). No todas son aerobias estrictas: algunas pueden fermentar ciertos aminoácidos (Hartmann *et al.*, 1980) y otras pueden realizar una respiración anaerobia teniendo como aceptor final de electrones el nitrato (Mancinelli & Hochstein, 1986).

Durante mucho tiempo se creyó que las haloarqueas eran incapaces de metabolizar carbohidratos. Sin embargo, se ha demostrado que sí pueden hacerlo (Pimenov et al., 1997; Rodriguez-Valera et al., 1980). El catabolismo de las hexosas lo realizan a través de una modificación de la ruta de Enter-Doudoroff donde la glucosa es oxidada a gluconato y éste deshidratado a 2-ceto-3. deoxigluconato, posteriormente fosforilado dando 2-ceto-3-deoxi-6-fofocluconato, continuando la vía normal de Entner-Doudoroff (Danson & Hough, 1992). En todas las arqueas la conversión de piruvato a acetyl-Co está catalizada por la piruvato oxidoreductasa, que es distinta del sistema de la piruvato deshidrogenasa de bacterias y eucariotas, en halófilos el aceptor final de electrones es la ferredoxina utilizándose en lugar de NAD⁺ (Danson & Hough, 1992). Presentan un ciclo de los ácidos tricarboxílicos completo, idéntico al de bacterias y eucariotas, sirviendo

para generar energía y suministrar precursores para biosíntesis. También permite la utilización de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados como fuente de carbono y nitrógeno en el crecimiento (Danson & Hough, 1992).

2.2.3 Aislamiento y secuenciación de genes halófilos

El desarrollo de aplicaciones informáticas que posibilitan relacionar regularidades en la estructura proteica con la función y la secuencia, permiten poder atribuir funciones a proteínas de las que únicamente se conoce su secuencia de DNA. La posibilidad de comparar secuencias de una misma proteína de diferentes organismos permite reconstruir la historia evolutiva y las relaciones filogenéticas entre especies. Mediante la secuenciación de genomas completos, se pueden realizar las relaciones filogenéticas con la finalidad de construir modelos que nos permitan conocer más datos acerca de la evolución de los organismos (Petitjean et al., 2015).

El conocimiento de genomas permite realizar diagnósticos precisos detectando las secuencias que codifican para determinados genes diana. Analizando con detalle las secuencias de las proteínas halofílicas, en general, se observa un alto contenido en residuos aminoacídicos de carácter ácido (aspártico y glutámico), apareciendo éstos en la superficie de la proteína (Elcock & McCammon, 1998; Fukuchi et al., 2003) lo cual está sugiriendo la inestabilidad de las proteínas halofílicas a bajas concentraciones de sal. Sin embargo, la malato deshidrogenasa de *Salinibacter ruber* no contiene en su composición aminoacídica una elevada proporción de residuos acídicos lo que explica su total estabilidad en ausencia de sal (Irimia et al., 2004).

2.2.4 La diversidad microbiológica en ambientes hipersalinos

Existe un gran número de estudios tradicionales en la ecología de las salineras, al punto en donde éstas pueden ser interesantes modelos de sistemas para la investigación de la salinidad en la diversidad microbiana y la productividad (Joint et al., 2002) por las variaciones inducidas por un factor ambiental (Pedros-Alio et al., 2000). Algunos estudios han mostrado que ocurren cambios ecológicos importantes en el gradiente de

salinidad, con respecto del decremento de la biodiversidad el incremento de la salinidad y la dominancia de ciertos grupos de organismos (Rodriguez-Valera et al., 1980). Se ha reconocido que la diversidad microbiológica y la distribución de los grupos funcionales tienen un papel preponderante en el análisis ecológico de comunidades microbianas la complejidad funcional que se ha detectado en estos ambientes comprende diatomeas, cianobacterias, bacterias verdes no sulfurosas, bacterias púrpuras sulfurosas, bacterias organotróficas, arqueas metanogénicas, arqueas halófilas extremas, bacterias sulfato reductoras, bacterias del grupo Citofaga /flavobacterium /bacteriodes, entre otros grupos funcionales (Spear et al., 2005). Así también, en estudio de estos ecosistemas microbianos brinda información, geomicrobiológica del presente y de los registros geológicos del pasado. Dado esto, el estudio de la microbiota de los ambientes hipersalinos cercanos a la saturación ha sido estudiada con aproximaciones polifásicas, tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo (Burns et al., 2004).

Actualmente, los múltiples ambientes hipersalinos han sido explorados en cuanto a diversidad microbiana y en particular de arqueas halófilas, los resultados de dichos estudios se enmarcan como sigue:

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos y abundancia de arqueas en cuatro tapetes microbianos hipersalinos.

Tapete microbiano	Salinidad %	Temperatura °C	pH	Abundancia relativa %	OTU's de arqueas	Tecnología de secuenciación	Referencia
Domos del arqueano	53 %	31.45	9.94	4.96 %	230	Whole Genome Shot Gun Illumina MiSeq	Este estudio
Guerrero Negro, México	28 %	30	N/A	30.45 %	209	16 rRNA Tag FLX (926F/1392R) Titanium Roche	García-Maldonado <i>et al.</i> 2018
Shark Bay, Australia	6.8 %	24.8	8.13	< 1 %	13	Whole Genome Shot	Babilonia <i>et al.</i> 2018

						Gun Illumina MiSeq	
Atacama, Chile	10.6-15%	23-27	7.65	50-66 %	121	16 rRNA Tag (515F/806R) Piro- secuenciación 454	Fernández et al. 2016

2.2.5 Microorganismos halófilos como propuesta de vida en exoplanetas

Antiguamente, se asumía que las arqueas dominaban los ambientes extremos, como por ejemplo las salinas, mientras que las bacterias estaban restringidas a ambientes moderados. Más tarde mediante técnicas de biología molecular se encontró la presencia de arqueas en ambiente mesófilos tales como el agua de mar o en sedimentos (Olsen et al., 1994) y de bacterias en ambientes con elevadas temperaturas (Pace, 1997). Recientemente, empleando técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) se ha puesto de manifiesto que las bacterias constituyen una parte significativa de la microbiota del hábitat de las salinas. Por tanto, parece ser que las bacterias, al igual que las arqueas, también se encuentran en ambientes extremos como es el caso de *Salinibacter ruber* (Anton et al., 2000).

Se ha observado la presencia de arqueas halófilas extremas en los sedimentos de la plataforma continental en la costa de la India, mediante la técnica del número más probable (Raghavan & Furtado, 2005). Se ha supuesto que también en Marte (Steven Squyres conferencia de prensa 24 de marzo de 2004. NASA News), podrían haber existido organismos halófilos ya que se ha comprobado que existió agua en Marte a partir de observaciones recientes con el robot “Opportunity”, descubriendo que sobre la superficie de Marte pudo haber existido un mar salado, y que al perder su atmósfera y evaporarse el agua pudo dar lugar a la precipitación de los minerales que estaban disueltos en ella llegando a estar así más concentrados y formando pequeños reservorios de cristales de sal. Con los datos que se conocen de nuestro planeta, sea el caso de Río Tinto (Amaral Zettler et al., 2002) en el que se encuentran organismos extremófilos,

habría sido relativamente fácil para los organismos halófilos evolucionar bajo las condiciones dadas en Marte. Los organismos halófilos terrestres servirían como análogos de posibles vestigios de vida en Marte (Mancinelli et al., 2004).

2.3 Archaea

Está aceptado que las células procariotas del dominio *Archaea* fueron las primeras células vivas, y se conocen fósiles de hace 3.500 millones de años (Jaakkola et al., 2016). Después de su aparición, han sufrido una gran y continua diversificación.

Su metabolismo es lo que más diverge, y causa que algunas procariotas sean muy diferentes a otras en muchos procesos celulares. Algunos científicos, encuentran que los parecidos entre todos los seres vivos son muy grandes, y se creen que todos los organismos que existen actualmente derivan de esta primitiva célula. A lo largo de un lento proceso evolutivo, hace unos 1500 millones de años, las procariotas derivaron en células más complejas, las eucariotas. Existe una teoría que propone que la eucariogénesis, es decir, el proceso evolutivo que ha originado a las células eucariotas, consta de un origen simbiótico entre un miembro de las proteobacterias y un miembro del Dominio Archaea; y es que las arqueas de ramificación profunda comparten más genes con los eucariotes que otras arqueas de filos más recientes (Lopez-Garcia & Moreira, 2019) (Figura 4).

Los análisis comparativos del potencial metabólico del superfilum ASGARD han permitido concluir que los miembros de ASGARD son organismos primordialmente organoheterotróficos que pueden producir y consumir hidrógeno. Dicha información sostiene la idea que los eucariotes evolucionaron de una arquea mayormente relacionada a un miembro del filum Heimdallarchaeota, aparentemente estas ganaron la facultad de usar el oxígeno y nitratos como aceptores finales de electrones mediante transferencia horizontal de genes en una etapa posterior (Lopez-Garcia & Moreira, 2019). El modelo simbiogenético involucra simbiosis metabólicas, o sintroffias, mediadas por hidrogeno o transferencia de electrones entre arqueas y bacterias. Basado en la reconstrucción metabólica arqueana ASGARD y las consideraciones ecológicas, se propone el “modelo

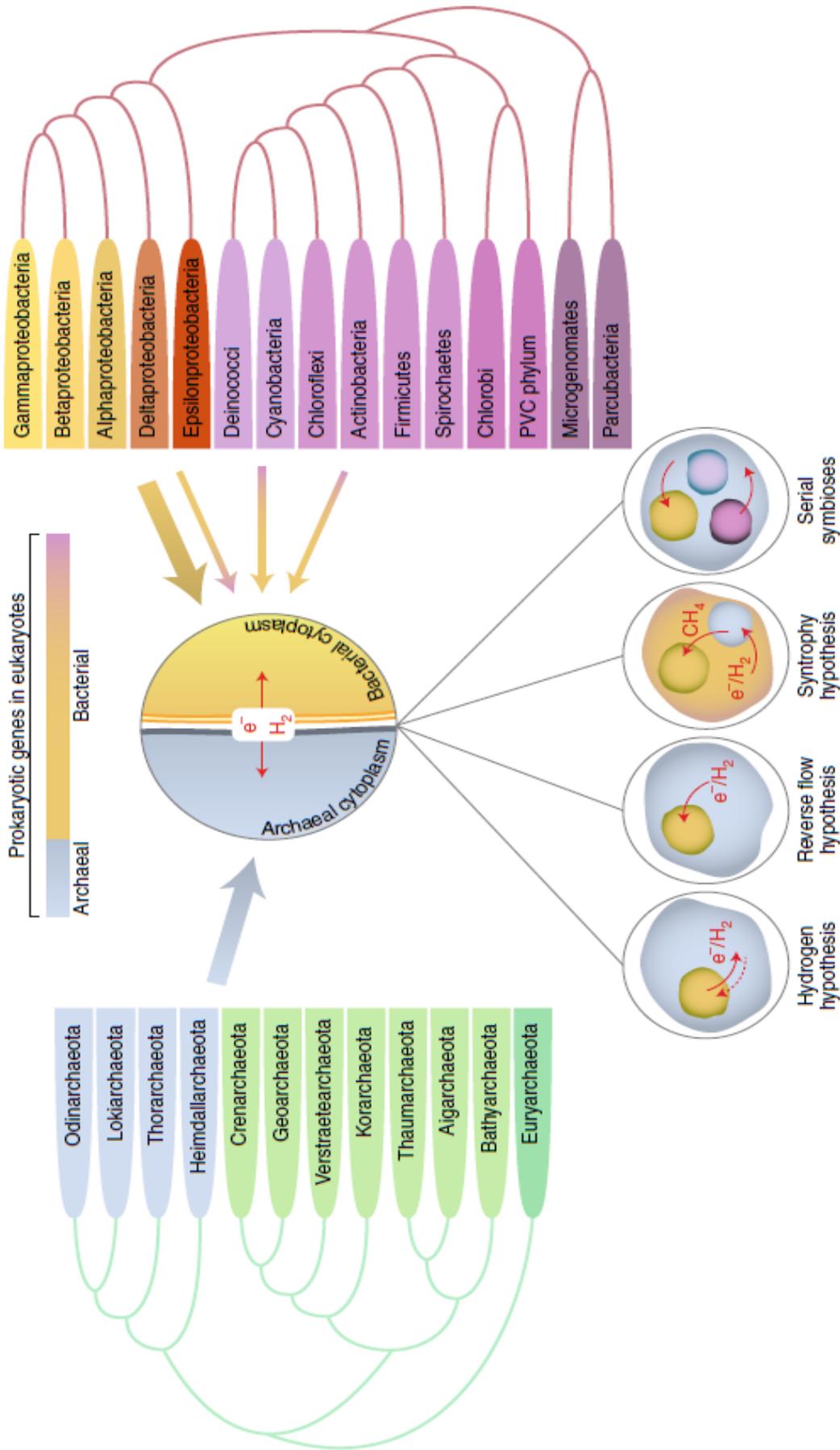


Figura 4. Simbiosis metabólica del origen de los eucariotes (Lopez-Garcia & Moreira, 2019)

de flujo inverso” el cual involucra el flujo de hidrógeno de las arqueas hacia los simbioses bacterianos; aunque el modelo especifica un arqueon y una bacteria, se deja abierta la posibilidad de que las interacciones simbióticas con otros procariotes pudieron haber intervenido, en consonancia con recientes propuestas de simbiosis seriales (Spang et al., 2017).

Los procariotes habitan en un gran número de nichos ecológicos tanto terrestres como marinos, y dentro de estos ecosistemas las procariotas establecen relaciones con los seres vivos, ya sea favorables como en las simbiosis o perjudiciales como en el parasitismo. No obstante, son de suma importancia por su papel en la descomposición de la materia orgánica en inorgánica como así también en los ciclos biogeoquímicos, en especial en el ciclo del carbono y del nitrógeno.

El Dominio Archaea está formado por un grupo heterogéneo de microorganismos capaces de habitar ambientes extremos. Entre sus características destacan las siguientes (Bullock, 2000).

- Poseen membranas lipídicas que contienen cadenas laterales isoprenoide con enlaces éter en contraste con los hidrocarburos con enlaces éster de todos los demás sistemas biológicos (van de Vossenberg et al., 1998).
- Carecen en todos los casos de ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular, a su vez están compuestos por pseudomureína (Visweswaran et al., 2011).
- Presentan una morfología típica que no se ha encontrado en ninguno de los organismos que componen el Dominio *Bacteria*, como por ejemplo las formas poligonales que tienen algunas arqueas halófilas o los cocos extremadamente irregulares que presentan algunos hipertermófilos (Oren, 1999).
- No catabolizan la glucosa mediante glicólisis, sino que emplean una vía metabólica de oxidación simple (Verhees et al., 2003).
- Su maquinaria fundamental de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos pertenecientes al Dominio *Eukarya* (Langer et al., 1995).

- Expresan histonas, con una gran diversidad de ellas involucradas en la regulación transcripcional (Henneman et al., 2018).

Archaea es uno de los dominios de la vida más interesantes debido a sus características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y estructurales. Muchas arqueas pueden sobrevivir bajo fuertes condiciones incluyendo altas y bajas temperaturas, alto y bajo pH, alta salinidad, ambientes anóxicos, y altas presiones (Marx et al., 2007).

De acuerdo a sus hábitats de vida se diferencian las arqueas termófilas, metanógenas y halófilas. Las termófilas requieren de sulfuros y se desarrollan a temperaturas de 80-100° C en medios muy ácidos. Las hay aerobias y anaerobias. Habitan en zonas muy calientes como áreas volcánicas, géiseres, manantiales e incluso en las profundidades de los océanos.

Las arqueas metanógenas utilizan en su metabolismo el hidrógeno y el carbono como fuente de energía. Son microorganismos anaerobios por excelencia. Producen gas metano que al acumularse en el ambiente sirve como fuente natural de gas industrial. Las arqueas halófilas son aerobias y viven en ambientes acuáticos con alto contenido salino, de hasta un 25% de cloruro de sodio (Evans et al., 2019).

La comunidad científica se ha enfocado en evaluar los mecanismos de adaptación a nivel molecular, fisiológica y evolutivamente de las archaeas. El estudio de las archaeas también ayuda al entendimiento de la biología de las células eucariotas (Eme et al., 2017), ya que, si comparamos ambos dominios, las archaeas pueden proveer un sistema adecuado con alta estabilidad y baja complejidad. Por ejemplo, obtener la estructura “cristal” de la RNA polimerasa de las archaeas nos ayuda a entender la estructura y función de la RNA polimerasa II.

2.3.1 Sistemática del dominio Archaea

La secuenciación de genomas y metagenomas, así como la genómica unicelular, han mejorado nuestro entendimiento del mundo biológico, dando pistas acerca de la diversidad evolutiva y funcional que moldea a la biosfera. Sin embargo, los genomas

microbianos que se encuentran disponibles actualmente tienen una amplitud filogenética limitada, debido a la incapacidad de cultivar en laboratorio la mayoría de los microorganismos (Rinke et al., 2013). Actualmente la extensión del dominio Archaea ha sido posible gracias a la filogenia molecular de genes marcadores y la inferencia de genomas completos provenientes de muestreos ambientales en diversos tipos de ecosistemas.

Los primeros árboles filogenéticos del dominio Archaea sólo contenían a los hipertermófilos, halófilos y metanógenos, incluidos en sólo dos fila: Crenarchaeota y Euryarchaeota (Castelle et al., 2015). Recientemente, usando datos genómicos de 1000 organismos incultivables, junto con secuencias publicadas en base de datos, se llevó a cabo la reconstrucción filogenética para inferir una versión expandida del árbol de la vida, incluyendo a los tres dominios. Los resultados revelaron que el dominio Archaea está representado por 26 fila, y muchos de estos se incluyen en un nivel taxonómico superior llamado superfilum, estos son, TACK acrónimo de Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota, incluyendo además Geoarchaeota y Bathyarchaeota (Adam et al., 2017), DPANN acrónimo de Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota y Nanohaloarchaeota, incluyendo Micrarchaeota, Woearchaeota y Pacearchaeota y finalmente, ASGARD el cual contempla a los filums Lokiarchaeota, Heimdallarchaeota, Odinararchaeota y Thorarchaeota (Figura 5) (Hug et al., 2016). Además, este estudio muestra una dominante diversificación bacteriana, remarcando la importancia de organismos que carecen de representantes aislados, con una evolución sustancial concentrando una radiación mayor de tales organismos (Hug et al., 2016).

Además, a partir de datos genómicos obtenidos en varios ambientes anaerobios se identificó un linaje con miembros muy parecidos a las especies metanógenas con un metabolismo similar de reducción compuestos metilados como metilaminas, metanol y metiltioles. Dicho grupo fue propuesto como un nuevo filum llamándolo Verstraetearchaeota (Adam et al., 2017; Vanwonterghem et al., 2016).

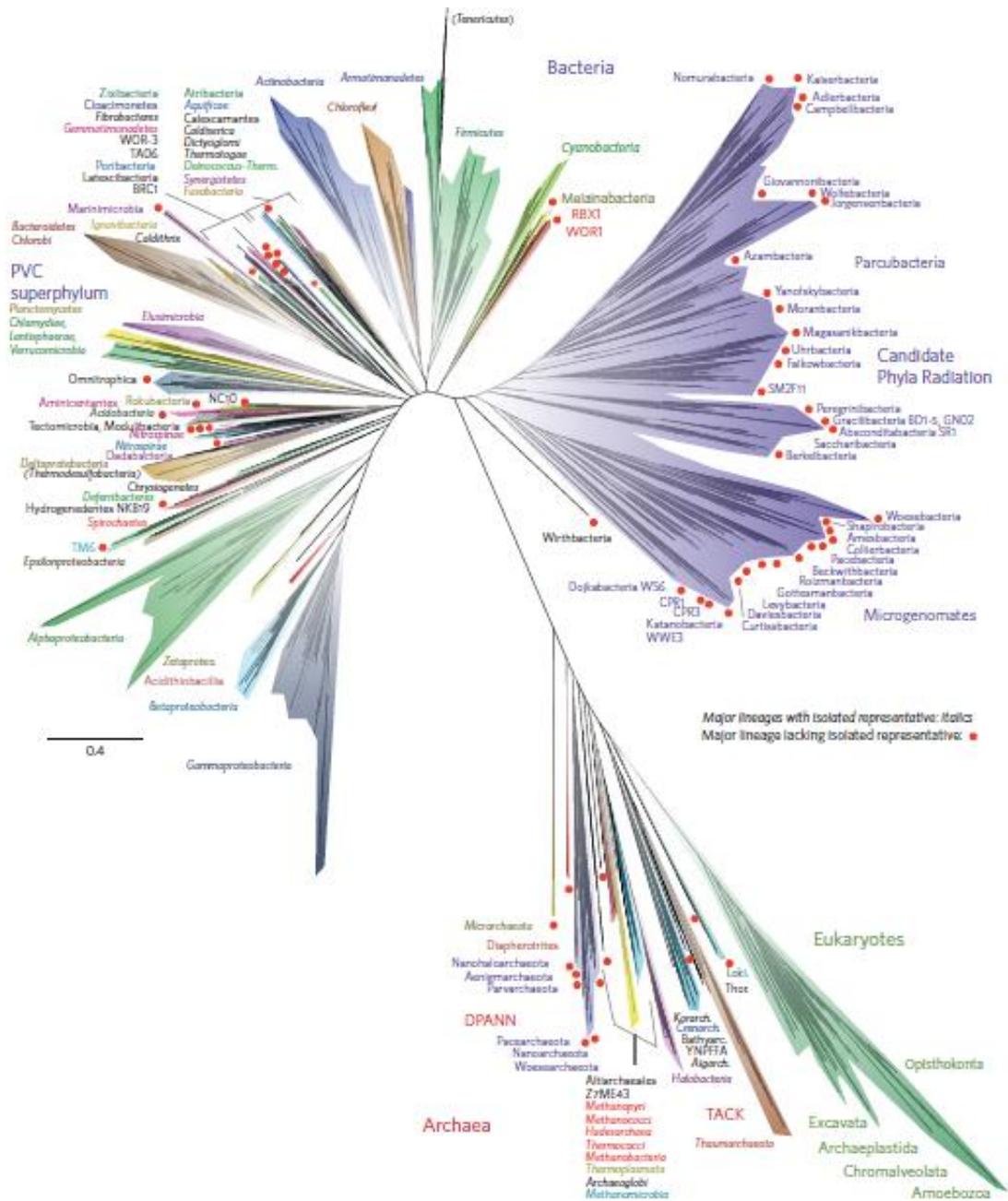


Figura 5. Actual árbol de la vida, incluyendo la diversidad total representada por genomas secuenciados (Hug et al., 2016).

De forma interesante se ha predicho que los filums Verstraetearchaeota y Bathyarchaeota son capaces de obtener energía a través de metabolismos distintos a la metanogénesis, como la fermentación de péptidos (Adam et al., 2017).

Adicionalmente, y gracias a la disposición de datos y secuencias genómicas de linajes sin caracterizar, ha permitido la identificación de muchos clados nuevos, por ejemplo, la nueva súper clase Diaforarchaea se propuso en el 2015 (Petitjean et al., 2015). Todos los miembros de Diaforarchaea que han sido secuenciados comparten dos características en común, la falta de histonas parecidas a los eucariotas y el hecho de que los genes ribosomales 16S y 23S no están agrupados en el genoma (Adam et al., 2017). Las diaforarchaeas incluyen al menos seis linajes bien definidos: los termoplasmatales, el Grupo 2 Euryarchaeota de la ventila hidrotermal de aguas profundas (DHVE-2), el Grupo D Béntico Marino (MGG-D), el Grupo Euryarchaeota terrestre misceláneo (TMEG), el grupo marino II o Thalassoarchaeota (MG-II) y el Grupo Marino III o Pontarchaea (MG-III) (Adam et al., 2017).

2.3.2 Las arqueas en los ecosistemas.

Las nuevas herramientas como el análisis de genes ribosomales en muestras ambientales han permitido la expansión de la distribución ecológica de las arqueas, así como la diversidad metabólica de estas, revelando una inesperada distribución y diversidad (Auguet et al., 2010). La ecología de las arqueas inicialmente derivó de los miembros aislados, previendo durante mucho tiempo un fuerte sesgo acerca de la diversidad y distribución del tercer Dominio de la vida y de la biosfera. Básicamente, las arqueas eran considerados como extremófilos prosperando bajo condiciones severas en gradientes ambientales. Las emergencias de técnicas moleculares independientes de cultivo han revelado la ubiquidad de la distribución arqueana (Auguet et al., 2010).

Curiosamente la salinidad, a diferencia de la temperatura explica de forma significativa los patrones de distribución; de hecho, la salinidad se ha reconocido como un factor ambiental clave de la estructura de comunidades bacterianas (Lozupone & Knight, 2007). Otros factores ambientales, como las condiciones óxicas y anóxicas probablemente también tienen un rol significativo en la estructuración de los patrones observados. La falta de información ambiental asociada a bases de datos de secuencias fue y ha sido una gran limitación para el meta-análisis y quizá haya obstaculizado una mejor explicación de los patrones de arqueas globales (Auguet et al., 2010). Se ha

definido como especialistas aquellos linajes arqueanos que han sido más frecuentemente representados en la mayoría de los sitios dentro de un hábitat específico, una definición muy relacionada al concepto de indicador de especies usado en ecología (Dufrene & Legendre, 1997). Se ha encontrado al menos un indicador de linajes para cada tipo de hábitat, a excepción de los sedimentos de agua dulce (Auguet et al., 2010). Como una adquisición de las funciones esenciales para permanecer adaptado a los hábitats se ha requerido de un periodo extenso de tiempo; la falta de un indicador de especies arqueano en sedimentos de agua dulce pudiera indicar una colonización tardía de arqueas. Al contrario, las fuentes hidrotermales han exhibido por mucho el mayor número de indicadores de linajes, indicando quizá que este hábitat fue de los primeros colonizado por arqueas (Auguet et al., 2010).

Las haloarqueas también constituyen la población mayormente activa para la degradación de materia orgánica en ambientes hipersalinos, mientras que en fuentes hidrotermales los miembros quimilitoautótrofos de Archaeoglobales y Thermoprotei son reconocidos como productores primarios clave bajo condiciones anaerobias por el acoplamiento de la oxidación del hidrógeno con la reducción de sulfatos (Seegerer et al., 1993). Las abundancias relativas de las arqueas varían mucho en diferentes hábitats, siendo particularmente importantes en ecosistemas marinos, donde las arqueas alcanzan una abundancia de 5-30% de la población celular planctónica (Jarrell et al., 2011; Schleper et al., 2005). El gran número de arqueas en todos los ecosistemas indican que actúan extensamente a diferencia de lo que antes se sabía cómo principales actores en varios ciclos biogeoquímicos (Jarrell et al., 2011).

Las Arqueas Oxidantes de Amonio (AOA), miembros el filo Thaumarchaeota son ahora reconocidas por ser un componente ubicuo en el plancton marino (Gribaldo et al., 2011). La presencia de las AOA en ambientes extremos y varios biomas mesofílicos sugieren que las AOA están adaptadas para crecer en condiciones diferentes de aquellas bacterias oxidantes de amonio (BOA), indicando una separación de nichos. Las AOA han sido encontrados como los oxidantes de amonio dominantes en la mayoría de los suelos superficiales, incluso en aquellos suelos con poco nitrógeno y bajas tasas de nitrificación (Schleper, 2010). Las arqueas son conocidas por estar involucradas en otras

partes del ciclo del nitrógeno. El descubrimiento de la fijación de nitrógeno en metanógenos ha extendido la distribución de esta importante actividad hacia el dominio arqueas, y muy recientemente la fijación de nitrógeno mediada por arqueas ha sido documentada en temperaturas hipertermofílicas (Mehta & Baross, 2006).

Otro tipo de arqueas, son las metanógenas, que han jugado un rol esencial en la descomposición de materia orgánica compleja en una variedad de hábitats anaerobios, tales como, turberas, digestores, arrozales, vertederos y rumiantes (Liu & Whitman, 2008). Adicionalmente, las arqueas metanógenas son únicas por su habilidad de convertir un número limitado de compuestos de carbono simples a metano. Se estima que 1 mil millones de toneladas de metano por año se producen por metanógenos, de ahí su gran importancia en el ciclo del carbono (Thauer et al., 2008). Incluso los sedimentos de océanos contienen una vasta cantidad de hidratos de metano sólido. Actualmente se conocen tres clados de arqueas metanógenas (ANME-1, ANME-2, ANME-3); se cree que el grupo ANME-3, está ampliamente distribuido en todos los ambientes que contienen metano.

Por otro lado, mediante fluorescencia *in situ* se ha demostrado que las arqueas han colonizado ambientes como el drenaje ácido de minas, constituyendo más del 50% de las comunidades, compuestas en su mayoría por especies pertenecientes a los Thermoplasmatales (que incluyen los géneros Ferroplasma y Theroplasma), organismos que prefieren bajo pH y que oxidan azufre y hierro tipo II (Jarrell et al., 2011).

La *taxa* o **biósfera rara** se ha descrito como aquellos taxones de microorganismos en dormancia (o banco de semillas) que potencialmente pueden ser “resucitados” bajo diferentes condiciones ambientales (Hugoni et al., 2013). Sin embargo, los descubrimientos de que la biosfera rara tiene una biogeografía, y que una porción significativa de la comunidad rara esta activa, con tasas de crecimiento que decrecientan mientras la abundancia incrementa, sugiere que la biosfera rara no es únicamente un banco de semillas inactivo (Hugoni et al., 2013).

La biósfera rara ha sido descrita con numerosos miembros del Dominio Archaea, y se ha propuesto que este se puede dividir en tres fracciones clasificándose como sigue:

- Banco de semillas local: Representa a las arqueas que fueron raras, pero se convirtieron en abundantes en ciertos momentos. En estudios de estacionales, las observaciones realizadas pueden indicar que los microorganismos raros son capaces de reaccionar a fluctuaciones estacionales de condiciones ambientales. El banco de semillas mantiene una diversidad metabólica para reaccionar a condiciones ambientales fluctuantes.
- Banco de semillas no-local: Este contiene arqueas que no fueron comunes y siempre estuvieron inactivos. Este tipo de individuos puede estar disperso por episodios como inundación de ríos, tormentas fuertes e incluso eventos atmosféricos. Se sugiere que este tipo de biosfera rara arqueana podría estar en proceso de extinción.
- Fracción activa pero siempre rara: En esta fracción las arqueas son representadas por células que siempre fueron raras, pero siempre crecieron de manera activa y normalmente sus afiliaciones filogenéticas y dinámicas estacionales son similares aquellos miembros arqueanos que son abundantes. Las poblaciones de arqueas este tipo se puede mantener en baja abundancia debido a que son menos eficientes que otras al competir por recursos, o pudiera tener estrategias de vida que promuevan la rareza para minimizar la depredación.

La gran distribución del dominio arquea y su diversidad encontrándose en una plétora de ambientes de todo tipo puede corresponder a los diferentes niveles de actividad o tasas de crecimiento de sus miembros, así como sus diferencias metabólicas y estrategias de vida (Hugoni et al., 2013).

2.3.3 Aislamiento de arqueas

Las arqueas han sido tema de gran interés desde su publicación inicial gracias al trabajo de Carl Woese en 1970, quien las reportó como un grupo separado de los dos grandes dominios, Bacteria y Eukarya (Sun et al., 2019). Inicialmente, la investigación de las arqueas se basó en técnicas de cultivo de bajo rendimiento, continuando con el desarrollo de técnicas de secuenciación de genes marcadores (16S), metagenómica y

genómica de células únicas. Gracias a estos enfoques independientes de cultivo, se ha logrado conocer a las arqueas en el ambiente, y se ha facilitado el estudio de su diversidad y relevancia ecológica (Sun et al., 2019). El número de genomas arqueanos ha incrementado exponencialmente, mientras que el número de arqueones aislado permanece sin mucho cambio.

La disponibilidad de genomas de datos resueltos tanto de arqueas cultivables como incultivables han contribuido de forma considerable al conocimiento del potencial metabólico y ecológico de las arqueas en los ciclos biogeoquímicos globales (Sun et al. 2019). Sin embargo, muchas hipótesis importantes continúan sin verificarse debido a la gran dificultad de miembros cultivables; y es que, aunque el Dominio Archaea se encuentra ampliamente distribuido en el planeta, la mayoría permanecen sin cultivarse, aunque existen algunas estrategias de aislamiento (Figura 6). Por ejemplo, los cultivos de células del superfilum ASGARD, en especial aquellas que pertenecen al filum Heimdallarchaeota, son esenciales para el estudio de la evolución de ambos, procariotes y eucariotes, puesto que se ha sugerido que este superfilum puede representar el grupo más cercano a los eucariotes, permitiendo abrir un debate de si el proceso de eucariogénesis evolucionó como un clado hermano de las Arqueas o que incluso pudo haberse originado a partir de estas (Sun et al., 2019).

Recientemente, Imachi et al, llevaron a cabo el aislamiento de “*Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum strain MK-D1*”, un arqueon anaerobio, extremadamente lento para crecer, con morfología de pequeños cocos (~550nm), degradadores de aminoácidos a través de un proceso de sintrofia con un arqueon *Methanogenium*. Cabe resaltar que el proceso de aislamiento duró alrededor de 12 años después de varias transferencias, logrando eliminar la mayor parte de la comunidad microbiana proveniente de la muestra inicial de sedimento profundo tomado del área llamada Kumano en Japón.

Algunos otros miembros de filos arqueanos se han aislado exitosamente gracias al enriquecimiento de cultivos, tales como las Korarchaeota, Micrarchaeota, Parvarchaeota, Euryarchaeota y Crenarchaeota. En cambio, para miembros del superfilum DPANN, la dificultad de su cultivo se plantea podría estar asociado con un repertorio genómico

reducido, y por la ausencia de muchas vías metabólicas. Estas características limitan su habilidad de sostener su crecimiento usando por si mismos compuestos auto-sintéticos, haciendo difícil la definición sus requerimientos en medios artificiales. Algunas de estas limitaciones fueron superadas durante el aislamiento del miembro simbiote Nanoarchaeota junto con su hospedero (Sun et al., 2019).

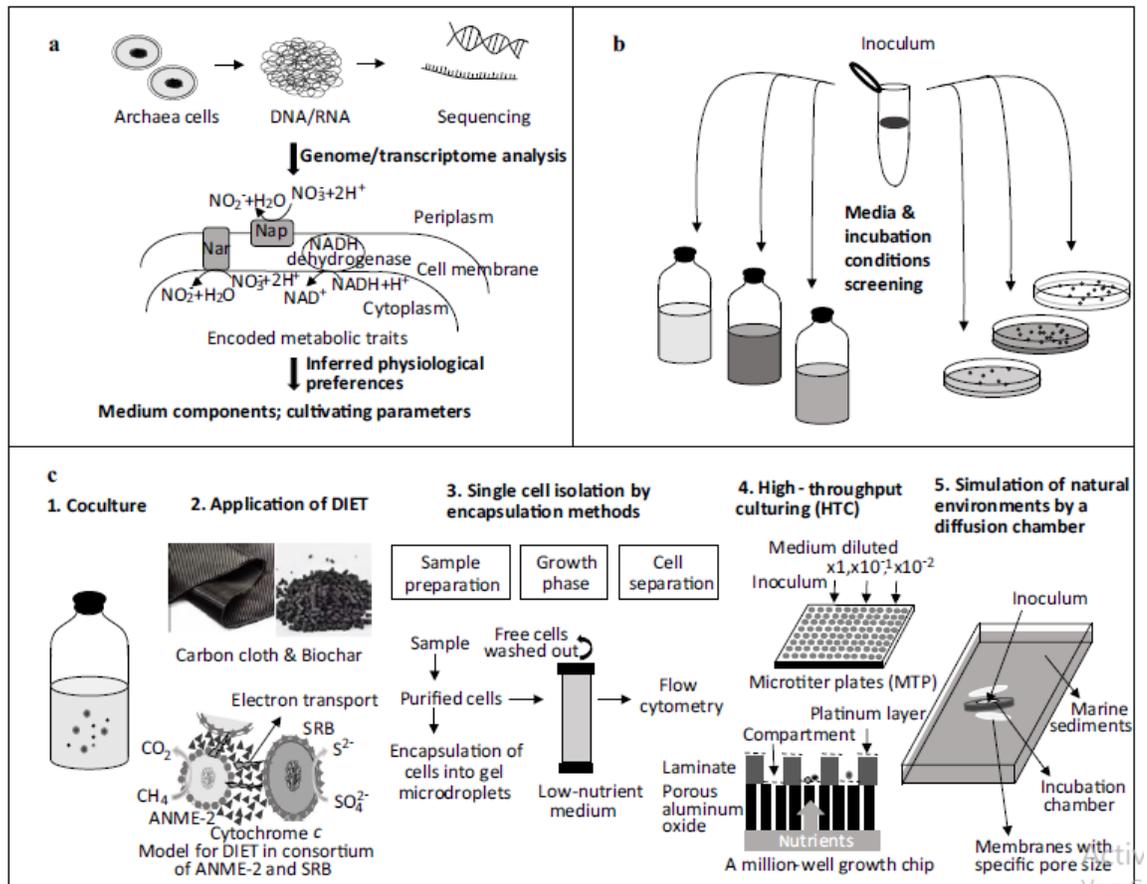


Figura 6. Representación esquemática de tres estrategias propuestas para mejorar el aislamiento de arqueas. a) Refinamiento del cultivo selectivo basado en la información genética y transcripcional b) Búsqueda de condiciones, medio e incubación con variantes en la composición de los medios de cultivo, temperaturas, pH y salinidad c) combinación de técnicas de cultivo (1) co-cultivo, (2) aplicación de DIET (Trasferencia Directa de Electrones entre Especies), (3) aislamiento de células únicas, (4) HTC (Cultivo de alto rendimiento), (5) simulación de ambientes naturales (Sun et al., 2019).

De manera similar al aislamiento bacteriano, el aislamiento de arqueas generalmente incluye tres pasos: la colección de la muestra, el enriquecimiento y el aislamiento. La toma de muestra del ambiente nativo deberá ser preservada y transportada con cuidado para evitar contaminación o alteración de la comunidad microbiana, el enriquecimiento

y aislamiento son llevados a cabo bajo condiciones mimetizando las condiciones ambientales in situ. En dichas condiciones se incluyen los parámetros fisicoquímicos, las fuentes de energía requeridas para su metabolismo, nutrientes, elementos traza. Todo esto seguido de la toma de una sola colonia de forma repetitiva y su inoculación en medio sólido o diluciones seriales (Sun et al., 2019).

La selectividad intrínseca de los medios de cultivo puede resultar en un sesgo en cuanto a tipo, diversidad y cantidad de arqueas recuperadas del ambiente. Solo una pequeña fracción de la comunidad natural de los microorganismos puede ser recuperada por métodos convencionales de cultivo, con un 99.9% de microorganismos en permanecer incultivables (Alain & Querellou, 2009).

2.4 Aplicaciones y usos industriales de los procariotes halófilos

Debido a las características inusuales, los archaea extremófilos son considerados recursos valorados para los procesos industriales y biotecnológicos. Sus enzimas son importantes para aplicaciones industriales. Otros metabolitos de los archaea extremófilas, como los lípidos, son adecuados para la formación de liposomas como sistemas termoestables de entrega de fármacos. Sus chaperonas y chaperoninas pueden ser usados para el doblamiento, estabilización, y solubilización de proteínas recombinantes.

Las arqueas extremófilas, en particular las resistentes a las altas temperaturas o a los extremos de acidez y alcalinidad, son una importante fuente de enzimas que puede funcionar bajo estas duras condiciones (Breithaupt, 2001). Estas enzimas tienen una amplia gama de usos (Han et al., 2019; Kelly et al., 2019; Kirtel et al., 2018; L. Kumar, Awasthi, G. and Singh B., 2011; Schocke et al., 2019) Por ejemplo, los ADN polimerasas termoestables, como el ADN polimerasa Pfu de *Pyrococcus furiosus*, han revolucionado la biología molecular, al permitir el uso de la reacción en cadena de la polimerasa como método simple y rápido para la clonación del ADN (Nishioka et al., 2001).

En contraste con la amplia gama de aplicaciones de las enzimas, la utilización en biotecnología de los organismos en sí mismos es más reducida.

El descubrimiento de nuevas sustancias depende de la recuperación de estos organismos del medio ambiente y de su cultivo (Shand & Leyva, 2008).

Los halófilos son excelentes fuentes de enzimas, que no solo son estables ante concentraciones altas de salinidad, sino que pueden llevar a cabo reacciones eficientes en condiciones extremas. El screening de una nueva fuente de enzimas que son útiles industrialmente es la clave para la búsqueda en la biotecnología de enzimas. Para las aplicaciones en procesos industriales, las enzimas deben ser estables a altas temperaturas, pH, presencia de sales, solventes tóxicos. Y en este contexto, los halófilos han emergido en un vasto depósito de nuevas enzimas en los últimos años. Enzimas derivadas de los halófilos están dotadas con características estructurales únicas y poder catalítico para mantener los procesos fisiológicos y metabólicos bajo condiciones de alta salinidad. Algunas de estas enzimas han sido reportadas como activas y estables bajo más de una condición extrema (Margesin & Schinner, 2001).

Anteriormente se han reportado problemas asociados con la precisión del método convencional para aislar arqueas halófilas. El estudio de la diversidad arqueana en los últimos años ha incluido una combinación de química taxonomía y caracterización genotípica y fenotípica en orden que permita guiar ambas técnicas, la clásica y la molecular, incluyendo microscopía, perfiles pigmentarios, lípidos polares, fingerprinting genético y molecular, FISH, análisis FAME en fragmentos del gen bacteriodopsina como marcador molecular, secuenciación génica del rRNA 16S (Berrada et al., 2012).

Particularmente las haloarqueas han mostrado vías metabólicas adaptadas a condiciones extremas, considerándolas fuentes naturales de compuestos que van desde las enzimas hasta los antibióticos, haciendo uso de ellas en diferentes campos de aplicación, tanto industrial como en la vida diaria. Se ha demostrado que los carotenoides C50 como la bacterioruberina (que es usualmente el principal carotenoide producido por arqueas) y su precursor (2-isopentenyl-3,4-dehidrorrubrina (IDR), bis-anhidrobacterioruberina (BABR) y mono-anhidrobacterioruberina (MABR)) son sintetizados por el grupo de

haloarqueas y que presentan habilidad antioxidante comparado con otros carotenoides comerciales como beta-caroteno. Otros carotenoides tales como B-caroteno, licopeno y fitoeno también son producidos por estas especies. Estudios recientes muestran que un extracto de carotenoide aislado de *Halobacterium halobium* en concentraciones sub-letales, decremantan significativamente la viabilidad celular de la línea celular humana de hepatoma HEPG2, así como la propiedad de reducir tumores sólidos combinados con terapia y radiación (Giani et al., 2019).

Una nueva clase de antibióticos potencialmente útiles se derivan de este grupo de organismos. Ocho de esas sustancias ya han sido caracterizadas, pero podría haber muchas más, especialmente en Halobacteria. Estos compuestos son importantes porque tienen una estructura diferente a la de los antibióticos bacterianos, de manera que pueden tener un modo de acción diferente (Quadri et al., 2016). Las haloarqueas son los primeros miembros del dominio que se ha encontrado producen bacteriocinas proteicas liberadas al ambiente llamadas halocinas, estas actúan contra especies relacionadas. Solo unas cuantas halocinas han sido estudiadas hasta el nivel molecular y su modo de acción, ya sea para matar o inhibir otros haloarqueone. Aún se desconoce si la producción de halocinas es un mecanismo de defensa, ya que la mayoría de estas se ha reportado por generalmente matar al organismo indicador por medio de una hinchazón de la célula seguida por una lisis. Las halocinas conocidas hasta el momento son A4, G1, R1, H1, H2, H3, H4, H5, H6/H7, C8 y Sech7a; estas se producen a la mitad de la fase exponencial.

El mecanismo de acción de las halocinas puede involucrar una modificación en la permeabilidad de la célula o por la inhibición del flujo de protones y el antiportador de Na^+/H^+ . Por ejemplo, la halocina H6, producida por la haloarquea *Haloferax gibbonsi* se ha reportado por inhibir el intercambiador de Na^+/H^+ en células de mamífero (Karthikeyan et al., 2013).

2.5 Cuatro Ciénegas, Coahuila

Cuatro Ciénegas es el Área de Protección de Flora y Fauna reconocida internacionalmente porque forma parte del desierto más grande de América del Norte, el desierto Chihuahuense, albergando un gran número de plantas y animales endémicos y cuenta con una extensa red de pozas naturales, algunas de ellas fundamentales para el estudio de la evolución del planeta. Los cuerpos de agua son alimentados por la Sierra de San Marcos y Pinos, además del acuífero de la porción occidental de Cuatro Ciénegas, que tiene su descarga natural en esta depresión topográfica; el caudal de estas alimentaciones varía estacional y anualmente en respuesta a las variaciones de la lluvia (Diario Oficial de la Federación, 2008). Fisiográficamente, forma parte de la Provincia de la Sierra Madre Oriental y corresponde a la subprovincia denominada Sierras y Llanuras Coahuilenses. En esta subprovincia predomina roca caliza de origen Mesozoico. Estas rocas forman pliegues anticlinales, que son las sierras y los sinclinales que son los valles donde se encuentran las pozas (Diario Oficial de la Federación, 2008).

La Poza Churince se localiza dentro del Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila sus coordenadas Latitud $26^{\circ}50' 29.5''$ N y Longitud $102^{\circ} 08'2.3''$ con una altitud 746 msnm. Pertenece al complejo Churince, compuestos por tres cuerpos de agua: Poza Churince, Poza Los Güeros y la Laguna de Churince. La Poza Churince provee de agua a las otros dos por medio de canales (Fondo Mundial para la Naturaleza, 1999). La Laguna Churince se localiza en la porción sur del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas a 18 km, de la ciudad del mismo nombre. Sus coordenadas son Latitud $26^{\circ} 55' N$ y $102^{\circ} 50' W$ Longitud. En el 2007 la Dirección del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas la reportaba como una de las lagunas más grandes en superficie de todo el Valle de Cuatro Ciénegas; abarcaba aproximadamente 50 ha, pero también era una de las menos profundas (60 cm en promedio). Se trata de una laguna que presenta variaciones en su espejo de agua durante el año y entre años. De acuerdo con los registros del monitoreo que la Dirección de la Reserva realiza mensualmente desde el 2004, se ha observado que Laguna Churince comienza a contraer su espejo de agua a principios de mayo, cuando las altas temperaturas son mayores a $42^{\circ} C$, por lo que ocasionan altas tasas de evaporación; en los meses de junio, julio y agosto,

en donde la 3 laguna pierde entre el 70 y 80% de su espejo, mismo que comienza a recuperar de manera paulatina a partir de los meses de diciembre y enero.

Como resultado de su aislamiento geográfico, tiene el más alto nivel de biodiversidad endémica en América del Norte. Una particularidad de Cuatro Ciénegas es el gran número de manantiales y pozas, estas últimas con concentraciones de fósforo muy limitadas, que ejercen una presión selectiva sobre la estructura y función de las comunidades microbianas que habitan en ellas.

2.5.1 Condiciones Ambientales

Climas muy secos semi-cálido con lluvias escasas todo el año, seco muy cálido, seco templado y semi seco templado, con lluvias en verano y algunas en invierno. Temperatura media anual 16-22°C. Precipitación total anual hasta 400 mm. Elevación 740–3 000 m.

2.5.2 Organismos endémicos de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Existe una gran diversidad de organismos endémicos en esta zona, por ejemplo, tipos de vegetación: vegetación halófila, acuática y semi acuática, pastizal, matorral subinermé, matorral submontano, chaparral, bosques de pino y roble.

La gran diversidad del hábitat, la estabilidad ambiental y el aislamiento geográfico han provocado que la fauna acuática haya desarrollado una radiación adaptativa explosiva y una especiación, resultando en un elevado endemismo. La asociación de *Gypsophilla* spp con especies halófilas han dado lugar a una comunidad vegetal única.

Vegetación acuática: nenúfares *Nymphaea ampla*; tulares o juncales *Juncus torreyi*, *Phragmites australis*, *Scirpus americanus*, *Schoenoplectus maritimus paludosus*, *Typha domingensis*; pastos acuáticos *Ruppia maritima*, *Spartina spartinae*; romerito *Distichlis spicata*.

Más de 30 especies endémicas de plantas, todas amenazadas: *Abutilon pinkavae*, *Agave scabra maderensis*, *Ancistrocactus brevihamatus*, *Coryphanta* sp., *C. achinus*, *Dyssodia gypsophila*, *Erigeron cuatrocienegeis*, *Euphorbia pinkavana*, *Haploesthes robusta*, *Justicia coahuilana*, *Machaeranthera gypsophila*, *M. restiformis*, *Mimosa unipinnata*, *Penstemon henricksonii*, *Phacelia marshal-johnstonii*, *Poliomintha maderensis*, *Sabatia tuberculata*, *Satureja maderensis*, *Sedum nanifolium diminutum* y *Selinocarpus undulatus*.

Fauna característica:

De moluscos con 5 géneros y 9 especies endémicas, como *Assimineasp.*, *Coahuilix hubbsi*, *C. landyei*, *Cochliopina milleri*, *Drepanotrema* sp., *Durangonella coahuila*, *Ferrisia* sp., *Lymnaeasp.*, *Mexipyrgus churinceanus*, *Mexistiobia manantiali*, *Mexithauma quadripaludium*, *Nymphophilus minckleyi*, *N. acarinatus*, *Orygoceras* sp., *Paludiscala caramba*;

De crustáceos, *Palaemonetes paludosus* y *Procambarus (Pennides) suttkusi*; de anostracos *Artemia* sp. y *Streptocephalus* sp., del copépodo *Cletocamptus albuquerqueensis*, del ostrácodo *Chlamydotheca* sp., de isópodos *Mexistenasellus coahuila*, *Speocirolana thermydronys*, *Sphaerolana affinis*, *S. interstitialis*, de anfípodos *Hyaella* sp., *Mexiweckelia colei* y *Paramexiweckelia particeps*.

De peces, la mayoría endémicas y todas amenazadas, como *Astyanax mexicanus*, *Cichlasoma cyanoguttatum*, *C. minckleyi*, *Cyprinodon atrorus*, *C. bifasciatus*, *Dionda episcopa*, *Etheostoma lugoi*, *Gambusia marshi*, *G. longispinis*, *Ictalurus lupus*, *Lepomis megalotis*, *Lucania interioris*, *Notropis xanthicara*, *Poecilia mexicana*, *Pylodictis olivaris*, *Xiphophorus gordonii*.

De reptiles y anfibios como las culebras de agua *Nerodia erythrogaster* y *N. rhombifer*, la rana *Rana pipiens*, las tortugas *Apalone spinifera*, *Pseudemys scripta*, *Terrapene coahuila*, la lagartija *Scincella lateralis*, la culebra *Thamnophis hammondi*, *Cnemidophorus scalaris pallidus*, *Gerrhonotus lugoi*, *Hylactophyne augusti fuscofemora*.

De aves como el pato cucharón *Anas clypeata*, el pato de charreteras *A. platyrhynchos*, la alondra acuática *Anthus spinoletta pacificus*, la garza morena *Ardea herodias*, *Callipepla squamata*, los pescadores *Chloroceryle americana* y *Megaceryle alcyon*, *Gallinago gallinago*, la gallareta *Fulica americana*, los zorzales *Melospiza* spp, el zambullidor pico pinto *Podilymbus podiceps*, los chimbitos *Spizella* spp, y *Zenaida macroura*.

De mamíferos como el coyote *Canis latrans*, el tlacuache común *Didelphis marsupialis*, *Lepus californicus*, el coatí *Nasua narica nelsoni*, el venado cola blanca *Odocoileus virginianus*, el mapache *Procyon lotor*, el puma *Puma concolor*, *Sciurus* sp., los conejos *Sylvilagus audubonii* y *S. floridanus* y el oso *Ursus americanus*.

2.5.3 Diversidad procariota en Cuatro Ciénegas, Coahuila

Por otra parte, el estudio de los tapetes microbianos, aquellas estructuras órgano-sedimentarias compuestas por microorganismos “fósiles-vivientes” pueden darnos una idea de cómo se vería la en sus primeras etapas. Recientemente el Valle de Cuatro Ciénegas se ha descrito como un modelo evolutivo llamándolo “mundo perdido”, donde los linajes ancestrales quedaron atrapados en esta área gracias al aislamiento geográfico ocurrido hace 35 millones de años (V. Souza et al., 2006; V. Souza et al., 2018), dando abrigo a estas comunidades relictas, permitiendo eventos de especiación y divergencia (V. Souza et al., 2018). Adicionalmente, los suelos, sedimentos y agua del Valle de Cuatro Ciénegas poseen una enorme diversidad de microorganismos pertenecientes a los Dominios Bacteria y Archaea, específicamente se han encontrado 5,167 OTU's (97% de identidad), a partir de secuenciación del 16S (V. Souza et al., 2018). La identificación de estos microorganismos sugiere que el Valle de Cuatro Ciénegas tiene un origen marino, ya que comparte patrones con ciertos filo tales como Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria (V. Souza et al., 2018).

Las condiciones fisicoquímicas y ambientales extremas de Cuatro Ciénegas, junto con las comunidades microbianas ancestrales encontradas en este sitio, hacen de él un modelo para los primeros ecosistemas del planeta Tierra, y un perfecto análogo del

Cráter Gale en Marte gracias a sus suelos ricos en yeso, demostrando que la vida no sólo prospera, sino además transforma estos ambientes extremos.

El estudio del Valle de Cuatro Ciénegas puede darnos información acerca del antiguo mar en Marte que quedó impreso en sus sedimentos, y así permitirles a los científicos del Laboratorio de Ciencia en Marte explorar las firmas biológicas que quedaron gracias a los cambios en la estequiometría a través de las eras en Marte. Si la vida existe ha existido en el Cráter Gale en Marte, es muy posible que haya dejado su huella impresa en los cristales de yeso (Edwards et al., 2006). En este caso, un firme entendimiento de un análogo de esta región tal como lo es el Valle de Cuatro Ciénegas, sería invaluable para la búsqueda de vida en dicho exoplaneta (Lopez-Lozano et al., 2012; Newsom et al., 2001; Szykiewicz et al., 2010).

Es importante notar que los estudios de diversidad de arqueas entre los estromatolitos encontrados en varias regiones de México, incluyendo el Valle de Cuatro Ciénegas han mostrado una baja abundancia (hasta 1.76% del total de la comunidad) en arqueas (Centeno et al., 2012). Resultados similares se obtuvieron del análisis de dos tapetes microbianos mediante metagenómica en el 2012, donde la abundancia de las arqueas alcanzó únicamente un 2% de la comunidad en un tapete (Peimbert et al., 2012).

Recientemente se ha descrito la conducta de la comunidad arqueana a través de redes de la comunidad en un tapete microbiano no hipersalino dentro de la desaparecida Poza Churince en Cuatro Ciénegas, en el cual se demuestra que los taxones halotolerantes incrementan su abundancia durante las temporadas secas (De Anda et al., 2018).

2.5.4 Organismos procariotes cultivables de Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila.

En el 2005 Souza y colaboradores, en un estudio de biodiversidad, muestran datos moleculares a partir de ensayos de metagenómica los cuales apuntan a la presencia de microbiota perteneciente a dominios como Bacteria y Archaea. En esa ocasión se logró crear una librería genómica con un total de 98 secuencias de la subunidad 16S del

rRNA. Estas secuencias representaban a 38 filotipos únicos de los mayores linajes de los dominios antes mencionados. Los resultados de este trabajo fueron inesperados, puesto que las aguas oligotróficas de Cuatro Ciénegas representan ambientes acuáticos extremos con altas concentraciones de magnesio, calcio, carbonatos y sulfatos. En dichos estudios se menciona que las predominancias de la taxa en las muestras tenían una gran afinidad a microbiota marina, esto sugiere que una porción de la biota y el agua de Cuatro Ciénegas puede ser derivada de microbios y agua contenida en estratos mesozoicos que subyacen en esta región.

Otro claro ejemplo que sustenta la huella marina de este sitio ha sido un estudio realizado mediante filogenómica, reconstruyendo a través de un alineamiento de 20 genes distribuidos y que están considerados como “no susceptibles” a transferencia horizontal de genes y que están presentes en 14 genomas de *Bacillus spp.* (Alcaraz et al., 2008).

Este análisis reveló que *Bacillus coahuilensis* es un microorganismo basal comparado con los otros 14 genomas de *Bacillus spp.*, y más relacionado a la cepa marina NRRLB-14911.

Sin embargo, a nivel genoma no se encontró ninguna señal que sugiriera la presencia de bacterias relacionadas a *B. coahuilensis* de la Base de Datos Global de muestras de océanos (Alcaraz et al., 2008). Además, el genoma de *B. coahuilensis* está asociado a una baja tasa de sustitución comparado con otros genomas a pesar de su pequeño tamaño. Aunado a estos resultados, un extenso análisis de secuencias del 16S demostró que *B. coahuilensis* claramente forma un grupo único.

Las especies endémicas del Valle de Cuatro Ciénegas han evolucionado de sus ancestros que llegaron a esa área en dos oleadas. Previos experimentos han demostrado que las diferentes especies de bacterias presentes en la laguna Churince evolucionaron hasta formar comunidades muy unidas y que además compiten con los microorganismos de fuera del Valle (V. Souza et al., 2018).

Algunas especies de *Bacillus* aislados del Valle de Cuatro Ciénegas son capaces de sintetizar sulfolípidos de membrana, que pareciera ser una adaptación ancestral a la limitación de la disponibilidad de fósforo, y que fuera adquirida hace tiempo mediante transferencia horizontal de genes de las cianobacterias (Alcaraz et al., 2008). Igualmente, utilizando estimaciones de tiempo conservadoras basadas en eventos geológicos, los estudios de reloj molecular han sugerido que algunas especies de cianobacterias cultivadas (Dominguez-Escobar et al., 2011), así como de *Bacillus* aislados del Valle de Cuatro Ciénegas divergieron de taxones más cercanos en el Precámbrico tardío (Moreno-Letelier et al., 2012).

Con todos los estudios y ensayos realizados durante más de 20 años, el Valle de Cuatro Ciénegas se ha propuesto su estudio como un nuevo modelo evolutivo llamándolo “Mundo Perdido”; siendo su firma la presencia de ramas filogenéticas profundas, dado que el tiempo de aislamiento se esperaba ser muy largo con pocas extinciones. Otra de las características de este modelo sería la extrema conservación del nicho, en este caso el fuerte filtro ambiental dado por la estequiometría de nutrientes extremadamente desequilibrada. Para comprobar la diversificación derivada del “mundo perdido”, se llevaron a cabo análisis enfocándose en la diversidad de una colección de 2,500 *Bacillus spp.* cultivados. Se obtuvieron las secuencias 16S de estos y se compararon contra las bases de datos. Los resultados mostraron 256 secuencias únicas (97% identidad). Mientras tanto, en la filogenia de esta colección, más 1019 especies de *Bacillus* aislados de todo el mundo, se observó una distribución y distancia genética entre las secuencias pertenecientes a los *Bacillus* de Cuatro Ciénegas en relación a los otros linajes agregados. Las cepas del Valle de Cuatro Ciénegas formaron linajes endémicos, muchos de ellos con ramas profundas.

Las cepas de *Bacillus*, no han sido las únicas especies estudiadas de este peculiar sitio, recientemente, y de manera independiente se llevó a cabo un extenso aislamiento y caracterización de miembros del filum Actinobacteria, en el cual mediante análisis polifásicos se logró cultivar una colección de alrededor 350 miembros este filum (Arocha-Garza et al., 2017). Durante la identificación, se encontró que el taxón más abundante fue el género *Streptomyces*, con más del 50% de los aislados. De toda la

colección, 105 cepas fueron sub cultivadas y procesadas para la extracción de DNA e identificadas mediante secuenciación Sanger del 16S. Así mismo en este trabajo se comprueba mediante filogenia que 31 aislados forman seis clados monofiléticos de manera independiente de otras Actinobacterias aisladas o reportadas de otros sitios y siete clusters de un solo miembro, representando un alto grado de diversidad y endemismo a pesar de su bien conocida oligotrofia en Cuatro Ciénegas (Arocha-Garza et al., 2017).

2.6 Condiciones de Cultivo para arqueas halófilos

2.6.1 Sales

La concentración óptima de sales varía para el crecimiento de diferentes haloarqueas (en un rango de 15% a 25%) pero la mayoría crece a un 23% (w/v, sal total) (Litchfield, 2002). Por ejemplo, *Hfx volcanii* crece mejor a una concentración de sal del 15% aunque su concentración óptima es al 18%, mientras que *Har. Hispánica* necesita al menos 23% para un buen crecimiento (Hartman et al., 2010).

2.6.2 Temperatura.

Un estudio reciente examinó la temperatura óptima de 14 tipos de especies de haloarqueas (Robinson et al., 2005). Dado que muchas haloarqueas han sido aisladas de lagos salados naturales donde están expuestos a temperaturas muy altas, por lo tanto, no es una sorpresa que las tasas de máximo crecimiento para la mayoría de las especies ocurren entre 49°-58°C. Incluso un aislado de la Antártica, *Halorobrum lacusprofundi*, crece de manera óptima a 30°C (Franzmann et al., 1988). Interesantemente la temperatura máxima de supervivencia para *Hfx. Volcanii* es alrededor de los 60°C (Mullakhanbhai & Larsen, 1975).

2.6.3 pH

El agua de mar se encuentra alrededor de pH 8, por lo tanto, los pH que van de neutros a alcalinos parecen ser los mejores para el crecimiento de haloarqueas (se recomienda usar pH de 7.2-7.5)(Hartman et al., 2010). Los buffers usualmente problema para el medio de enriquecimiento (donde la peptona tiene una capacidad tamponadora buena), pero resultan problemáticos para los medios definidos, ya que algunas fuentes de carbono pueden generar la producción de ácido.

2.6.4 Estabilidad genética

Cepas de *Halobacterium salinarum* tienen la peculiaridad de ser altamente inestables genéticamente. Se ha descrito que estos microorganismos tienen un gran número de secuencias de inserción activas y transposones que frecuentemente están moviéndose alrededor del genoma (Pfeifer & Blaseio, 1989). Esto es fácil de reconocer por la tasa en la cual el color de las mutantes cambia entre las colonias en una placa. Este problema, aunado con las bajas velocidades de crecimiento y una gran sensibilidad a la lisis durante la transformación mediada con PEG, hacen a estos organismos difíciles de trabajar.

2.6.5 Fuente de Carbono

Muchos miembros del género *Halobacterium* requieren medios de crecimiento complejos o medios definidos con muchos aminoácidos. Otros géneros son mucho mejores para estudios genéticos o fisiológicos porque los microorganismos pueden crecer en medios definidos con una sola fuente de carbono (Falb et al., 2008). *Haloarcula* y *Haloferax spp.* Pueden crecer en medios salados simples con lactato, piruvato, glucosa o glicerol como única fuente de carbono. Todas las haloarqueas y halobacterias crecen muy lentamente comparadas con *E. coli*. (Robinson et al., 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Las condiciones extremas que enmarcan el mundo perdido de Cuatro Ciénegas, Coahuila, forman nichos únicos que son modelos ideales para la investigación del Dominio Archaea, particularmente su diversidad y ecología. Algunos estudios sobre el papel que desempeñan las comunidades de arqueas en los ambientes halófilos extremos sugieren un desempeño crucial en la formación y producción de cristales de cloruro de sodio, así como de la movilización de otros elementos no requeridos en la producción de NaCl. Estos representan procesos de importancia económica y ecológica para justificar su estudio. Por ello, es necesaria la continua investigación sobre biodiversidad. Igualmente, dada su condición extremófila, se convierten en una fuente potencial de nuevas moléculas de interés biotecnológico, procesos biológicos no descritos y productos de interés público. Por todo lo anterior en este estudio se busca contribuir al conocimiento de la diversidad de arqueas cultivables de este sitio por medio de una aproximación de estudio polifásico, que abarca tanto la apreciación de poblaciones de arqueas halófilas cultivables como no cultivables, así como el análisis de dichas poblaciones mediante técnicas moleculares como la secuenciación y filogenia.

4. HIPÓTESIS

“En los Domos del Arqueano en Cuatro Ciénegas, Coahuila, habitan diversos microorganismos halófilos pertenecientes al Dominio Archaea que pueden aislarse, cultivarse en el laboratorio, y representarse por metagenómica en la comunidad de tapetes microbiano”.

5. OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Aislar y caracterizar arqueas halófilas de los Domos del Arqueano en Cuatro Ciénegas, Coahuila.
2. Analizar la diversidad del Dominio Archaea de los Domos del Arqueano en Cuatro Ciénegas, Coahuila por metagenómica.

Objetivos específicos

1. Aislar y cultivar varias generaciones de arqueas halófilas de sitios extremos de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
2. Analizar diversidad fenotípica y diversidad genética de las archaeas halófilas cultivables de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
3. Analizar la filogenia de las archaeas halófilas cultivadas de Cuatro Ciénegas, Coahuila.
4. Analizar la composición, abundancia y diversidad del Dominio Archaea en tres metagenomas de diferentes tiempos de muestreo por métodos bioinformáticos.
5. Calcular los índices de diversidad α y β en tres metagenomas de diferentes tiempos de muestreo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

Las muestras ambientales de agua y sedimento se colectaron en el punto de muestreo llamado “Domos del Arqueano”, dentro del Rancho Pozas Azules en Cuatro Ciéneas, Coahuila. La geolocalización del sitio es 26° 49′ 41.7″ N, 102° 01′ 28.7″ O (Figura X).

6.2 Muestreo

Se colectó agua, sedimento y costra de sal (tapete microbiano) con una profundidad de ~ 10 cm en tubos Falcon estériles de 50 ml en tres tiempos diferentes: Abril 2016, Octubre 2016 y Febrero 2017. Las muestras colectadas fueron transportadas a la brevedad a temperatura ambiente, al laboratorio de biología molecular del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 22 en Cuatro Ciénea, Coahuila (CBTa No. 22) para ser tratadas e inoculadas en las cajas Petri con su respectivo medio.

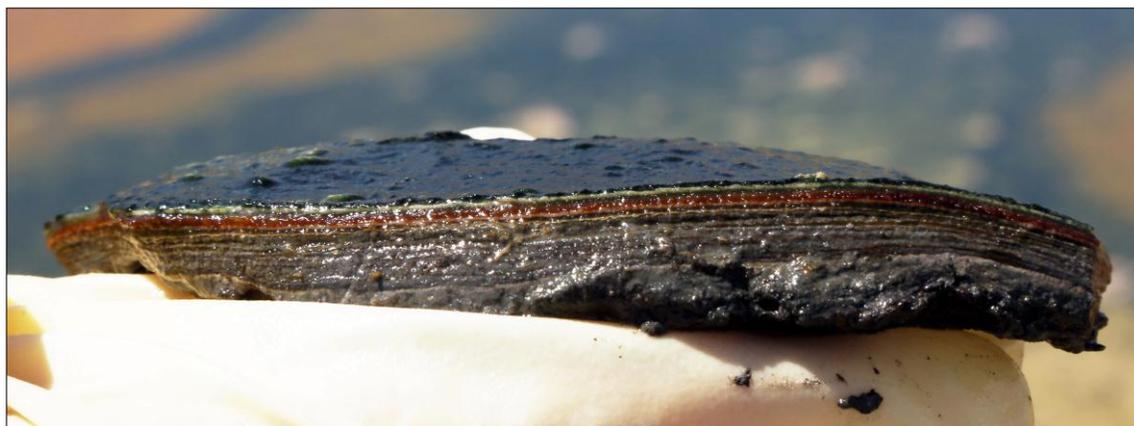


Figura 7. Tapete microbiano.

Permiso de muestreo SEMARNAT SGPA/DGVS/0321/15 y Reglamento contractual de investigación Rancho Pozas Azules PRONATURA NORESTE AC, firmado en cada ocasión en que se colectaron las muestras.

6.3 Medición de parámetros fisicoquímicos ambientales

Las condiciones ambientales fueron medidas usando el aparato Hydrolab MS5 Water multiparameter sonde (OTT Hydromet GmbH, Germany) en octubre 2016, las otras fechas de muestreo no se midieron debido a la falta de agua en el sitio.

I. Enfoque dependiente de cultivo

6.4 Aislamiento primario de procariotes halófilos

Para la primera etapa de aislamiento realizado en el periodo 2015-2017, se diseñaron 3 medios de cultivo **AM1** ([Por litro]): 21.2 g de agar bacteriológico, 2.4 g dextrosa anhidra, 5 g peptona (marca Oxoid), 5 g extracto de levadura, 3g citrato de sodio, 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KCl, 125.5 g NaCl. **AM2** ([Por litro]): 21.2 g de agar bacteriológico, 2.4 g dextrosa anhidra, 5 g peptona (marca Oxoid), 5 g extracto de levadura, 3g citrato de sodio, 0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KCl, 250 g NaCl. **AM3/213** ([Por litro]): 25 g de agar bacteriológico, 3.1 g triptona, 12.5 g extracto de levadura, 0.4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.2 g KCl, 250 g NaCl; para este último medio, la preparación se lleva a cabo en dos frascos, las sales y agar bacteriológico se colocaron en frasco 1 mientras que la triptona y el extracto de levadura se colocaron en el frasco 2. Después de esterilizar se vertió el contenido de frasco 2 al frasco 1 para el posterior vaciado a las placas.

Los medios AM1 y AM2 se ajustaron a un pH de 7.4, el medio AM3/213 únicamente se ajustó el pH a 7.4 al frasco 2. Los tres medios se esterilizaron en autoclave y se vertieron ~ 20 ml en placas Petri de plástico estériles. Los medios fueron inoculados con 200 μl de muestra previamente homogenizada y esparcida sobre la superficie de los medios de cultivo utilizando perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron a 27°, 37° y 50° hasta notar crecimiento.

6.5 Aislamiento secundario de procariotes halófilos

Para el aislamiento secundario, se seleccionaron cada una de las colonias tomando en consideración forma, tamaño, color, superficie y tiempo de crecimiento para reseñar cada una de ellas en su respectivo medio sólido y líquido en condiciones aerobias.

6.6 Identificación de las cepas aisladas

6.6.1 Identificación macroscópica

Se llevaron a cabo preparaciones en fresco y tinciones Gram a los aislamientos secundarios.

6.6.2 Pruebas bioquímicas

Los test bioquímicos usados para halófilos en este trabajo fueron oxidasa y catalasa por protocolos estandarizados (Smibert & Krieg, 1994) en caldo y agar.

6.6.3 Ensayos enzimáticos preliminares

Actividad amilasa: Se determinó en un medio sólido que contenía (g/l): almidón soluble, 2; peptona, 5; extracto de levadura, 1; agar, 20; suplementado con 20% de sales totales.

La hidrólisis del almidón se detectó mediante la inundación de la placa con solución de yoduro de potasio (solución Lugol: 1.0 g yoduro, 5.0 g potasio-yodo, and 330 ml H₂O), hasta que una zona clara circulara la colonia, indicando la hidrólisis del almidón (Menasria et al., 2018).

Actividad celulasa: Basada en un medio compuesto por carboximetilcelulosa (CMC), el cual incluyó (g/L): carboximetilcelulosa (CMC), 5; NaNO₃, 1; K₂HPO₄, 2; extracto de levadura, 0.5; glucosa, 1; agar, 20 suplementado con 20% of sales totales. Después de incubarse por 2 semanas, las placas fueron inundadas con 0.1% de solución rojo Congo

o solución Yodo-Lugo. Los halos producidos alrededor de las colonias indicaron la actividad celulítica (Menasria et al., 2018).

Actividad lipolítica: Se detectó de acuerdo al método de difusión en agar en un medio con Tween, el cual contenía: (g/L):0.1% de Tween (40 ó 80), extracto de levadura (Difco), 1; agar, 20 suplementado con 20% de sales totales. De igual forma, un halo visible o turbido alrededor de las colonias indicó lipólisis (Menasria et al., 2018).

Actividad proteolítica (proteasas): Se detectó en medio sólido que contenía (g/l): leche desnatada 10; extracto de levadura, 1; agar, 20; suplementado con 20% sales totales. La región traslúcida alrededor de las colonias después de 2 semanas se consideró indicador de actividad proteolítica (Menasria et al., 2018).

Actividad xilanasa: Se detectó inoculando 10 µl del cultivo a analizar en un medio salino sólido al 2% suplementado con 1% de xilano. El medio salino estuvo compuesto por (g/L): extracto de levadura, 10; peptona, 2; suplementado con 20% sales totales. Después de incubarse a 35°C durante 2 semanas, las placas fueron inundadas con 0.1% de solución rojo Congo. La actividad xilanasa se reveló mediante los halos alrededor de las colonias (Menasria et al., 2018).

6.6.4 Extracción de DNA genómico de colonia

Para confirmar la identidad de los aislados a nivel taxonómico de especie, se realizó la extracción de ADN genómico, tomando biomasa de cultivos en sólido, utilizando el método de fenol-cloroformo (Chen & Kuo, 1993) con las siguientes modificaciones:

Se rasparon las placas con crecimiento microbiano para obtener una pastilla celular, posteriormente se resuspendió en el buffer de lisis QTP que contiene [Por litro] (40 ml Triton X-100, 100 ml SDS al 20%, 20 ml NaCl 5M, 10 ml Tris 2M ph=8,7 ml EDTA pH=8, aforado a 10 ml con agua miliQ), en un disruptor rotacional de células y material biológico en microtubos de 2ml con 0.2 µl de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro.

La pureza y concentración del ADN obtenido se midió en un espectrofotómetro (nanodrop Thermo Scientific 2000) a una absorbancia de 260 nm.

6.6.5 Reacción en Cadena de la polimerasa o PCR

Una vez confirmada la integridad del ADN genómico, se procedió a la realización de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para realizar la amplificación del 16S de Archaea 21F (5'- TCCGGTTGATCCYGCCGG-3'donde Y = C o T) y 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Se utilizó el termociclador TECHNE TC-500 FTC5/H02 thermocycler (California, USA) utilizando un programa con desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 50°C y 1.5 min a 72°C, continuando con una extensión final a 72°C por 15 min. El ADN de la cepa de ATCC 19700-*Halobacterium salinarum* fungió como control positivo. Para la detección de Bacterias se utilizaron los oligonucleótidos universales 27F (5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Farris & Olson 2007) utilizando un programa de termociclador donde la desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C, seguido por una extensión final 72°C por 5 min. Se utilizó ADN de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo de este ensayo

6.6.6 Electroforesis

Con el propósito de confirmar la integridad del ADN y los amplicones por PCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con una solución de TBE a concentración 1X (10X litro: 108 g tris-base 1M, 55g ácido bórico, 7.5g EDTA); los geles se cargaron con un volumen de 3 µl de ADN por muestra, siendo teñidos con Gel Red 1: 10,000. Como estándar de referencia se utilizaron 2 µl de marcador de peso molecular 1Kb (Bioline), los cuales fueron corridos en una cámara de electroforesis durante 30 min a 120V. La observación del gel se llevó a cabo en un transiluminador de luz ultravioleta (Fisher Scientific UVP MultiDoc-It™ Imaging System modelo 97019201).

6.6.7 Clonación y transformación

Para la identificación de los aislados, los productos de amplificación del 16S rRNA, fueron clonados usando el kit comercial TOPO TA (Invitrogen, San Diego, CA, USA) en *Escherichia coli* línea celular DH10B en medio LB + Carbenicilina por su resistencia a este antibiótico, siguiendo el protocolo del kit. Un total de 4 colonias fueron tomadas de forma aleatoria para cada librería.

6.6.8 Extracción de plásmido

Una vez seleccionadas las colonias, se crecieron de forma independiente en tubos falcon de 15 ml con 4ml de caldo LB + 40 µl de Carbenicilina, posteriormente se dejaron incubar toda la noche a 37°C a 200 rpm toda la noche.

Al día siguiente después de observar la turbidez del medio debido al crecimiento microbiano se centrifugaron los tubos falcon para precipitar la biomasa durante 15 minutos, el sobrenadante se retiró por decantación y seguido de esto se agregó a la biomasa precipitada 200 µl del buffer 1- GTE (50mM Glucosa, 25mM de Tris-Cl pH=8, 10mM de EDTA) y se incubó en hielo (4°C) por un par de minutos mientras se agregaron 200 µl del buffer 2-NaOH/SDS (0.2 N NaOH, 1% SDS) llevando a cabo de movimientos de inversión cuidadosamente, adicionalmente se agregaron 200 µl del buffer 3-Acetato de potasio 5 M, la reacción final de ~700 µl se pasó a un microtubo de 2.0 ml y se incubó en hielo 4°C hasta observar la formación de un moco blanco después de agitar levemente. Posteriormente la reacción se centrifugó durante 15 min, 12,000 rpm, a 4°C, el sobrenadante se pasó a otro microtubo de 2.0 ml, a este se le agregó ~700 µl de Fenol-Cloroformo 1:1 y se centrifugó por segunda ocasión bajo las mismas condiciones, el nuevo sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo al que se le agregó Etanol al 100% grado biología molecular hasta el tope y se dejó incubando toda la noche a -20°C para una mejor precipitación del ADN plasmídico.

Al día siguiente, la reacción se centrifugó durante 20 min 12,000 rpm a 4°C, el etanol al 100% se decantó y la pastilla resultante se lavó dos veces con etanol al 70%, asimismo

se volvió a centrifugar y se decantó para dejar secar la pastilla por ~15 minutos. Finalmente se adicionó 35 µl de agua miliQ + RNAsa para la dilución de la pastilla.

6.6.9 Restricción enzimática con EcoR1

Una vez obtenido el ADN plasmídico, para confirmar que este contenía el inserto con el tamaño molecular correcto (~1500 pb) se llevó a cabo la restricción enzimática con *EcoR1*. Agregando a la reacción, 1-2 µl de ADN plasmídico, 0.5 µl de *EcoR1*, 1 µl de Buffer H 10x [1x], 1 µl de RNAsa y 5.5 µl de agua miliQ. Posteriormente se incubó la reacción a 37°, durante 30 min y se prosiguió a la confirmación mediante gel de agarosa al 1%.

6.6.10 Secuenciación de amplicones del 16S rRNA

La secuenciación de los amplicones de 16s rRNA se llevó a cabo en el Departamento de síntesis IBT-UNAM por el método Sanger.

6.6.11 Procesamiento de secuencias de 16S

Las lecturas crudas se limpiaron y ensamblaron usando el software CodonCode Aligner 5.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA); el contig ensamblado del 16S rARN se comparó con la base de datos del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), usando la herramienta Basic Local Alignment Tool (BLAST) para determinar el género o especie.

6.6.12 Secuenciación de genomas de aislados

Los genomas de los aislados se secuenciaron en CINVESTAV-LANGEBIO Irapuato mediante la tecnología Illumina MiSeq 2x300 con una cobertura de 150X.

6.6.13 Ensamble y Anotación de genomas

Las lecturas previamente procesadas de cada muestra fueron mapeadas por separado contra el genoma de *Halorubrum sp.* BOL3-1 con BMap (Bushnell) y las lecturas resultantes fueron ensambladas de novo con SPAdes3.13 (Bankevich et al., 2012).

Los ensambles se anotaron con prokka 1.13.3 (Seeman 2014) utilizando una base de datos construida con todos los genomas de arqueas anotados disponibles en NCBI a la fecha del análisis, los cuales suman un total de 4, 346,928 de proteínas de referencia. El mismo procedimiento se aplicó a las 71 referencias seleccionadas para la filogenia, las cuales constan de los 65 de genomas del género *Halorubrum* disponibles en NCBI y los genomas de *Haloquadratum walsbyi* DSM 16790, *Haloarcula marismortui* ATCC 43049, *Halobacterium salinarum* NRC-1 y *Methanoculleus marisnigri* JR1 como grupos externos.

6.6.14 Inferencia del core genómico del género *Halorubrum*

Se obtuvieron los genes core de los ensambles junto con las referencias mediante el algoritmo Bi-Directional Best Hit (BDBH) empleando sus parámetros por default (e-value: 1e-5, cobertura: 75%) con el software GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). Los 23 genes resultantes fueron alineados con ClustalW (Thompson et al., 1994) y posteriormente concatenados, dando como resultado una secuencia final de 15,648 pb.

6.6.15 Reconstrucción filogenética de las cepas 133 y 140

Se calculó el mejor modelo evolutivo de la secuencia de genes core concatenados probando 88 modelos candidatos y 11 esquemas de sustitución diferentes con jModelTest2.1.10 (Darriba et al. 2012), resultando el modelo de transversión con proporción de sitios invariables y variación en la tasa de sustitución entre sitios (TVM+I+G) el más adecuado para este set de datos según el criterio de información bayesiano (BIC). La filogenia de máxima verosimilitud fue realizada con PhyML

v2013102 (Guindon y Gascuel, 2003) y se llevaron a cabo 100 bootstraps para proporcionar el soporte estadístico del árbol final.

6.6.16 Criopreservación de cepas y consorcios microbianos

Después de la extracción de ADN genómico de colonia, se tomó la biomasa restante de las cajas con un asa y se colocó en criotubos que contenían glicerol al 50%, para su posterior resguardo a -80°C.

II. Enfoque independiente de cultivo: Metagenómica

6.7 Extracción de DNA genómico de sedimento

La extracción de ADN total de sedimento de los DA se llevó a cabo en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM, usando el protocolo de (Purdy et al., 1996).

6.8 PCR con oligonucleótidos específicos de Phyla.

De manera inicial para conocer si existía la presencia de miembros del dominio Archaea pertenecientes a distintos phyla, se utilizaron oligonucleótidos específicos de estos, las secuencias y condiciones se enmarcan como sigue en la tabla.

Tabla 3. Datos utilizados para la identificación de los phyla de archaeas.

Primer	Muestra	Tm °C	Secuencia 5'-3'	Gen	Amplicon pb	Programa PCR	Referencias
AmoF AmoR	Archaea; Thaumarchaeota	62.8 °C 67.1°C	STAATGGTCTGGCCTTGAACG GCGGCCATCTGTATGTCCA	16S rARN	606 pb	95°C-5 min 30 ciclos: 94 °C-45s 53°C - 60s 72°c - 60s 72 °C - 15	Francias <i>et al.</i> , 2005
Kor236F Ko1236R	Archaea; Korarchaeota	81.8°C 83.6°C	GCTGAGGCCCCAGGRTGGGAC CG CATCCCCTGTCCCGCCCATTTG C	16S rARN	1,000 pb	94°C-2 min 35 ciclos: 94 °C-45s 62°C - 2min 72°c - 2min 72 °C - 2min	Auchtung <i>et al.</i> , 2011
D30 D56	Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria	52.2°C 61.1°C	ATTCCGGTTGATCCTGTC GYTACCTTGTACGACTT	16S rARN	1,400 pb	97°C 5min 30 ciclos: 97°C 45s 55°C 60s 72°C 2min 72°C 2min	Arahal <i>et al.</i> , 1996
Cren7F Cren518R	Archaea; Crenarchaeota	78.9°C 79.3°C	TTCCGGTTGATCCYGCCGGACC GCTGGTWTACCGCGGGGCT GA	16S rARN	1,269 pb	95°C-3 min 32 ciclos: 94°C-7 s 72°C-1 min, 72°C-1 min 72°C -10 min	Perevalova <i>et al.</i> , 2008

6.9 Análisis bioinformático de metagenomas

Las secuencias crudas de DA1, DA2 y DA3 fueron analizadas para comprobar la calidad de la secuenciación usando FASTQC. Los adaptadores indexados y los códigos de barra se removieron, así como aquellas secuencias de baja calidad utilizando el software Trimmomatic v0.36 con un parámetro de “ventana corrediza” de 4pb y un promedio de calidad por base de 25. Se continuó por la unión de las secuencias en ambas direcciones usando el software PEAR. Una vez unidas las secuencias, se prosiguió al ensamblaje de estas, utilizando aquellas secuencias huérfanas para cubrir una mayor precisión al obtener las abundancias relativas de los tres dominios presentes con ayuda del perfilador taxonómico MetaPhlan2.

6.10 Curva de acumulación de especies

Usando las abundancias relativas normalizadas de los taxones arqueanos dentro de cada metagenoma, se obtuvieron las diversidades alpha y beta por medio de los softwares EstimateS 91.0 y Past, respectivamente (Colwell & Elsensohn, 2014) (Hammer et al., 2001).

6.11 Filogenia de especies obtenidas a través de perfil taxonómico de metagenomas

Las secuencias del 16S fueron tomadas del NCBI-Gen Bank y la base de datos RNA Central, de acuerdo con los identificadores obtenidos por Metaphlan2 en el perfil taxonómico. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW (Higgins, 1994) y se limpiaron usando el software Molecular Evolutionary Genetic Analysis MEGA V 7.0 (S. Kumar et al., 2016). La filogenia se construyó con el algoritmo Maximum Likelihood (ML), usando MEGA y el modelo evolutivo Kimura 2 parametros + distribución gamma (K-2 + G) con 10,000 repeticiones. Adicionalmente se agregaron cepas de referencia para una interpretación robusta.

6.12 Números de acceso de metagenomas

El número de identificación de los datos de metagenómica usado en este estudio se encuentran disponible en el servidor en línea MG-RAST con el siguiente identificador: AD 1: mgm4856917.3, mgm4856915.3; AD 2: mgm4856913.3, mgm4856914.3; AD 3: mgm4856916.3, mgm4856918.3.

<https://www.mg-rast.org/linkin.cgi?project=mgp90438>.

6.13 Nombres y números de acceso de los genes del core arqueano

Cell division protein FtsZ (OE_RS00810), tryptophan synthase subunit alpha (OE_RS01205), tryptophan synthase subunit beta (OE_RS01200), phosphate signaling complex protein PhoU (OE_RS01745), 30S ribosomal protein S27e (OE_RS02140), 30S ribosomal protein S28e (OE_RS04515), 30S ribosomal protein S10 (OE_RS10360), metal-dependent hydrolase (OE_RS01145), DNA-directed RNA polymerase subunit D (OE_RS04420), 50S ribosomal protein L18e (OE_RS04430), 50S ribosomal protein L13 (OE_RS04435), 50S ribosomal protein L7ae (OE_RS04510), 50S ribosomal protein L31e (OE_RS09615), RNA polymerase Rpb4 family protein (OE_RS04555), cyclic pyranopterin monophosphate synthase MoaC (OE_RS04980), bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase (OE_RS05525), M42 family metalloproteinase (OE_RS05830), AAA family ATPase (OE_RS00900), phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS (OE_RS07535), hypothetical protein (OE_RS08385), hypothetical protein (OE_RS08395), TATA-box-binding protein (OE_RS11165), ORC1-type DNA replication protein (OE_RS08840).

6.14 Números de acceso de los genomas de referencia

Halorubrum sp. BOL3-1 (NZ_CP034692.1), *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 (NC_012029.1), *Halorubrum* sp. T3 (NZ_JH815329.1), *Halorubrum californiensis* DSM 19288 (NZ_AOJK01000001.1), *Halorubrum aidingense* JCM 13560

(NZ_AOJI01000001.1), *Halorubrum arcis* JCM 13916 (NZ_AOJJ01000001.1), *Halorubrum coriense* DSM 10284 (NZ_AOJL01000001.1), *Halorubrum distributum* JCM 9100 (NZ_AOJM01000001.1), *Halorubrum hochstenium* ATCC 700873 (NZ_AOJO01000001.1), *Halorubrum distributum* JCM 10118 (NZ_AOJN01000001.1), *Halorubrum kocurii* JCM 14978 (NZ_AOJH01000001.1), *Halorubrum lipolyticum* DSM 21995 (NZ_AOJG01000001.1), *Halorubrum litoreum* JCM 13561 (NZ_AOJF01000001.1), *Halorubrum tebenquichense* DSM 14210 (NZ_AOJD01000001.1), *Halorubrum terrestre* JCM 10247 (NZ_AOIW01000001.1), *Halorubrum ezzemoulense* DSM 17463 (NZ_ATXS01000001.1), *Halorubrum* sp. AJ67 (NZ_CBVY010000001.1), *Halorubrum halophilum* strain B8 (NZ_BBJP01000103.19), *Halorubrum* sp. BV1 (NZ_JQKV01000001.1), *Halorubrum* sp. SD626R (NZ_CVRT01000001.1), *Halorubrum tropicale* strain 5 (NZ_LIST01000008.1), *Halorubrum aethiopicum* strain SAH-A6 (NZ_LOAJ01000001.1), *Halorubrum* sp. SD612 (NZ_NEWI01000100.1), *Halorubrum* sp. SD683 (NZ_NEWJ01000100.1), *Halorubrum lacusprofundi* strain HLS1 (NZ_MJCD01000017.1), *Halorubrum lacusprofundi* strain DL18 (NZ_MKFG01000001.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain LD3 (NZ_NHOW01000223.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain LG1 (NZ_NHOV01000626.1), *Halorubrum* sp. Ib24 (NZ_NHOX01000040.1), *Halorubrum* sp. Hd13 (NZ_NHOY01000005.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain Ga36 (NZ_NHOZ01000093.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain Ga2p (NZ_NHPA01000048.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain G37 (NZ_NHPB01000049.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain Fb21 (NZ_NHPC01000027.1), *Halorubrum ezzemoulense* strain Ec15 (NZ_NHPD01000012.1), *Halorubrum* sp. Eb13 (NZ_NHPE01000080.1), *Halorubrum* sp. Ea8 (NZ_NHPF01000041.1), *Halorubrum* sp. Ea1 (NZ_NHPG01000047.1), *Halorubrum halodurans* strain Cb34 (NZ_NHPJ01000026.1v), *Halorubrum* sp. WN019 (NZ_NSKC01000001.1), *Halorubrum trapanicum* (NZ_AP017569.1), *Halorubrum chaoviator* strain DSM 19316 (NZ_NDWV01000100.1), *Halorubrum* sp. C191 (NZ_NHNZ01000064.1), *Halorubrum persicum* strain C49 (NZ_NHOA01000084.1), *Halorubrum* sp. 48-1-W (NZ_QMIM01000016.1), *Halorubrum* sp. Atlit-28R (NZ_QPLS01000001.1), *Halorubrum* sp. Atlit-9R (NZ_QPLU01000001.1),

Halorubrum sp. Atlit-26R (NZ_QPLT01000001.1), *Halorubrum* sp. Atlit-8R (NZ_QPLV01000001.1), *Halorubrum* sp. CBA1229 (NZ_RIZC01000001.1), *Halorubrum* sp. CSM-61 (NZ_RJJW01000022.1), *Halorubrum* sp. PV6 (NZ_CP030064.1), *Halorubrum* sp. ZC67 (NZ_SDJP01000001.1), *Halorubrum* sp. SP9 (NZ_SGXU01000099.1), *Halorubrum* sp. CGM4_25_10-8A (NZ_SGTX01000010.1), *Halorubrum* sp. SD690R (NZ_SGTV01000100.1), *Halorubrum* sp. SS7 (NZ_SGXV01000099.1), *Halorubrum* sp. CGM5_25_10-8B (NZ_SGTY01000010.1), *Halorubrum* sp. ARQ200 (NZ_SGTZ01000010.1), *Halorubrum* sp. ASP1 (NZ_SGUA01000090.1), *Halorubrum* sp. GN11_10-6_MGM (NZ_SGUC01000099.1), *Halorubrum* sp. GN11GM_10-3_MGM (NZ_SGUD01000100.1), *Halorubrum* sp. SP3 (NZ_SGTU01000099.1), *Halorubrum* sp. ASP121 (NZ_SGXX01000099.1), *Halorubrum* sp. GN12_10-3_MGM (NZ_SGUB01000010.1), *Halorubrum sodomense* strain RD 26 (NZ_FOYN01000009.1), *Halorubrum vacuolatum* strain DSM 8800 (NZ_FZNQ01000070.1), *Haloquadratum walsbyi* DSM 16790 (NC_008212.1), *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 (CP039138.1), *Halobacterium salinarum* NRC-1 (BK010829.1), *Methanoculleus marisnigri* JR1 (CP000562.1).

7. RESULTADOS

En este trabajo se tomaron dos enfoques diferentes donde se integran un estudio polifásico de aislamiento de arqueas y la comparación de la diversidad del Dominio Archaea en tres metagenomas tomados del mismo punto geográfico en tres tiempos de muestreo diferentes. Los siguientes resultados deberán tomarse como descriptivos y exploratorios en este nicho específico. Los Domos del Arqueano (DA) es un sitio recientemente descubierto y por lo tanto inexplorado, que se encuentra en el Rancho Pozas Azules, en Cuatro Ciénegas, Coahuila (Figura 8). Los DA se encuentra aproximadamente a 200 m de la poza azul mejor descrita en Cuatro Ciénegas, una de las pocas pozas con estromatolitos vivos.

Las condiciones fisicoquímicas de los DA son consideradas extremas, en la siguiente tabla podemos observar las mediciones de algunos parámetros.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos medidos en los Domos del Arqueano en Abril 2016. IBV (volts); Temp: temperatura °C; SPC: conductancia específica (μS/cm); Salinidad (psu); TDS: sólidos disueltos totales (g/L); pH (0-14); LDO: oxígeno disuelto (mg/L); CH₄ (μg/L)

Características fisicoquímicas de los DA	IBV	Temp °C	SPC	Salinidad	TDS	pH	LDO	CH₄	CO₂
Muestra de agua	7.7	31.45	77.21	53.36	49.62	9.94	78.4	12.4	No detectado
Muestra de tapete	8.0	34.35	77.31	52.55	48.76	9.75	1: 165.3 2: 7.3	N/A	No detectado

7.1 Identificación y caracterización de los aislados

El aislamiento primario tomó alrededor de 4-16 semanas hasta observar las primeras colonias, el crecimiento de cada cultivo dependió del medio en el que fueron cultivados, es decir, las colonias en medio AM1, crecieron más rápido (2-3 semanas) que aquellas colonias que crecieron en medios AM2 y AM3 (4-16 semanas). La mayoría de las cepas cultivadas fueron similares entre ellas en cuanto a la morfología colonial, con una pigmentación diversa, entre ellas color crema intenso, amarillo, rosas, y rojas. Adicionalmente se observó que la mayoría de los cultivos mostraron una tinción gram negativa, con morfologías bacilares (Figura 9).

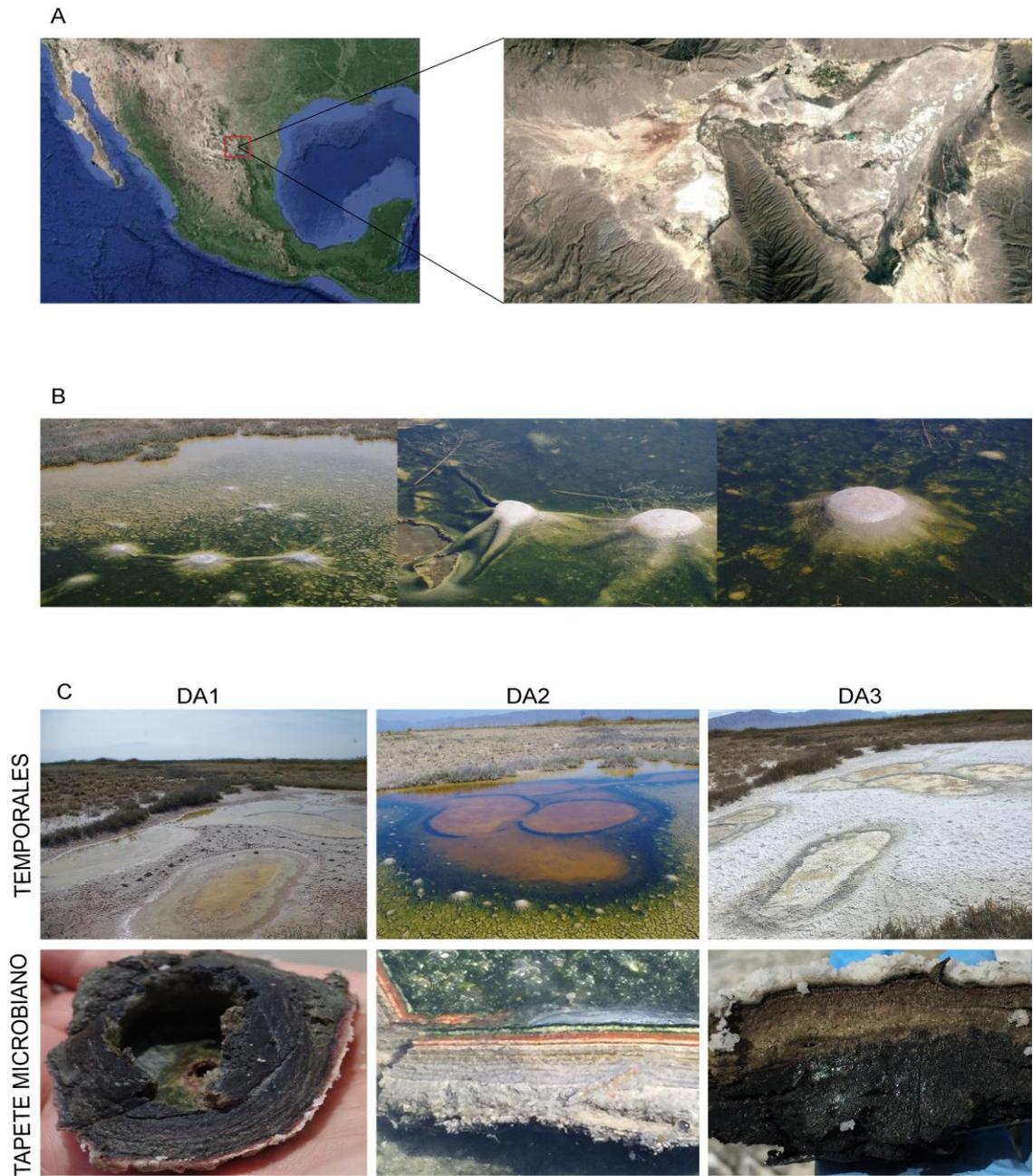


Figura 8. A) Localización de Cuatro Ciénegas, Coahuila en México; B) Tapetes microbianos de los Domos del Arqueano con una capa superficial muy flexible, conteniendo una burbuja encontrada dentro del Rancho Pozas Azules en la región del Desierto Chihuahuense. C) Muestreo de tres temporadas continuas en los Domos del Arqueano: DA1 (abril 2016), DA2 (septiembre 2016), DA3 (febrero 2017), de los tapetes microbianos y su estructura de la comunidad microbiana en su respectiva temporada.

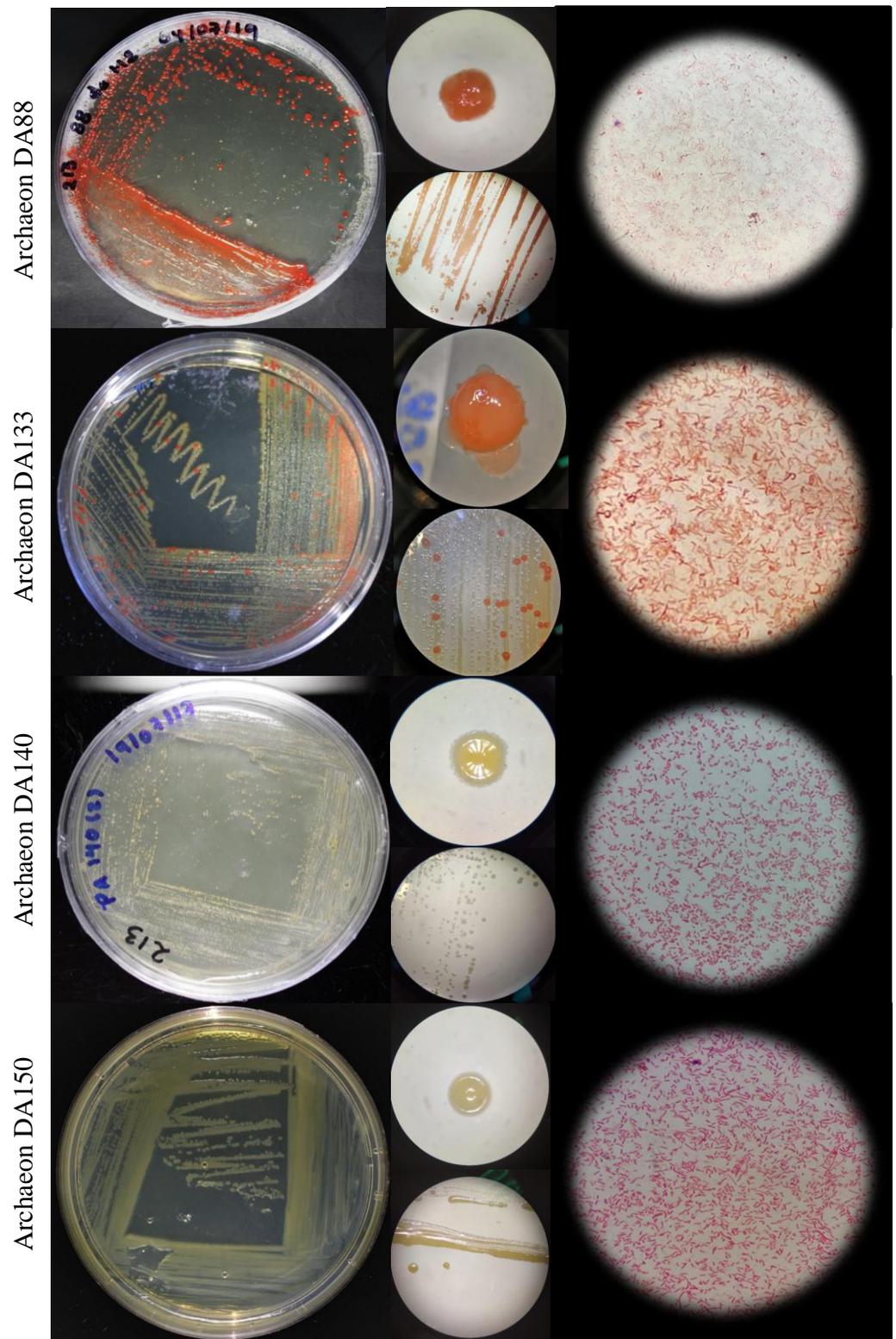


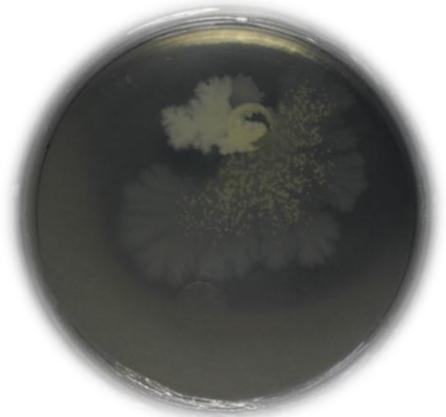
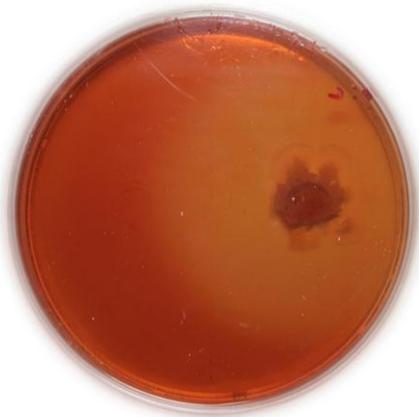
Figura 9. Fotografías de cultivos aislados de Domos del Arqueano, con sus morfologías macro y microscópicas y sus respectivas tinciones gram.

7.2 Ensayos enzimáticos

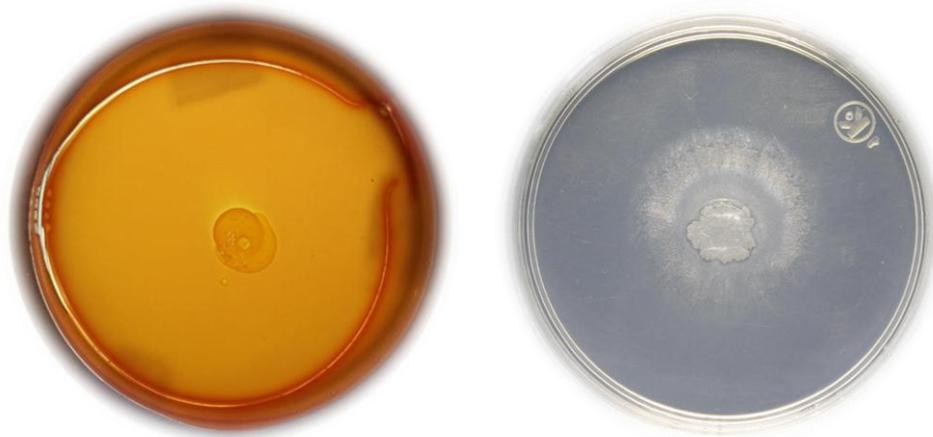
DA140	Xilanasas +	Actividad lipolítica -
-------	-------------	------------------------



DA88	Celulasas +	Proteasa +
------	-------------	------------



DA150	Xilanasa +	Actividad lipolítica +
-------	------------	------------------------



DA133	Celulasa +	Proteasa +
-------	------------	------------

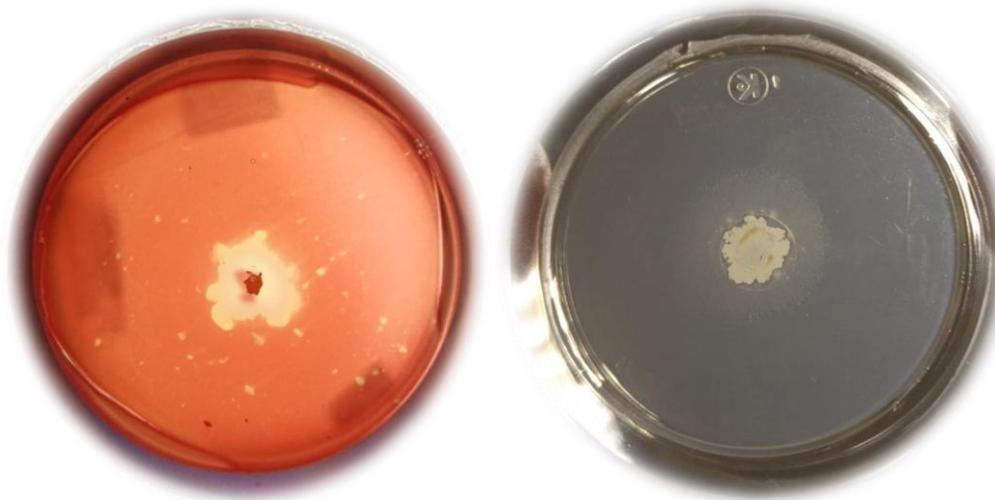


Figura 10. Ensayos enzimáticos preliminares de los arqueanos aislados.

7.3 Ensamblajes de genomas de arqueas cultivadas

Al llevar a cabo el ensamblaje de los genomas de los cultivos 88, 133, 140 y 150 se observó que las longitudes de los genomas eran bastante grandes comparadas con el promedio descrito en base de datos. Así mismo, la anotación arrojó un par de marcadores 16S diferentes y genes de diferentes tamaños, lo que permitió inferir la presencia de otros procariotes en la muestra. El cultivo 133 se identificó como una arquea del género *Halorubrum*, la muestra 140 resultó en un cocultivo de arquea *Halorubrum* con una bacteria, *Marinococcus halotolerans* (Figura 11). La muestra 88 mostró la presencia de 4 o 5 arqueas en cocultivo sin lograr identificarlas, tomándose como un metagenoma de baja diversidad que junto con el cultivo 150 identificado como una arquea del género *Halobacterium* no se pudieron resolver mediante análisis bioinformáticos, por lo que suponen repetir la secuenciación y su respectivo análisis.

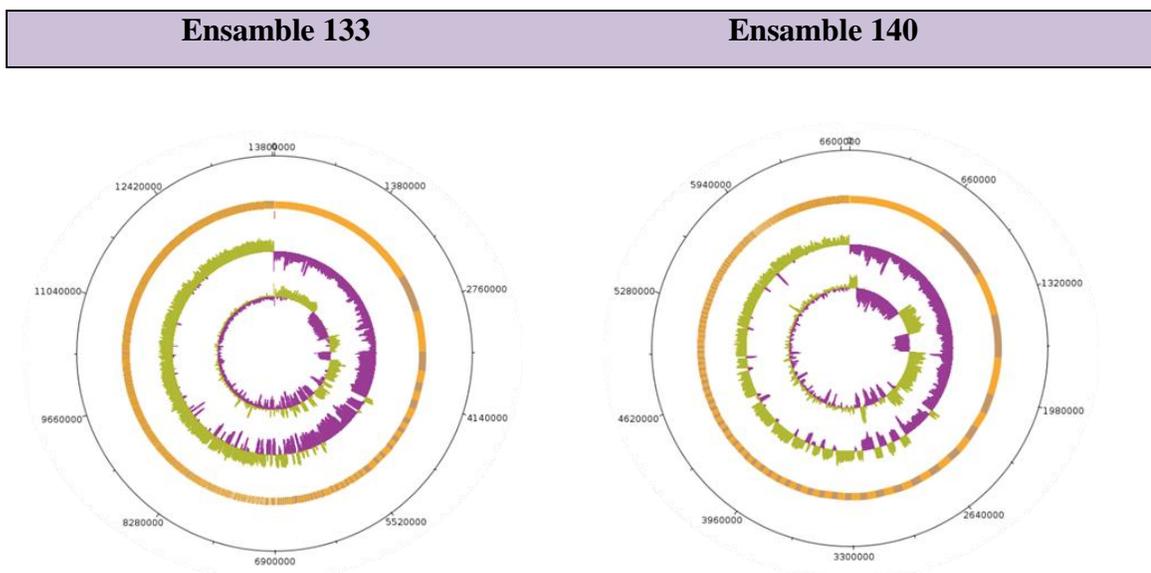


Figura 11. Visualización de los genomas 133 y 140 mediante DNAPlot de Artemis. Del ensamble del genoma 133 se obtuvieron 5070 contigs, mientras que del genoma 140 se obtuvieron 1547 contigs.

7.4 Genes del core de las cepas 133 y 140 cultivadas con el género *Halorubrum*.

Tabla 5. Genes core del género *Halorubrum* utilizados para la filogenia

Marcadores del core obtenidos por Get_Homologues	
1	cell division protein FtsZ
2	tryptophan synthase subunit alpha
3	tryptophan synthase subunit beta
4	phosphate signaling complex protein PhoU
5	30S ribosomal protein S27e
6	metal-dependent hydrolase
7	DNA-directed RNA polymerase subunit D
8	50S ribosomal protein L18e
9	50S ribosomal protein L13
10	50S ribosomal protein L7ae
11	50S ribosomal protein L31e
12	30S ribosomal protein S28e
13	30S ribosomal protein S10
14	RNA polymerase Rpb4 family protein
15	cyclic pyranopterin monophosphate synthase MoaC
16	Bifunctional-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
17	M42 family metallopeptidase
18	AAA family ATPase
19	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS
20	DNA-binding protein
21	hypothetical protein
22	TATA-box-binding protein
23	ORC1-type DNA replication protein

7.5 Reconstrucción filogenética de las arqueas cultivadas 133 y 140

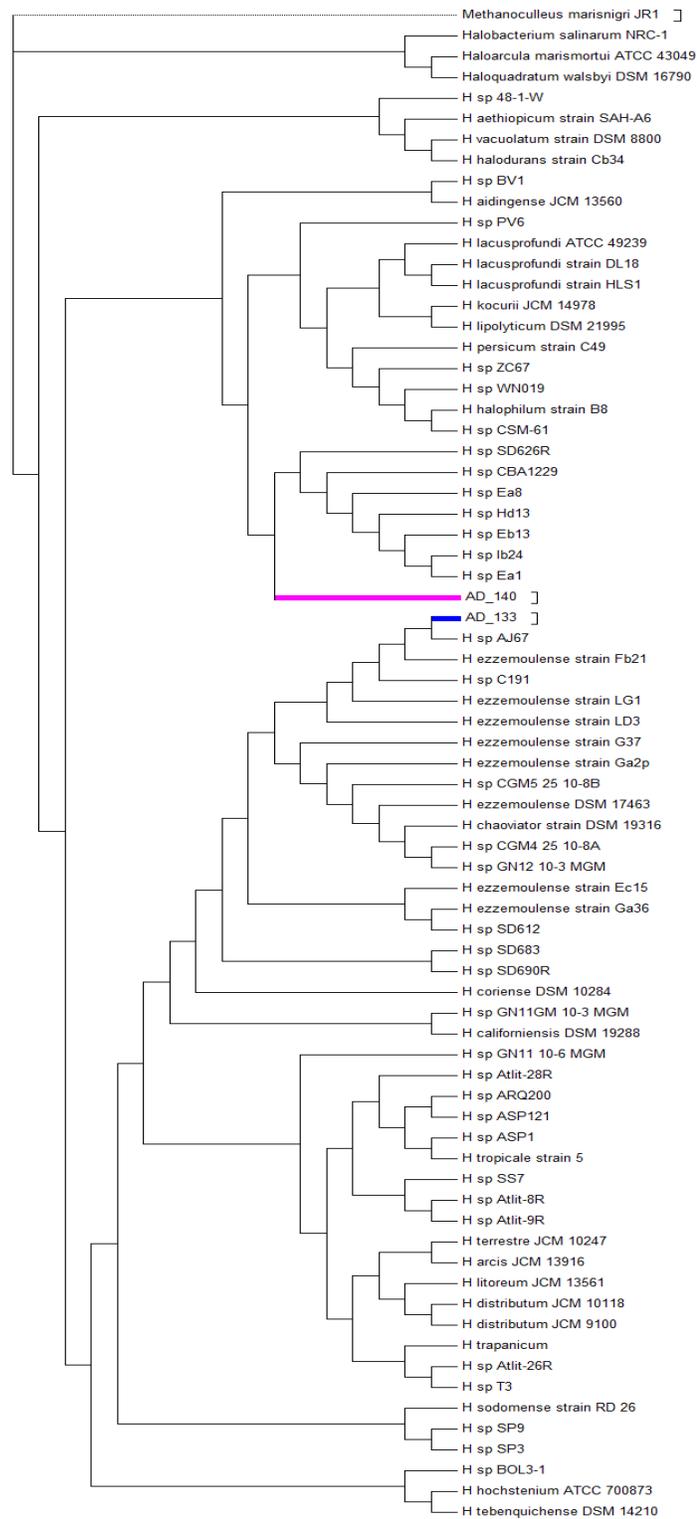


Figura 12. Reconstrucción filogenética a partir de 23 genes concatenados del core del género *Halorubrum* mediante el algoritmo Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo evolutivo TVM+I+G (Modelo de transversión + p-inv* + distribución gamma) con 100 bootstraps. *p-inv: proporción de sitios invariables

7.6 Identificación de phyla presentes en sedimento por PCR

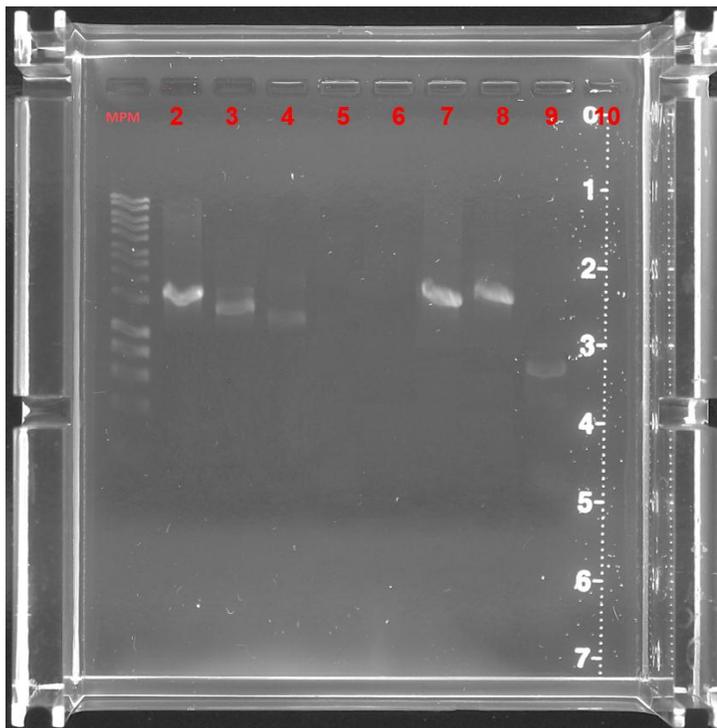


Figura 13. Electroforesis 1% agarosa. Carril MPM: Marcador de peso molecular; Carril 2: 16s Bacteria Control +; Carril 3: Fila Crenarchaeota; Carril 4: Fila Korarchaeota; Carril 5: 16S Bacteria Control -; Carril 6: 16S de Archaea control -; Carril 7: 16S Archaea control +; Carril 8: Fila Euryarchaeota; Carril 9: Fila Thaumarchaeota; Carril 10: Control Negativo.

7.7 El Dominio Archaea en los Domos del Arqueano

La secuenciación de Illumina MiSeq dio como resultado 28,859,454 lecturas crudas para el DA1, 24,772,053 lecturas crudas para el DA2 y 28,203,458 lecturas crudas para el DA3; dichas lecturas pasaron por un proceso de normalización para el análisis bioinformático.

Los resultados de dichos análisis mostraron que los porcentajes de las abundancias relativas para el Dominio Archaea en DA1, DA2 y DA3, fueron de 3.6%, 5%, y 5% (Figura 14a) respectivamente, siendo estos valores muy contrastantes con la gran comunidad viral en cada metagenoma, alcanzando una abundancia relativa de alrededor de 28% (Figura 14a).

El perfil taxonómico de los metagenomas mostró la presencia de una comunidad arqueana en los DA dominada por el phylum Euryarchaeota, seguida por los phylums Crenarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota (Figura 14b).

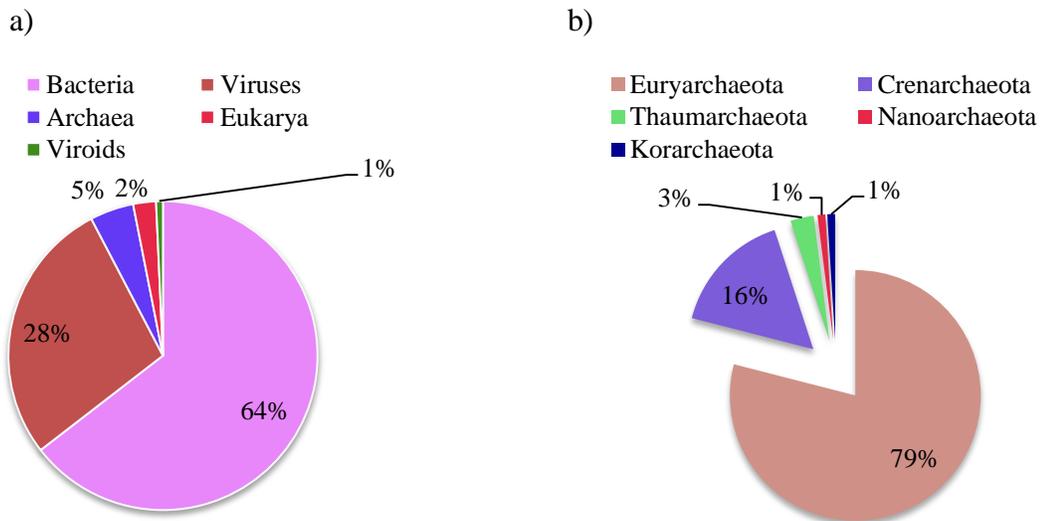


Figura 14. a) Representación de la diversidad total promedio de los tres metagenomas, b) representación de la diversidad de los phyla del Dominio Archaea.

Estos phyla comprenden 15 clases (Figura 15), siendo más abundante los miembros de Halobacteria y Metanomicrobia, ambos grupos importantes del phylum Euryarchaeota. Adicionalmente se encontraron 25 ordenes (Figura 16), 36 familias (Figura 17), 93 géneros y 230 especies a nivel ecotipo, con un nivel de identidad del 97%. Es importante mencionar que, de estos últimos, un total de 24 OTU's no se pudieron clasificar dentro del perfil taxonómico.

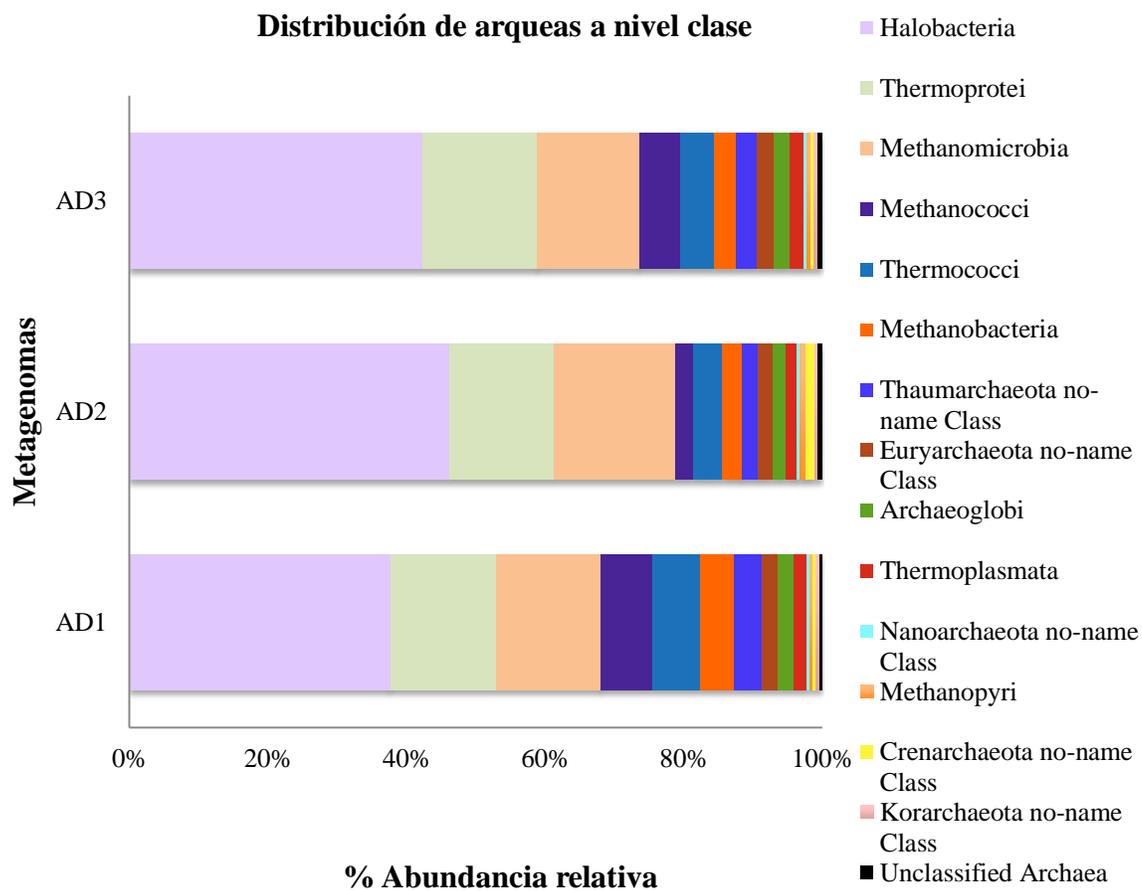


Figura 15. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de clase.

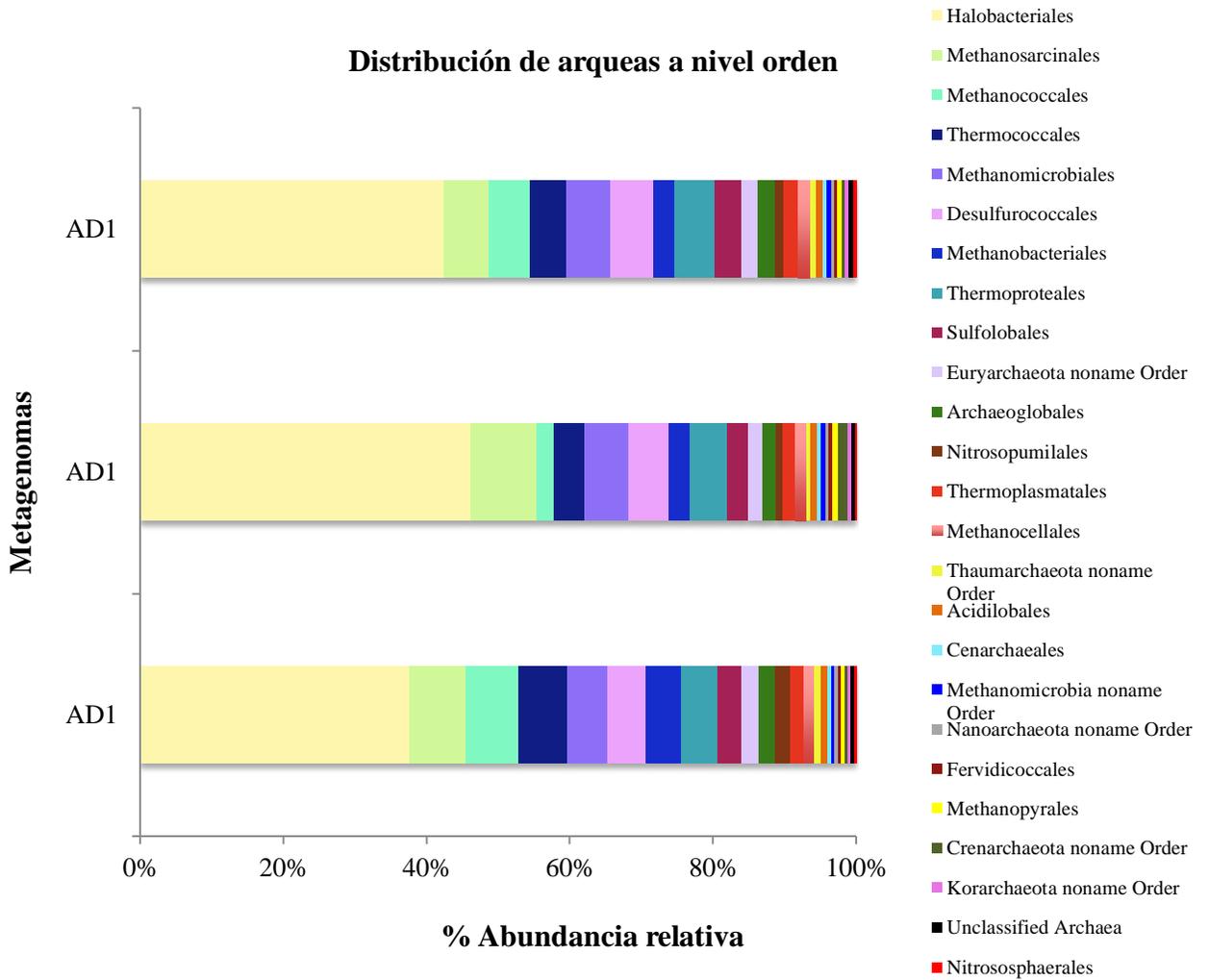


Figura 16. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de orden.

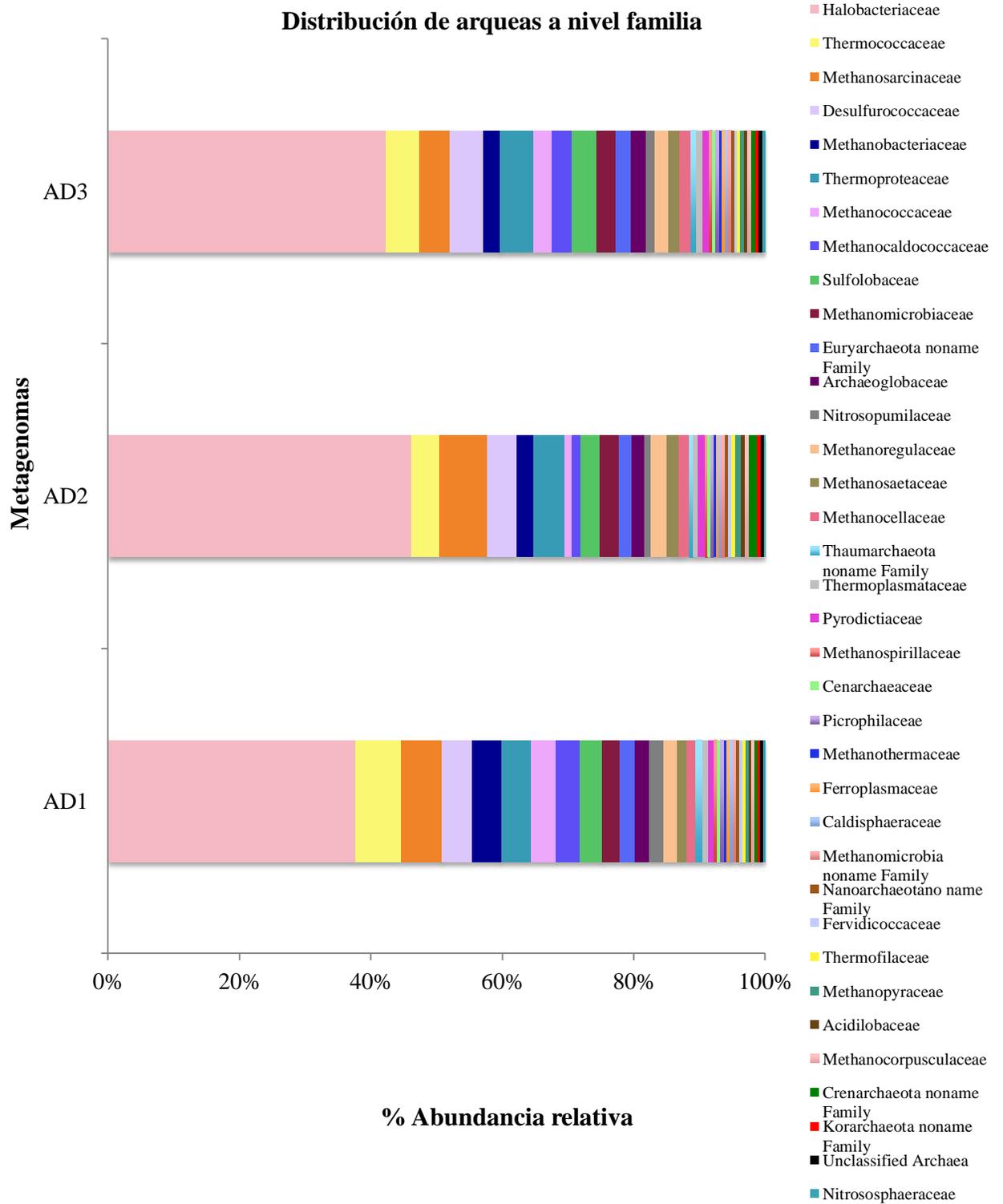


Figura 17. Distribución de arqueas a nivel taxonómico de familia.

La especie con mayor abundancia en los tres metagenomas fue *Methanohalophilus mahii*, sin embargo, otras cuatro especies mostraron un cambio sustancial en su abundancia relativa a través del tiempo (Figura 18)

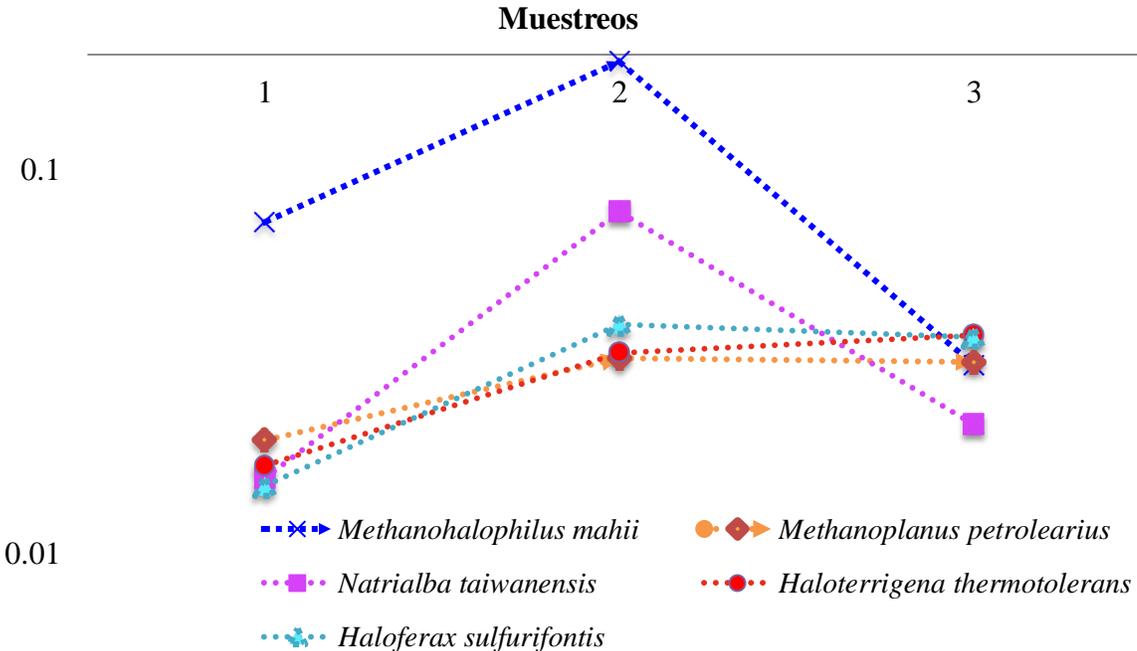


Figura 18. Especies más abundantes y su cambio a través del tiempo.

Taxones de arqueas condicionalmente raras a través del tiempo

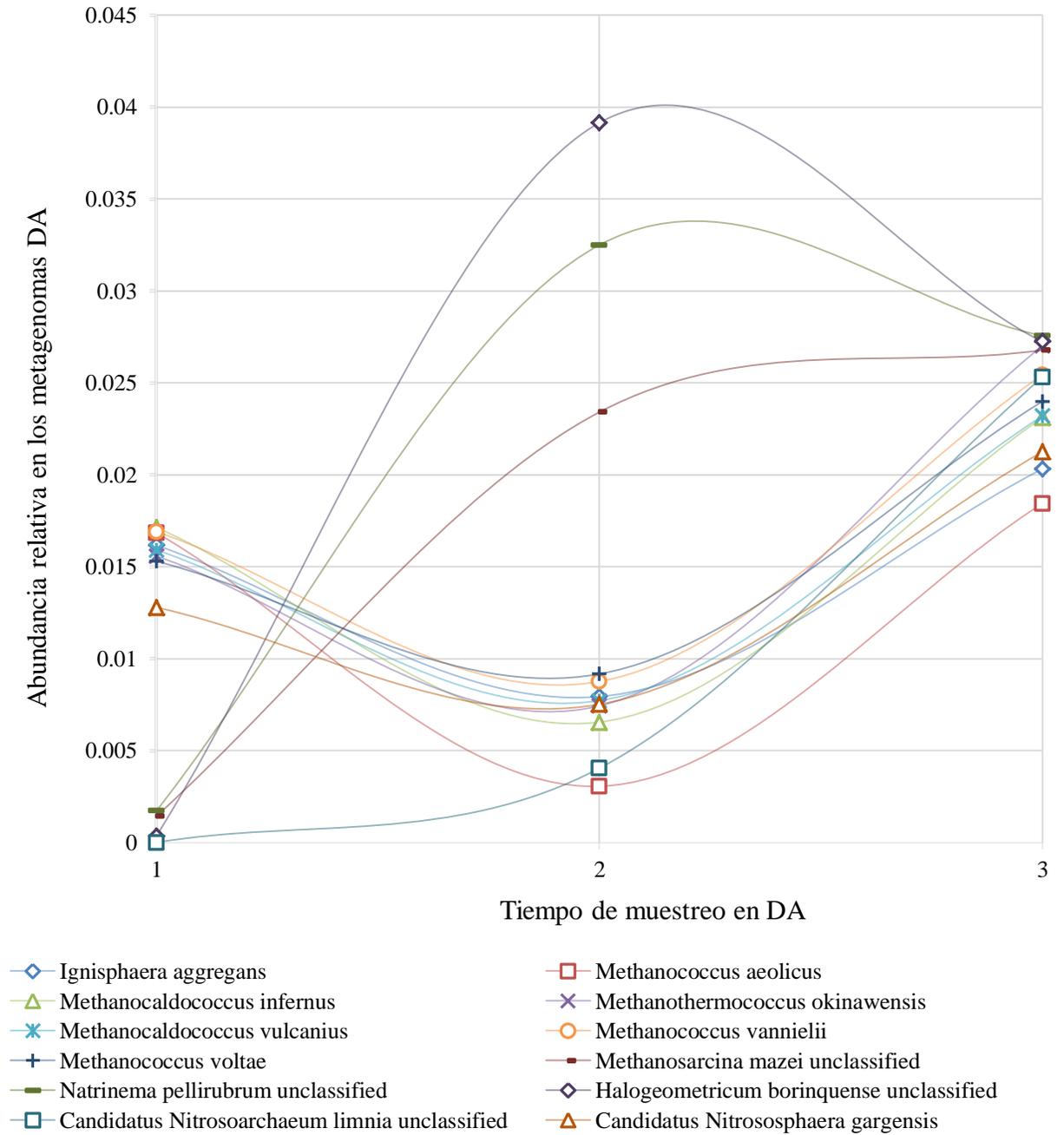


Figura 19. Abundancias relativas de taxones arqueanos condicionalmente raros a través de los tres muestreos en los Domos del Arqueano.

Taxones de arqueas transitoriamente raros a través del tiempo

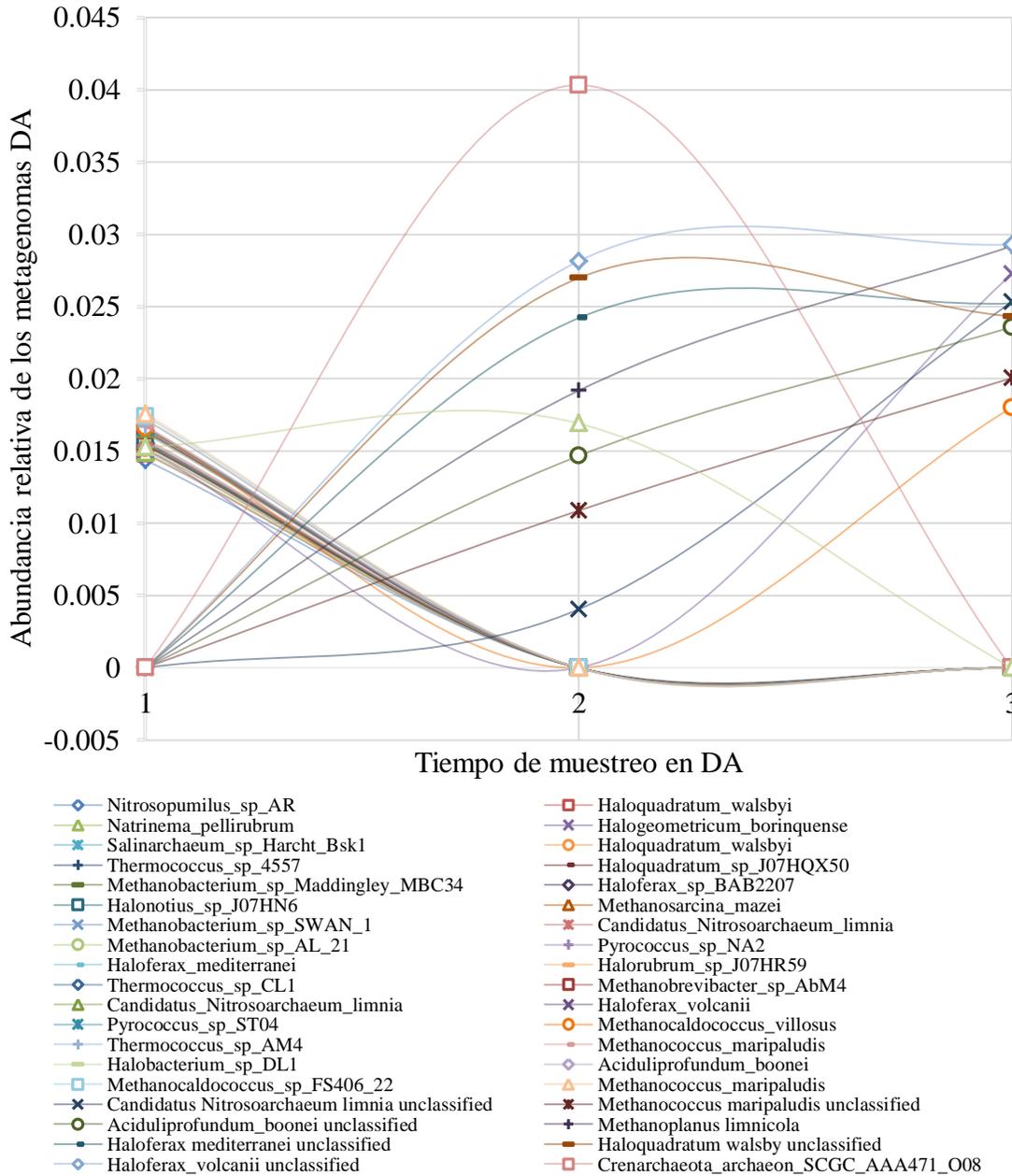


Figura 20. Abundancias relativas de taxones arqueanos transitoriamente raros a través de los muestreos de los Domos del Arqueano.

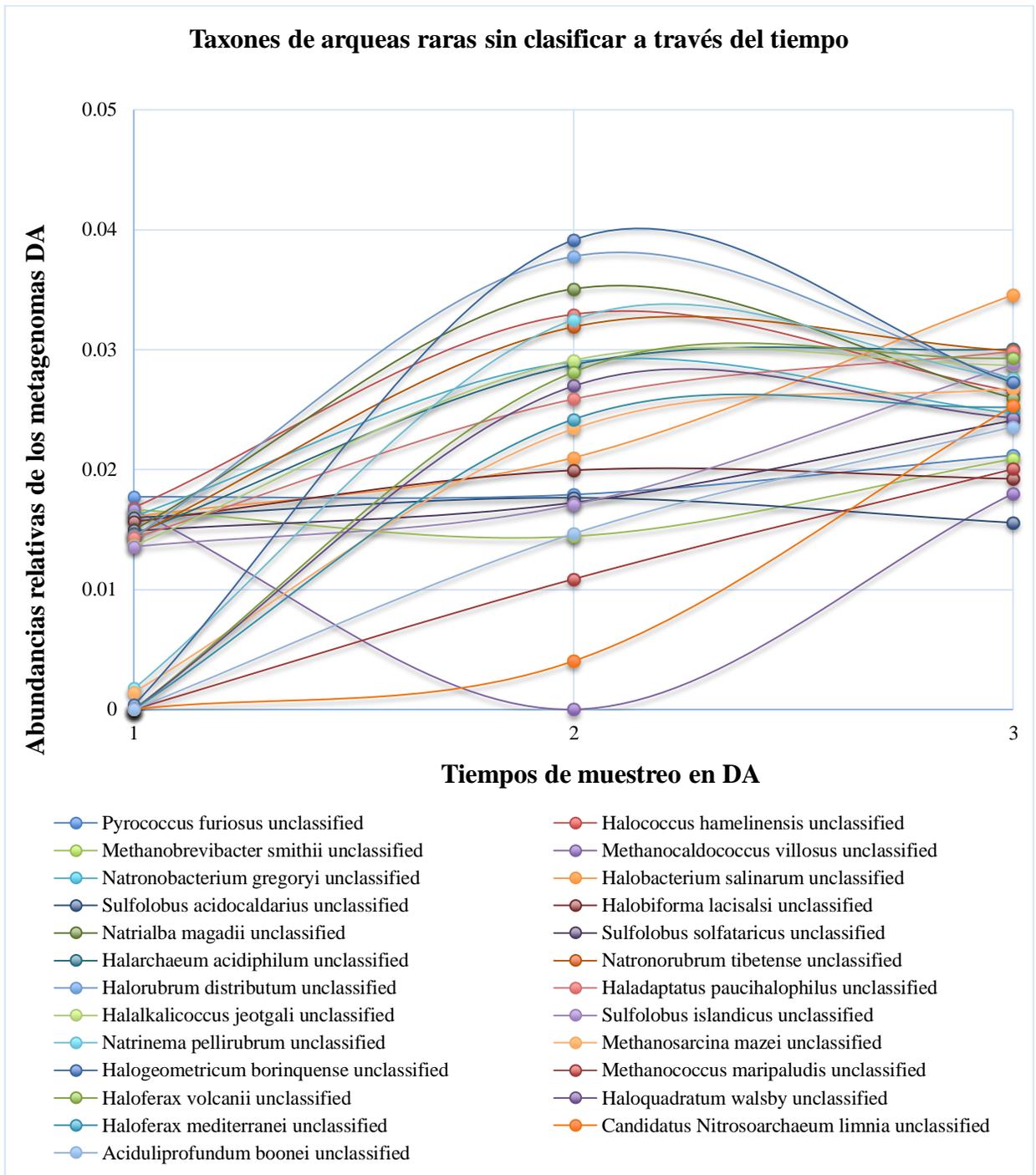


Figura 21. Arqueas raras sin clasificación de los Domos del Arqueano.

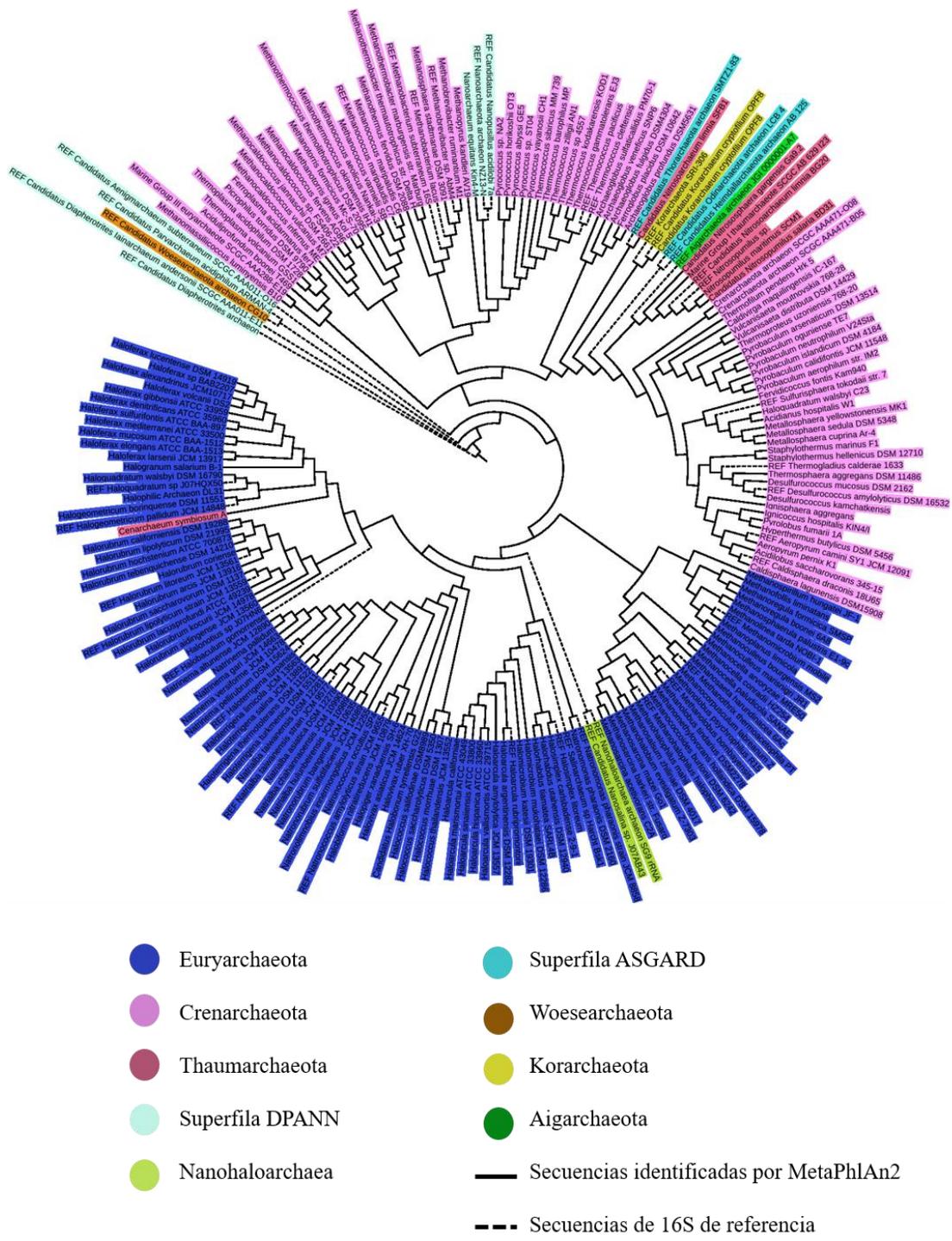


Figura 22. Reconstrucción filogenética del Dominio Archaea encontrada en DA1, DA2 y DA3, mediante el perfil taxonómico dado por MetaPhlan2, basado en secuencias completas del gen 16S, usando el método maximum likelihood, construido con el modelo evolutivo K-2 +G con 1000 replicados.

7.8 Índices de diversidad

Para realizar la comparación en cuanto a riqueza y abundancia de los metagenomas, se calcularon diversos índices de diversidad α y β mediante softwares, utilizando abundancias relativas, así como la presencia y ausencia de las 230 especies. A continuación, se enmarcan dichos índices.

Tabla 6. Índices de diversidad alfa y beta.

Índices de diversidad alfa	ADM1	ADM2	ADM3
Shannon ^{mean}	5.33	5.38	5.3
Simpson Inv ^{mean}	207.3	214.17	216.38
OTU's observados	222	200	200
Chao	207.3	221.57	254.61

Índices de diversidad beta	1 ^{ra} muestra	2 ^{da} muestra	Jaccard Classic	Sorensen Classic	Bray-Curtis
	1	2	0.83	0.90	0.69
	1	3	0.83	0.91	0.71
	2	3	0.98	0.99	0.84

7.9 Reconstrucción filogenética

Las secuencias del gen 16S de las especies se obtuvieron del GenBank-NCBI de acuerdo a su identidad dada por Metaphlan2 para poder reconstruir una filogenia que permitiera observar la extensión de la diversidad del dominio. La filogenia muestra 213 secuencias, 169 pertenecientes a nuestros resultados y 44 secuencias fueron referencias tomadas del GenBank. Cabe mencionar que la reconstrucción filogenética no muestra las secuencias de las 230 especies ya que se omitieron aquellas que pertenecían a los mismos géneros para evitar redundancia y las que no contaban con un tamaño de secuencia mayor a 1300 pb. Al llevar a cabo la reconstrucción filogenética se observaron 11 clados principales (Figura 22).

8. DISCUSIÓN

Las cepas que se lograron aislar en su mayoría pertenecen al orden Halobacteriales, adicionalmente las células de estas presentaron morfologías bacilares pleomórficas; muchas de las especies con estas características morfológicas son conocidas por poseer una capa-S, que tiene un rol importante en el mantenimiento de su morfología (Rodrigues-Oliveira et al., 2017). Se ha descrito que esta morfología tiende a variar de acuerdo a la concentración de sal; una explicación para este fenómeno es la necesidad de la envuelta celular por las altas concentraciones de cationes permitiéndoles estabilidad (Moissl-Eichinger et al., 2017). Mientras tanto, la pigmentación de los cultivos varía entre rojo, rosas y amarillos, que se puede deber a la producción de carotenoides y compuestos C₅₀ tales como la betaína, bacteriodopsina y ectoína, que funcionan como protección y fortalecimiento de la membrana (Rodrigo-Banos et al., 2015).

Durante la identificación de los cultivos mediante secuenciación nos dimos cuenta que uno de ellos, la cepa 140 se trataba de un co-cultivo de un miembro del género *Halorubrum* con la bacteria *Marinococcus halotolerans*, mientras que la cepa 88 es en realidad un metagenoma de baja diversidad, es decir, que alrededor de 3 a 5 arqueas co-existen en la misma muestra.

La cepa No. 140 representa un reto microbiológico, ya que hasta el último ensayo no fue posible la separación de los microorganismos en cultivos axénicos, dicha muestra presenta de manera homogénea una morfología colonial circular regular, de tamaño pequeño (~ 0.2 mm), y color amarillo opaco. Estudios que describen a *Marinococcus halotolerans* han hecho mención de las grandes concentraciones tanto de NaCl como de KCl que esta puede soportar (0-25%), y de los rangos de temperatura y pH óptimos (28°C y 8, respectivamente), que son las mismas condiciones en las que se creció la cepa No. 140. La relación de los miembros del género *Halorubrum* con *Marinococcus halotolerans* no se ha descrito aún, pero puede representar un modelo interesante para el cultivo de aquellos microorganismos difíciles de aislar. Sin embargo, la presencia de dos especies en una muestra no es difícil de imaginar sobre todo si hablamos de aquellos pertenecientes al Dominio Archaea, actualmente se tiene conocimiento de la relación

simbiótica de algunas arqueas con eucariotes superiores, de comunidades de arqueas termófilas, o incluso de arqueas miembros del filum Thaumarchaeota conviviendo con bacterias del azufre en sedimentos marinos (Park et al., 2010). Respecto al metagenoma de baja diversidad de la muestra 88 se logró identificar mediante la anotación con una base de datos interna con secuencias únicas de este Dominio que los procariotes en él pertenecen al Dominio Archaea. Para una mejor identificación de los microorganismos en la muestra 88 se requiere una nueva secuenciación con la profundidad y cobertura suficiente para poder realizar el ensamblado y anotación de la misma.

Mientras tanto, la cepa 133 se identificó como otro miembro del género *Halorubrum*, diferente a la muestra 140. Esto se comprobó adicionalmente mediante la filogenia de estas dos con todos los individuos del mismo género actualmente reportados en base de datos. En la reconstrucción filogenética se observó que la muestra 133 forma un clado con la especie *Halorubrum sp. BOL3-1*, mientras que la muestra 140 se coloca de forma individual indicando por su posición que se podría tratar de una nueva especie, o un nuevo ecotipo. A pesar que el soporte nodal entre la cepa 140 y todo el cluster de clados superiores no es alto, la posición de la cepa 140 indica una divergencia filogenética significativa. De acuerdo a otros estudios, las especies de la clase Halobacteria presentan comúnmente eventos de transferencia horizontal y recombinación homóloga que han permitido su evolución, así mismo se sugiere que las haloarqueas están fuertemente moldeadas por estos procesos.

Las especies del género *Halorubrum* representan un grupo de microorganismos con gran potencial biotecnológico en la industria textil, óptica y recientemente clínica. Actualmente, los compuestos de Haloarchaeas se usan en la industria, por ejemplo, la bacteriodopsina de *Halobacterium Salinarum* tiene aplicaciones en holografía, retinas artificiales, computación óptica de redes neuronales, entre otros, debido a sus características fotoeléctricas, de protones y fotoquímicas. En la actualidad, dos compañías COBEL (Barcelona) y Muchich Innovate Biomaterials (MIB) venden parches de membrana púrpura que contienen bacteriodopsina (Margesin & Schinner, 2001), otra bacteriodopsina comercial se vende como parte de un sensor bioquímico de movimiento (No. US5719033) [Ackley and Shieh, 1988]. Solutos compatibles que

mantienen el equilibrio hídrico de las células y se utilizan como estabilizadores de biomoléculas y agentes protectores de estrés. Liposomas patentados (No. US5989587) de *Halobacterium cutirubrum*, generalmente son usados en el área médica como transportadores de fármacos.

Continuando con el potencial biotecnológico de los halófilos cultivados y de acuerdo a la anotación funcional en el servidor RAST, las cepas 133 y 140 contienen genes que codifican para rutas, genes, muchos de ellos involucrados en la síntesis de enzimas con alto valor agregado, como las que de forma experimental se comprobó mediante ensayos enzimáticos preliminares. Por ejemplo, ambas cepas resultaron positivas para la síntesis de proteasas, celulasas, xilanasas y actividad lipolítica. La producción de estas enzimas sugiere una solución al problema de degradación de celulosa. Algunas otras aplicaciones incluyen la liberación de aguas adheridos en gomas absorbentes, mejoramiento de filtración, reducción de viscosidad y modificación de gomas solubles y fibras y liberación de materiales celulósicos. Así como las celulasas, las proteasas, lipasas y amilasas son de gran uso en la formulación de detergentes, reducen el consumo de energía y deterioro en telas; el uso de estas se extiende al área de la biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminados con hidrocarburos, aceites y lípidos.

Finalmente, el cultivo de la cepa 150 se identificó como un miembro del género *Halobacterium*, sin embargo, la profundidad y la calidad de la secuenciación no fueron suficientemente buenas para realizar los respectivos análisis.

8.1 Análisis de metagenómica

La comunidad microbiana que constituye al tapete microbiano de los DA, es único entre las comunidades bacterianas estudiadas en el CCB (V. Souza et al., 2018), mostrando una gran abundancia relativa del Dominio Archaea en DA1, DA2 y DA3, alcanzando un 3.6%, 5% y 5%, respectivamente. Estas abundancias son remarcables para un área de muestreo tan pequeña (cm^2), pero también comparado con otros sitios en el Valle de Cuatro Ciénegas y en el mundo (ver Tabla 3) (Babilonia et al., 2018; A. B. Fernandez et al., 2016; Garcia-Maldonado et al., 2018; Shade et al., 2014; Shade et al., 2013).

Previamente se ha demostrado que las comunidades microbianas no son variables discretas y pueden ser limitadas temporal y espacialmente (Nemergut et al., 2013).

Después del perfil taxonómico a diferentes niveles, se observó una comunidad arqueana base que se mantiene casi intacta en el tiempo (abril 2016- febrero 2017). Esto brinda evidencia de estabilidad detrás de la construcción de los domos (hipótesis nula). Aun así, sin tomar en cuenta esta comunidad base, la diversidad y las proporciones de los “taxones raros” de las arqueas sufren un incremento o decremento a través de los temporales o tiempos de muestreo, exhibiendo una dinámica en los DA que pudiera estar jugando un papel importante para el funcionamiento de estos en un medio con diferentes condiciones ambientales.

8.2 Los Domos del Arqueano en el Valle de Cuatro Ciénegas son buenos modelos del periodo arqueano, y son uno de los ambientes más diversos y abundantes del Dominio Archaea

Los tapetes microbianos y estromatolitos son considerados análogos de la Tierra temprana, cuando ellos se originaron como comunidades ecológicamente exitosas, capaces de llevar a cabo ciclos de nutrientes y ciclos bioquímicos completos tan pronto como empezó y diversificó la vida en el Eon Arqueano temprano (Lenton & Daines, 2017; Sleep, 2010). Diferentes linajes ancestrales han sobrevivido en el Valle de Cuatro Ciénegas (Moreno-Letelier et al., 2012; V. Souza et al., 2018), ya que se han adaptado a linajes vecinos, formando comunidades muy unidas que de manera cohesiva han sobrevivido a pesar de los grandes y fuertes cambios de factores abióticos, tales como aquellos que se han experimentado a través de su larga trayectoria evolutiva (V. Souza et al., 2018). En este trabajo se sugiere que el tapete microbiano de los DA no son una excepción en el Valle de Cuatro Ciénegas, sin embargo, la observación que genera mayor interés científico es el estudio de estos tapetes en particular es por sus condiciones extremas en pH y salinidad, además de su impresionante arquitectura.

Las condiciones ambientales extremas análogas a este sitio se han reportado antes en tapetes microbianos con presencia y gran abundancia en miembros del Dominio Archaea, por ejemplo, en el Desierto de Atacama o en las salinas artificiales de Guerrero

Negro, donde ambos ambientes estables a pesar de su riqueza muestran mucha menor diversidad de arqueas que nuestro punto de muestreo [Tabla 3] (Babilonia et al., 2018; A. B. Fernandez et al., 2016; Garcia-Maldonado et al., 2018).

Una posible causa de este tipo de eventos puede ser que las fluctuaciones ambientales en los DA son parte de la dinámica de la comunidad, incrementando posibles nichos. Así mismo se ha observado que dentro del Valle de Cuatro Ciénegas otros ambientes fluctuantes albergan una gran diversidad debido a las adaptaciones locales de cada condición (Cerritos et al., 2011; Rodriguez-Verdugo et al., 2012).

Sin embargo, los tapetes de los DA son peculiares ya que las arqueas son más abundantes y diversas que en otros microbialitos fluctuantes dentro del valle (Centeno et al., 2012) [Tabla 3].

Adicionalmente, este es el primer sitio donde existe una comunidad microbiana base, a pesar de las grandes fluctuaciones entre temporadas. No solo la diversidad de arqueas es relativamente constante, sino que también es considerablemente grande para un estudio de metagenómica usando la plataforma Illumina (Tessler et al., 2017).

Por otro lado, las librerías de clonación para primers específicos de arqueas han revelado una gran abundancia de este Dominio, alrededor del 10% en comunidades de estromatolitos en la poza Hamelin ubicada en Shark Bay, Australia, donde se alcanza una de las abundancias más altas en arqueas. Sin embargo, esta comunidad arqueana solo está representada por 27 clonas de un total de 176 librerías de 16S rARN de un mismo punto de muestreo (Papineau et al., 2005).

Estos números son difíciles de comparar con nuestra diversidad de arqueas observada debido a enfoques experimentales diferentes. Otros tapetes microbianos hipersalinos con gran riqueza en arqueas muestran abundancias relativas que rondan entre un 4% en un tapete de Camargo, España (Berlanga et al., 2017), 9% en otro tapete hipersalino de Guerrero Negro (Robertson et al., 2009), 20% en algunas de las capas de un tapete microbiano en una poza superficial del Salar de Llamara (Saghai et al., 2017) y más de un 90% de secuencias de 16s rARN amplificadas de un tapete litificante en la Laguna de

Tebechique en el Salar de Atacama (A. B. Fernandez et al., 2016). A pesar de eso, todos estos sitios ricos en arqueas, muestran bajas diversidades (Farias et al., 2017) respecto al nuestro (cm^2). Siendo un sitio tan pequeño, nuestras 230 especies diferentes (97% de identidad) pertenecientes a 5 fila diferentes pueden ser considerados como altos en cuanto a riqueza y diversidad. Notablemente, 24 OTU's de estos 230 no se pudieron clasificar dentro del dominio, creando un reto interesante para la sistemática y biodescubrimiento. El Valle de Cuatro Ciénegas es ampliamente conocido por su magnífica diversidad microbiana y sus linajes endémicos únicos (Arocha-Garza et al., 2017; Cerritos et al., 2011; Moreno-Letelier et al., 2012; Rebollar et al., 2012; V. Souza et al., 2006; Taboada et al., 2018) que han sido aislados del resto del mundo; esta particularidad puede ser en parte el resultado de su extraña estequiometría en N: P (157:1) tendiendo a un estado de oligotrofia la mayor parte del año, especialmente por sus bajas concentraciones en fósforo (Alcaraz et al., 2008; Elser et al., 2005; V. Souza et al., 2008).

A pesar de la carencia nutricional que puede representar este sitio siendo parte del Desierto Chihuahuense, es sorprendente la gran diversidad de microorganismos que hay en él. Adicionalmente, Cuatro Ciénegas posee una micro heterogeneidad debido a la presencia de múltiples microambientes en un solo punto (Arocha-Garza et al., 2017; V. Souza et al., 2008; V. Souza et al., 2006). Aparentemente la limitación de nutrientes no afecta la dispersión de los microorganismos gracias a su tamaño, abundancia y plasticidad metabólica (Palys et al., 1997).

El éxito de las comunidades de arqueas en los DA, puede basarse en las adaptaciones fisiológicas que pueden permitirles, por ejemplo, competir con las bacterias en nichos específicos con una disponibilidad de energía y nutrientes baja (Valentine, 2007). Sin embargo, estudios previos en localidades dentro del valle muestran el mismo estrés energético, tales como los tapetes microbianos de Pozas Rojas, que carecen de miembros similares de arqueas. Pozas Rojas exhibe ratios extremos de N: P (156:1), y ambientes fluctuantes (Peimbert et al., 2012).

A pesar de lo descrito anteriormente, antes del descubrimiento de los DA, la diversidad y abundancias arqueanas no se habían reportado anteriormente como una distinción en

ninguno de los numerosos sitios explorados y descritos dentro del valle (De Anda et al., 2018; Taboada et al., 2018; Velez et al., 2016).

La abundancia de miembros de filum Euryarchaeota (halófilos y metanógenos), puede estar relacionado a la presencia de carbonato, y la gruesa capa superficial de sal, así como el estrato metanogénico del fondo, actuando como barreras en ambos lados del tapete.

Los índices de diversidad α y β estimados para las muestras de los DA sugieren una comunidad resiliente, que se espera estar influenciada por una diversidad de especies, tal como se explica en la hipótesis de aseguramiento (Yachi & Loreau, 1999), la cual sugiere un “efecto estabilizador” cuando existe una gran biodiversidad, permitiendo hacer frente a las fluctuaciones del ambiente y al mismo tiempo fortaleciendo al funcionamiento del ecosistema (Yachi & Loreau, 1999). Al mismo tiempo nuestros datos muestran un ligero incremento en la diversidad arqueana y sus índices de riqueza en las temporadas secas comparada con la muestra de la temporada húmeda (Tabla 4), posiblemente porque este es el estado natural del sitio, ya que las precipitaciones anuales no son suficientes para disolver las sales y cambiar la ecología de los tapetes.

Otra explicación posible para el incremento de la abundancia y diversidad del Dominio Archaea en los tapetes DA es la hipótesis “asesinando al ganador” (Winter et al., 2010), en la cual se asume la dinámica depredador-presa y que propone una selección dependiente de frecuencia negativa, en donde tipos de bacterias son afectadas por presión viral, promoviendo la supervivencia y viabilidad de tipos “raros”, y así permitiendo mantener la alta diversidad. Siendo esto así, las lecturas virales en los metagenomas de los DA representan una abundancia relativa que va de los 23.3% a los 31.6%, el cual es remarcablemente alto comparado con otros metagenomas, e incluso mucho más alto que los ambientes ricos en virus, tales como aquellos obtenidos de muestras filtradas de agua del mar de Corea del Sur (Hwang et al., 2017), sedimentos marinos profundos (Corinaldesi et al., 2017) y microbialitos en Shark Bay, Australia (Babilonia et al., 2018).

8.3 La biosfera rara en la comunidad de los DA.

La biosfera rara puede representar un reservorio de diversidad genética que responde activamente a cambios ambientales (Coveley et al., 2015). Dada la predominancia de una biosfera rara en todas las sitios muestreados y analizados del valle (De Anda et al., 2018), y las condiciones extremas e impredecibles del sitio DA, consideramos que es importante explorar la rareza dentro de la comunidad del Dominio Archaea. Definiendo la biosfera “estrictamente rara” como aquellos taxones con abundancias relativas menores al 0.01%, encontramos 50 OTU’s arqueanos. Dentro de este grupo, 11 OTU’s se comportan como condicionalmente raras (Figura 19) (Shade et al., 2014), manteniendo su baja abundancia sólo en un tiempo de muestreo (octubre 2016), y alcanzando abundancias más altas en las dos temporadas secas. Estas dinámicas nos llevan a especular que estos OTU’s raros de los DA, junto con otros OTU’s más abundantes pueden ser beneficiados por condiciones más secas y ambientes salinos. En ambos casos, es importante notar que tanto la riqueza de las arqueas como las abundancias en general no cambian entre muestras, es la biosfera rara (aquellos afectados por las fluctuaciones ambientales) la que exhibe variaciones. Una respuesta similar de condiciones frías contra las tibias se ha detectado dentro de los sistemas del valle (Rodríguez-Verdugo et al., 2012). Entre esta biosfera rara, algunos taxones se han encontrado como “transitoriamente raros” (por ejemplo, ausentes en una o dos muestras) englobando 39% OTU’s (Figura 20). Sugerimos que este tipo de rareza debe ser conducido por lo menos en parte por procesos estocásticos, tales como dispersión pasiva de linajes temporalmente reclutados de bancos de semillas microbianas, o debido a la migración (Lynch & Neufeld, 2015). Como un ejemplo, 9 taxones raros sin clasificar no están presentes o se encontraron en poca abundancia en la muestra inicial AD1, convirtiéndose en abundantes en la muestra de Febrero (muestra seca). Más estudios de metagenómica se encuentran en proceso para poder explorar estos patrones en un periodo más largo.

No debería descartarse que los taxones menos abundantes de los DA pudieran estar en un estado de dormancia, un mecanismo que mantiene a las células vivas, pero inactivas e intermitentemente detectables en un bajo rango de detección (S. E. Jones & Lennon,

2010). De hecho, algunos miembros de la arqueas, pueden entrar en un estado celular de dormancia (Bautista et al., 2015; Gulbudak & Weitz, 2016; S. E. Jones & Lennon, 2010). Este mecanismo provee una respuesta adaptativa que pudiera ser de alguna forma parte de perturbaciones ambientales deletéreas. Esto ha se visto a partir de experimentos en un arqueon termoacidófilo *Metallanosphaera prunae* que produce la toxina VapC que dirige a la célula a un estado de dormancia bajo un estrés por Uranio (Mukherjee et al., 2017). Otro factor que puede estar afectando los mecanismos de dormancia en las arqueas, son los organismos depredadores, específicamente, virus, los cuales son abundantes en los metagenomas de los DA (~28%). Como un ejemplo, un grupo de investigación mostró que los virus raros e incluso inactivos, inducen a la dormancia en el arqueon modelo *Sulfolobus islandicus* (Bautista et al., 2015). También la oligotrofia puede estar jugando un rol en la dormancia en arqueas, así como algunos taxones bacterianos dormantes se han encontrado estar enriquecidos en un ambiente bajo en fósforo (S. E. Jones & Lennon, 2010), y algunos microorganismos dormantes pueden también escapar de la depredación por virus (L. Fernandez et al., 2018). Considerando la extremadamente inusual estequiometría, los virus pueden ser quienes moldeen la estructura de la comunidad, no solo liberando nutrientes inmovilizados al sistema por medio de la lisis celular, sino que también mantienen una gran cantidad de taxones raros coexistiendo y evadiendo la depredación. Aparentemente, la estructura y función de las comunidades microbianas depende de la presencia de ciertos microorganismos aun cuando su abundancia es muy pobre. Así cada una de esas especies puede tener una función crucial y única bajo ciertas circunstancias, permitiendo robustez a la comunidad.

8.4 Arqueas halófilas y metanógenas en los DA.

Las especies halófilas y metanógenas fueron muy abundantes en los DA, representando más del 50% de la diversidad total de las arqueas. La relación entre halófilos y metanógenos es bien conocida, ya que comparten un hábitat ancestral (Edbeib et al., 2016; Robertson et al., 2009; Spring et al., 2010; Valentine, 2007) y ambos grupos pueden ser encontrados en tapetes microbianos y comunidades microbianas asociadas a la precipitación de minerales (endovaporitos) (Garcia-Maldonado et al., 2018). Los

metanógenos que viven en dichos ambientes necesitan de altos niveles de NaCl (0.5 M) para su óptimo crecimiento (W. J. Jones et al., 1987) y usualmente son halotolerantes o halófilos moderados (Boone et al., 1993). Los ambientes hipersalinos son muy dinámicos y comunes alrededor del mundo (Vogt et al., 2018).

En nuestro punto de muestreo, las arqueas halófilas y metanógenas se propone que ambas constituyen la comunidad base de los DA durante las condiciones hipersalinas debajo de una costra de sal. De acuerdo a otros estudios, la salinidad es el factor abiótico más importante, ya que permite el modelado de las comunidades microbianas, especialmente en superficies de sedimentos, estromatolitos, chimeneas hidrotermales, tapetes hipersalinos y aguas salinas anóxicas. Así mismo, estos estudios han demostrado que los sedimentos salinos contienen comunidades con grandes valores de biodiversidad única en comparación de otros ambientes (Yang et al., 2016). Otros estudios han demostrado que los cambios en la salinidad, sulfatos y la disponibilidad de algunos sustratos pueden estimular la producción de metano (García-Maldonado et al., 2018).

Los OTU's más abundantes en los metagenomas analizados son similares a *Metanohalophilus mahii*, un arqueon metanohalófilo, descrito como un metanógeno no marino, adaptado a ambientes hipersalinos, donde su metabolismo requiere concentraciones de 1.0-2.5 M de NaCl para un óptimo crecimiento y llevar a cabo la metanogénesis, usando como sustrato metanol y metilaminas (Spring et al., 2010). Otros OTU's encontrados en los DA son *Natrinema taiwanensis*, *Haloferax sulfurifontis*, *Methanoplanus petrolearius*, y *Haloterrigena thermotolerans*. Las especies halófilas y metanógenas han coexistido dentro del tapete microbiano, junto con otros géneros inesperados que pertenecen al filum Euryarchaeota; entre estos podemos encontrar *Thermococcus*, *Natromonas*, *Picrophylus*, *Archaeoglobus*, *Aciduliprofundum* e incluso *Thermoplasma*, un linaje que carece de pared celular. Estos microorganismos se han reportado mayormente en chimeneas hidrotermales, mostrando niveles de tolerancia a bajas y altas temperaturas, así como a un amplio rango de pH (Anderson et al., 2015; Takai & Horikoshi, 1999). La presencia de estos taxones junto con otras observaciones previas, añaden evidencia a nuestra propuesta inicial en la que las comunidades microbianas de Cuatro Ciénegas tienen afinidades marinas y magmáticas

(Moreno-Letelier et al., 2012; V. Souza et al., 2018). Por lo tanto, las arqueas observadas en los DA, son testigos de ambos ambientes, donde el acuífero profundo impulsado por el calor magmático que ocurre dentro de la montaña de San Marcos y Pinos (Wolaver et al., 2013) y la vida superficial, donde ocurre la fotosíntesis después de los días de lluvia. Por consiguiente, parte de la diversidad de los DA, puede haber emergido de los sedimentos profundos que contienen las condiciones minerales del océano profundo (Valeria Souza & Eguiarte, 2018).

8.5 Termófilos y otros linajes de arqueas de los DA.

Tomando en cuenta que la hipótesis magmática influye en la comunidad microbiana de este inusual sitio, taxones miembros del filum Crenarchaeota también se encontraron presentes consistentemente en el tapete de los DA. Este filum incluye géneros termófilos tales como *Thermoproteus*, *Caldivirga*, *Ignicoccus*, *Sulfolobus*, *Pyrolobus*, entre otros. Adicionalmente miembros del filum Thaumarchaeota también fueron detectados, tales como “*Candidatus Nitrososphaera gargensis*”, *Nitrosoarchaeum limnia*, y el Grupo Marino Thaumarchaeota 1. Es notable la presencia de dos OTU’s como *Cenarchaeum symbiosum*, un arqueon psicrófilo, el cual se ha reportado como un simbiote de varias especies de esponjas marinas (Hallam et al., 2006), y *Nitrosopumilus maritimus*, considerado una especie ubicua en océanos oligotróficos (Metcalf et al., 2012), este último es otro descubrimiento de los DA que es consistente con la huella marina frecuentemente encontrada en los microorganismos del Valle de Cuatro Ciénegas (Aguirrezabala-Campano et al., 2019; Alcaraz et al., 2008; Arocha-Garza et al., 2017; Moreno-Letelier et al., 2012; Taboada et al., 2018). Lo mismo ocurre con el representante del filum Korarchaeota “*Candidatus Korarchaeota cryptophilum*”, también presente en los DA y relacionado al origen marino del valle, y a una reciente colonización de ambientes terrestres geotermales, una característica compartida entre los termófilos (Miller-Coleman et al., 2012).

Ambos fila, Crenarchaeota y Thaumarchaeota tienen en términos generales capacidades metabólicas similares. Amplificación por PCR de genes *AmoA* proveniente de DNA genómico total de sedimento de cada una de las muestras (AD1, AD2, AD3) (imágenes

de geles) brindaron evidencia de las capacidades de oxidación de amonio como una fuente potencial de energía y nitrificación (Pester et al., 2011), sugiriendo un rol de estos taxones como quimiolitótrofos, usando una plétora de compuestos orgánicos tales como el CO₂, hierro, nitrógeno y azufre como aceptores finales, como ejemplo, la clase metanobacteria (Euryarchaeota) y los miembros hipertermófilos (Crenarchaeota) utilizan azufre como un aceptor final de electrones (Liu et al., 2012).

Otro miembro inesperado e interesante encontrado en el perfil taxonómico de los metagenomas, fue *Nanoarchaeum equitans*, perteneciente al filum Nanoarchaeota, un arqueon de tamaño pequeño y con una relación ectoparasítica con un miembro del filum Crenarchaeota, *Ignicoccus*, que también fue detectado en la muestra (Forterre et al., 2009). El filum Nanoarchaeota se encuentra presente en una extensa variedad de hábitats con diversas características fisicoquímicas compatibles con ambientes hipersalinos mesófilos y aguas termales (Casanueva et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

Los tapetes microbianos de los Domos del Arqueano en el oasis del Valle de Cuatro Ciénegas fueron recientemente descubiertos y se han descrito como un sitio extremo hipersalino. En estos tapetes descubrimos mediante análisis metagenómicos, una de las diversidades más altas del Dominio Archaea registradas hasta la fecha, considerando la pequeña escala geográfica del sitio.

La mayoría de las 230 especies observadas en esta “poza” temporal poco profunda, es parte de la biósfera rara y de una comunidad “core” estable. Dentro de este core, se observaron halófilos y metanógenos en gran medida, pero también algunos taxones “raros” inesperados, que prosperan bajo condiciones de alta salinidad. Adicionalmente, se observó una biósfera rara transitoria que parece estar enriquecida bajo condiciones ambientales secas, sugiriendo una dinámica estacional moldeadora de la comunidad. Para poder explorar el grupo taxonómico de taxones raros sin clasificar de manera cuidadosa, nos encontramos actualmente en un proceso de análisis de más metagenomas en diferentes temporales, así como la manipulación de experimentos ambientales con mecocosmos. Un esfuerzo mayor de secuenciación de los sedimentos profundos ayudará a entender más la biósfera anaerobia profunda, así como eliminar los puntos ciegos en la filogenia de arqueas sin clasificar. Este ecosistema diverso dentro del Valle de Cuatro Ciénegas, México, surge como un nuevo sitio atractivo para estudios evolutivos, ecológicos, de astrobiología y bioprospección.

Los Domos del Arqueano, son hasta el momento el sitio más diverso en cuanto comunidad microbiana encontrado en todo el Valle de Cuatro Ciénegas. Cuatro Ciénegas es la locación perfecta para representar un modelo donde el aislamiento geográfico juega un rol muy importante; las comunidades microbianas en aislamiento tienen un potencial genético para condiciones ambientales específicas generando eventos de especiación y endemismo (Sexton et al., 2014). Ya que esta área está sujeta a una intensa explotación del agua por prácticas como la agricultura, agregando a esto la desecación de muchas de las pozas encontradas en el Valle, se convierte en prioridad para el grupo de investigación en mantener la investigación de como ocurren procesos

de adaptación de este sitio altamente diverso en arqueas, quienes fluctúan en condiciones de temperatura y precipitación, así como el trabajo en equipo con autoridades y accionistas que permitan una política sobre el uso de agua.

Los Domos del Arqueano, no solo nos remontan al “mundo perdido”, sino que también nos sigue proveyendo de nuevas evidencias y claves para poder algún día entender como “el ciclo de la vida” se pudo haber originado en la Tierra, y si es posible, como sería en otros planetas como Marte.

REFERENCIAS

- Ackley, D.E. & C.L. Shieh. (1998), Thin film transistor biochemical sensor. Patent US5719033. 1998 February 17.
- Adam, P. S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., & Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J*, 11(11), 2407-2425. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28777382>
- Adams, M. W. W. P., F. B.; Kelly, R. M. . (1995). Extremozymes_Expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnology*, 13, 7.
- Aguirrezabala-Campano, T., Gerardo-Nieto, O., Gonzalez-Valencia, R., Souza, V., & Thalasso, F. (2019). Methane dynamics in the subsaline ponds of the Chihuahuan Desert: A first assessment. *Sci Total Environ*, 666, 1255-1264. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30970490>
- Alain, K., & Querellou, J. (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13(4), 583-594.
- Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernandez, G., Cruz, A., et al. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5803-5808. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408155>
- Amaral Zettler, L. A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B. G., Amils, R., & Sogin, M. L. (2002). Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417(6885), 137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000949>
- Anderson, R. E., Sogin, M. L., & Baross, J. A. (2015). Biogeography and ecology of the rare and abundant microbial lineages in deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiol Ecol*, 91(1), 1-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25764538>
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F., & Amann, R. (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol*, 66(7), 3052-3057. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877805>
- Arocha-Garza, H. F., Canales-Del Castillo, R., Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemicity of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, 5, e3247. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28480140>
- Auguet, J. C., Barberan, A., & Casamayor, E. O. (2010). Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J*, 4(2), 182-190. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847207>
- Babilonia, J., Conesa, A., Casaburi, G., Pereira, C., Louyakis, A. S., Reid, R. P., & Foster, J. S. (2018). Comparative Metagenomics Provides Insight Into the Ecosystem Functioning of the Shark Bay Stromatolites, Western Australia. *Front Microbiol*, 9, 1359. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29988640>
- Bautista, M. A., Zhang, C., & Whitaker, R. J. (2015). Virus-induced dormancy in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. *MBio*, 6(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25827422>
- Berlanga, M., Palau, M., & Guerrero, R. (2017). Functional Stability and Community Dynamics during Spring and Autumn Seasons Over 3 Years in Camargue Microbial Mats. *Front Microbiol*, 8, 2619. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312277>

- Berrada, I., Willems, A., De Vos, P., El Fahime, E., Swings, J., Bendaou, N., et al. (2012). Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), 2419-2434.
- Boone, D. R., Whitman, W. B., & Rouvière, P. (1993). Diversity and Taxonomy of Methanogens. In J. G. Ferry (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics* (pp. 35-80). Boston, MA: Springer US.
- Breithaupt, H. (2001). The hunt for living gold. The search for organisms in extreme environments yields useful enzymes for industry. *EMBO Rep*, 2(11), 968-971. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713183>
- Bullock, C. (2000). The Archaea-a biochemical perspective. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28(4), 186-191.
- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H., & Dyall-Smith, M. L. (2004). Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl Environ Microbiol*, 70(9), 5258-5265. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345408>
- Casanueva, A., Galada, N., Baker, G. C., Grant, W. D., Heaphy, S., Jones, B., et al. (2008). Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles*, 12(5), 651-656. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18553053>
- Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Hug, L. A., Brown, C. T., Wilkins, M. J., et al. (2015). Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol*, 25(6), 690-701. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25702576>
- Centeno, C. M., Legendre, P., Beltran, Y., Alcantara-Hernandez, R. J., Lidstrom, U. E., Ashby, M. N., & Falcon, L. I. (2012). Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol*, 82(3), 724-735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22775797>
- Cerritos, R., Eguarte, L. E., Avitia, M., Siefert, J., Travisano, M., Rodriguez-Verdugo, A., & Souza, V. (2011). Diversity of culturable thermo-resistant aquatic bacteria along an environmental gradient in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(2), 303-318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711674>
- Chen, W. P., & Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 21(9), 2260. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8502576
- Coker, J. A. (2016). Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Res*, 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019700>
- Colwell, R. K., & Elsensohn, J. E. (2014). EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with non - parametric extrapolation. *Ecography*, 37(6), 609-613.
- Corinaldesi, C., Damiani, E., Marcellini, F., Falugi, C., Tiano, L., Bruge, F., & Danovaro, R. (2017). Sunscreen products impair the early developmental stages

- of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Sci Rep*, 7(1), 7815. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28798318>
- Coveley, S., Elshahed, M. S., & Youssef, N. H. (2015). Response of the rare biosphere to environmental stressors in a highly diverse ecosystem (Zodletone spring, OK, USA). *PeerJ*, 3, e1182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312178>
- da Costa, M. S., Santos, H., & Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 61, 117-153. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9670799>
- Danson, M. J., & Hough, D. W. (1992). The enzymology of archaeobacterial pathways of central metabolism. *Biochem Soc Symp*, 58, 7-21.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2012). Halophiles. In *eLS*.
- De Anda, V., Zapata-Penasco, I., Blaz, J., Poot-Hernandez, A. C., Contreras-Moreira, B., Gonzalez-Laffitte, M., et al. (2018). Understanding the Mechanisms Behind the Response to Environmental Perturbation in Microbial Mats: A Metagenomic-Network Based Approach. *Front Microbiol*, 9, 2606. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30555424>
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Rep*, 15(5), 508-517. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671034>
- Deming, J. W. (2009). Extremophiles: Cold Environments. *Encyclopedia of Microbiology*.
- Dominguez-Escobar, J., Beltran, Y., Bergman, B., Diez, B., Ininbergs, K., Souza, V., & Falcon, L. I. (2011). Phylogenetic and molecular clock inferences of cyanobacterial strains within Rivulariaceae from distant environments. *FEMS Microbiol Lett*, 316(2), 90-99. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208268>
- Dufrene, M., & Legendre, P. (1997). Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological Monographs*, 67(3).
- Dumorne, K., Cordova, D. C., Astorga-Elo, M., & Renganathan, P. (2017). Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27(4), 649-659. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104900>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(8), 135. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27344438>
- Edwards, H. G., Mohsin, M. A., Sadooni, F. N., Nik Hassan, N. F., & Munshi, T. (2006). Life in the sabkha: Raman spectroscopy of halotrophic extremophiles of relevance to planetary exploration. *Anal Bioanal Chem*, 385(1), 46-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16607492>
- Elcock, A. H., & McCammon, J. A. (1998). Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J Mol Biol*, 280(4), 731-748. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9677300>
- Elleuche, S., Schroder, C., Sahn, K., & Antranikian, G. (2014). Extremozymes--biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 29, 116-123. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780224>
- Elser, J. J., Schampel, J. H., Garcia-Pichel, F., Wade, B. D., Souza, V., Eguiarte, L., et al. (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1808-1825.

- Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol*, 15(12), 711-723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29123225>
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nat Rev Microbiol*, 17(4), 219-232. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30664670>
- Falb, M., Muller, K., Konigsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., et al. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*, 12(2), 177-196. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278431>
- Farias, M. E., Rasuk, M. C., Gallagher, K. L., Contreras, M., Kurth, D., Fernandez, A. B., et al. (2017). Prokaryotic diversity and biogeochemical characteristics of benthic microbial ecosystems at La Brava, a hypersaline lake at Salar de Atacama, Chile. *PLoS One*, 12(11), e0186867. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140980>
- Fernandez, A. B., Rasuk, M. C., Visscher, P. T., Contreras, M., Novoa, F., Poire, D. G., et al. (2016). Microbial Diversity in Sediment Ecosystems (Evaporites Domes, Microbial Mats, and Crusts) of Hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol*, 7, 1284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27597845>
- Fernandez, L., Rodriguez, A., & Garcia, P. (2018). Phage or foe: an insight into the impact of viral predation on microbial communities. *ISME J*, 12(5), 1171-1179. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371652>
- Forterre, P., Gribaldo, S., & Brochier-Armanet, C. (2009). Happy together: genomic insights into the unique Nanoarchaeum/Ignicoccus association. *J Biol*, 8(1), 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19216728>
- Franzmann, P. D., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J. K., Cameron, D. E., Stevenson, P. L., et al. (1988). Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a Halophilic Bacterium Isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 11(1), 20-27.
- Fukuchi, S., Yoshimune, K., Wakayama, M., Moriguchi, M., & Nishikawa, K. (2003). Unique Amino Acid Composition of Proteins in Halophilic Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 327(2), 347-357.
- Garcia-Maldonado, J. Q., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Bebout, B. M., Sanchez-Flores, A., & Lopez-Cortes, A. (2018). Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporites, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments. *Extremophiles*, 22(6), 903-916. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30120599>
- Giani, M., Garbayo, I., Vilchez, C., & Martinez-Espinosa, R. M. (2019). Haloarchaeal Carotenoids: Healthy Novel Compounds from Extreme Environments. *Mar Drugs*, 17(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31500208>
- Gribaldo, S., Forterre, P., & Brochier-Armanet, C. (2011). Archaea and the tree of life. *Res Microbiol*, 162(1), 1-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145391>
- Gulbudak, H., & Weitz, J. S. (2016). A touch of sleep: biophysical model of contact-mediated dormancy of archaea by viruses. *Proc Biol Sci*, 283(1839). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683365>

- Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., et al. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(48), 18296-18301. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114289>
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, *4*(1), 9.
- Han, H., Ling, Z., Khan, A., Virk, A. K., Kulshrestha, S., & Li, X. (2019). Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. *Bioresour Technol*, *279*, 350-361. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30755321>
- Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D., & Cockell, C. S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol*, *21*(4), 204-212. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453124>
- Hartman, A. L., Norais, C., Badger, J. H., Delmas, S., Haldenby, S., Madupu, R., et al. (2010). The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS One*, *5*(3), e9605. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20333302>
- Hedi, A., Sadfi, N., Fardeau, M. L., Rebib, H., Cayol, J. L., Ollivier, B., & Boudabous, A. (2009). Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *Int J Microbiol*, *2009*, 731786. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066169>
- Henneman, B., van Emmerik, C., van Ingen, H., & Dame, R. T. (2018). Structure and function of archaeal histones. *PLoS Genet*, *14*(9), e1007582. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30212449>
- Higgins, D. G. (1994). CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods Mol Biol*, *25*, 307-318. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8004173>
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., et al. (2016). A new view of the tree of life. *Nat Microbiol*, *1*, 16048. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572647>
- Hugoni, M., Taib, N., Debroas, D., Domaizon, I., Jouan Dufournel, I., Bronner, G., et al. (2013). Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(15), 6004-6009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536290>
- Hwang, J., Park, S. Y., Park, M., Lee, S., & Lee, T. K. (2017). Seasonal Dynamics and Metagenomic Characterization of Marine Viruses in Goseong Bay, Korea. *PLoS One*, *12*(1), e0169841. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122030>
- Irimia, A., Madern, D., Zaccai, G., & Vellieux, F. M. D. (2004). Methanoarchaeal sulfolactate dehydrogenase: prototype of a new family of NADH-dependent enzymes. *The EMBO Journal*, *23*(6), 1234-1244.
- Jaakkola, S. T., Ravantti, J. J., Oksanen, H. M., & Bamford, D. H. (2016). Buried Alive: Microbes from Ancient Halite. *Trends Microbiol*, *24*(2), 148-160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796472>
- Jarrell, K. F., Walters, A. D., Bochiwal, C., Borgia, J. M., Dickinson, T., & Chong, J. P. (2011). Major players on the microbial stage: why archaea are important.

- Microbiology*, 157(Pt 4), 919-936.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330437>
- Javor, B. (1989). *Hypersaline Environments*.
- Joint, I., Henriksen, P., Garde, K., & Riemann, B. (2002). Primary production, nutrient assimilation and microzooplankton grazing along a hypersaline gradient. *FEMS Microbiol Ecol*, 39(3), 245-257.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709204>
- Jones, S. E., & Lennon, J. T. (2010). Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), 5881-5886.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231463>
- Jones, W. J., Nagle, D. P., Jr., & Whitman, W. B. (1987). Methanogens and the diversity of archaebacteria. *Microbiol Rev*, 51(1), 135-177.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3104748>
- Karthikeyan, P., Bhat, S. G., & Chandrasekaran, M. (2013). Halocin SH10 production by an extreme haloarchaeon Natrinema sp. BTSH10 isolated from salt pans of South India. *Saudi J Biol Sci*, 20(2), 205-212.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23961237>
- Kates, M. (1992). Archaebacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochem Soc Symp*, 58, 51-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445410>
- Kelly, S. A., Magill, D. J., Megaw, J., Skvortsov, T., Allers, T., McGrath, J. W., et al. (2019). Characterisation of a solvent-tolerant haloarchaeal (R)-selective transaminase isolated from a Triassic period salt mine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(14), 5727-5737.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31123770>
- Kerker, S. (2004). Ecology of Hypersaline Microorganisms. *Marine Microbiology*.
- Khanafari, A., Khavarinejad, D., & Mashinchian, A. . (2010). Solar salt lake as natural environmental source for extraction haophilic pigments. *Iranian journal of microbiology*, 2(2), 7.
- Kirtel, O., Versluys, M., Van den Ende, W., & Toksoy Oner, E. (2018). Fructans of the saline world. *Biotechnol Adv*, 36(5), 1524-1539.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29935267>
- Kumar, L., Awasthi, G. and Singh B. (2011). Extremophiles: A Novel Source of Industrially Important Enzymes. *Biotechnology*, 10(2), 14.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004904>
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., & Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(13), 5768-5772.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7597027>
- Lenton, T. M., & Daines, S. J. (2017). Matworld - the biogeochemical effects of early life on land. *New Phytol*, 215(2), 531-537.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27883194>
- Litchfield, C. D. (2002). Halophiles. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28(1), 21-22.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11938467>
- Liu, Y., Beer, L. L., & Whitman, W. B. (2012). Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environ Microbiol*, 14(10), 2632-2644.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22626264>

- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci*, 1125, 171-189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378594>
- Lopez-Garcia, P., & Moreira, D. (2019). Eukaryogenesis, a syntrophy affair. *Nat Microbiol*, 4(7), 1068-1070. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31222170>
- Lopez-Lozano, N. E., Eguiarte, L. E., Bonilla-Rosso, G., Garcia-Oliva, F., Martinez-Piedragil, C., Rooks, C., & Souza, V. (2012). Bacterial communities and the nitrogen cycle in the gypsum soils of Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila: a Mars analogue. *Astrobiology*, 12(7), 699-709. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920518>
- Low-Decarie, E., Fussmann, G. F., Dumbrell, A. J., & Bell, G. (2016). Communities that thrive in extreme conditions captured from a freshwater lake. *Biol Lett*, 12(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27601726>
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(27), 11436-11440. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592124>
- Lynch, M. D., & Neufeld, J. D. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol*, 13(4), 217-229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25730701>
- Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., & Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: life in saline environments. *Appl Environ Microbiol*, 76(21), 6971-6981. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817804>
- Macelroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1), 74-75.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G., Brock, T. D., Fernández, C. R., & Pérez, M. S. (2004). *Brock biología de los microorganismos*: Pearson Educación.
- Mancinelli, R. L., Fahlen, T. F., Landheim, R., & Klovstad, M. R. (2004). Brines and evaporites: analogs for Martian life. *Advances in Space Research*, 33(8), 1244-1246.
- Mancinelli, R. L., & Hochstein, L. I. (1986). The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 35, 55-58. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11542048>
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83. journal article. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Marx, J.-C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., & Gerday, C. (2007). Cold-Adapted Enzymes from Marine Antarctic Microorganisms. *Marine Biotechnology*, 9(3), 293-304. journal article. <https://doi.org/10.1007/s10126-006-6103-8>
- Mehta, M. P., & Baross, J. A. (2006). Nitrogen fixation at 92 degrees C by a hydrothermal vent archaeon. *Science*, 314(5806), 1783-1786. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170307>
- Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Si Bachir, A., et al. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiol Res*, 207, 289-298. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29458865>

- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Front Microbiol*, *10*, 780. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037068>
- Metcalf, W. W., Griffin, B. M., Cicchillo, R. M., Gao, J., Janga, S. C., Cooke, H. A., et al. (2012). Synthesis of methylphosphonic acid by marine microbes: a source for methane in the aerobic ocean. *Science*, *337*(6098), 1104-1107. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936780>
- Miller-Coleman, R. L., Dodsworth, J. A., Ross, C. A., Shock, E. L., Williams, A. J., Hartnett, H. E., et al. (2012). Korarchaeota diversity, biogeography, and abundance in Yellowstone and Great Basin hot springs and ecological niche modeling based on machine learning. *PLoS One*, *7*(5), e35964. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574130>
- Minelli, A. (2005). Diversity of Life. In *eLS*.
- Moissl-Eichinger, C., Mei, Y., Liu, H., Zhang, S., Yang, M., Hu, C., et al. (2017). Effects of salinity on the cellular physiological responses of *Natrinema* sp. J7-2. *PLoS One*, *12*(9).
- Moreno-Letelier, A., Olmedo-Alvarez, G., Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2012). Divergence and phylogeny of Firmicutes from the Cuatro Ciénegas Basin, Mexico: a window to an ancient ocean. *Astrobiology*, *12*(7), 674-684. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920517>
- Mukherjee, A., Wheaton, G. H., Counts, J. A., Ijeomah, B., Desai, J., & Kelly, R. M. (2017). VapC toxins drive cellular dormancy under uranium stress for the extreme thermoacidophile *Metallosphaera prunae*. *Environ Microbiol*, *19*(7), 2831-2842. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585353>
- Mullakhanbhai, M. F., & Larsen, H. (1975). *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol*, *104*(3), 207-214. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1190944>
- Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O'Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., et al. (2013). Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol Mol Biol Rev*, *77*(3), 342-356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24006468>
- Newsom, H. E., Hagerty, J. J., & Thorsos, I. E. (2001). Location and sampling of aqueous and hydrothermal deposits in martian impact craters. *Astrobiology*, *1*(1), 71-88. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448996>
- Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., et al. (2001). Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *Journal of Biotechnology*, *88*(2), 141-149.
- Olsen, G. J., Woese, C. R., & Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*, *176*(1), 1-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282683>
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev*, *63*(2), 334-348. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357854>
- Oren, A. (2014). Halophilic archaea on Earth and in space: growth and survival under extreme conditions. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, *372*(2030). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368347>

- Oren, A., Eleri, R., Watanabe, S., Ihara, K., & Corcelli, A. (2002). Halomicrobium mukohataei gen. nov., comb. nov., and emended description of Halomicrobium mukohataei. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 5), 1831-1835. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361294>
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., & Galinski, E. A. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium Salinibacter ruber. *Extremophiles*, 6(6), 491-498. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486458>
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115194>
- Palys, T., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4), 1145-1156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336922>
- Papineau, D., Walker, J. J., Mojzsis, S. J., & Pace, N. R. (2005). Composition and structure of microbial communities from stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4822-4832. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085880>
- Park, B. J., Park, S. J., Yoon, D. N., Schouten, S., Sinninghe Damste, J. S., & Rhee, S. K. (2010). Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 76(22), 7575-7587. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870784>
- Paul, V. G., & Mormile, M. R. (2017). A case for the protection of saline and hypersaline environments: a microbiological perspective. *FEMS Microbiol Ecol*, 93(8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28903468>
- Pedros-Alio, C., Calderon-Paz, J. I., MacLean, M. H., Medina, G., Marrase, C., Gasol, J. M., & Guixa-Boixereu, N. (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol*, 32(2), 143-155. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817867>
- Peimbert, M., Alcaraz, L. D., Bonilla-Rosso, G., Olmedo-Alvarez, G., Garcia-Oliva, F., Segovia, L., et al. (2012). Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress. *Astrobiology*, 12(7), 648-658. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920515>
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol*, 14(3), 300-306. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546306>
- Petitjean, C., Deschamps, P., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., & Brochier-Armanet, C. (2015). Extending the conserved phylogenetic core of archaea disentangles the evolution of the third domain of life. *Mol Biol Evol*, 32(5), 1242-1254. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660375>
- Pfeifer, F., & Blaseio, U. (1989). Insertion elements and deletion formation in a halophilic archaeobacterium. *Journal of bacteriology*, 171(9), 5135-5140.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol*, 33(3), 183-209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653987>
- Pimenov, N. V., Rusanov, I. I., Poglazova, M. N., Mityushina, L. L., Sorokin, D. Y., Khmelenina, V. N., & Trotsenko, Y. A. (1997). Bacterial mats on coral-like

- structures at methane seeps in the Black Sea. *Microbiology*, 66(3), 354-360. Article. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0000803704&partnerID=40&md5=9e5c0fade454910a960de6f906b745aa>
- Purdy, K. J., Embley, T. M., Takii, S., & Nedwell, D. B. (1996). Rapid Extraction of DNA and rRNA from Sediments by a Novel Hydroxyapatite Spin-Column Method. *Appl Environ Microbiol*, 62(10), 3905-3907. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535431>
- Quadri, I., Hassani, II, l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacene, H., & Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiol Res*, 186-187, 119-131. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27242149>
- Raghavan, T. M., & Furtado, I. (2005). Expression of carotenoid pigments of haloarchaeal cultures exposed to aniline. *Environ Toxicol*, 20(2), 165-169. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793825>
- Rampelotto, P. H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel)*, 3(3), 482-485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369817>
- Rebollar, E. A., Avitia, M., Eguiarte, L. E., Gonzalez-Gonzalez, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., & Souza, V. (2012). Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environ Microbiol*, 14(9), 2323-2333. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639906>
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J. F., et al. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), 431-437. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851394>
- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176595>
- Robertson, C. E., Spear, J. R., Harris, J. K., & Pace, N. R. (2009). Diversity and stratification of archaea in a hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol*, 75(7), 1801-1810. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114531>
- Robinson, J. L., Pyzyna, B., Atrasz, R. G., Henderson, C. A., Morrill, K. L., Burd, A. M., et al. (2005). Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family halobacteriaceae) as revealed by arrhenius plots. *J Bacteriol*, 187(3), 923-929. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659670>
- Rodrigo-Banos, M., Garbayo, I., Vilchez, C., Bonete, M. J., & Martinez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology. *Mar Drugs*, 13(9), 5508-5532. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26308012>
- Rodrigues-Oliveira, T., Belmok, A., Vasconcellos, D., Schuster, B., & Kyaw, C. M. (2017). Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Front Microbiol*, 8, 2597. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312266>
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1980). Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. *Can J Microbiol*, 26(11), 1259-1263. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7214216>
- Rodriguez-Verdugo, A., Souza, V., Eguiarte, L. E., & Escalante, A. E. (2012). Diversity across Seasons of Culturable *Pseudomonas* from a Desiccation Lagoon in Cuatro

- Cienegas, Mexico. *Int J Microbiol*, 2012, 201389. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093963>
- Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234023>
- Saghai, A., Gutierrez-Preciado, A., Deschamps, P., Moreira, D., Bertolino, P., Ragon, M., & Lopez-Garcia, P. (2017). Unveiling microbial interactions in stratified mat communities from a warm saline shallow pond. *Environ Microbiol*, 19(6), 2405-2421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28489281>
- Sarmiento, F., Peralta, R., & Blamey, J. M. (2015). Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Front Bioeng Biotechnol*, 3, 148. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26539430>
- Schleper, C. (2010). Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea? *ISME J*, 4(9), 1092-1094. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631805>
- Schleper, C., Jurgens, G., & Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol*, 3(6), 479-488. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931166>
- Schocke, L., Brasen, C., & Siebers, B. (2019). Thermoacidophilic Sulfolobus species as source for extremozymes and as novel archaeal platform organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 59, 71-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30875666>
- Seegerer, A. H., Burggraf, S., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Pley, U., & Stetter, K. O. (1993). Life in hot springs and hydrothermal vents. *Orig Life Evol Biosph*, 23(1), 77-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536528>
- Sexton, J. P., Hangartner, S. B., & Hoffmann, A. A. (2014). Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common? *Evolution*, 68(1), 1-15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111567>
- Shade, A., Jones, S. E., Caporaso, J. G., Handelsman, J., Knight, R., Fierer, N., & Gilbert, J. A. (2014). Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio*, 5(4), e01371-01314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028427>
- Shade, A., McManus, P. S., & Handelsman, J. (2013). Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. *MBio*, 4(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443006>
- Shand, R., & Leyva, K. (2008). Archaea: new models for prokaryotic biology.
- Sleep, N. H. (2010). The Hadean-Archaeon environment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6), a002527. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516134>
- Souza, V., & Eguiarte, L. E. (2018). In the Beginning, There Was Fire: Cuatro Ciénegas Basin (CCB) and the Long History of Life on Earth. In V. Souza, G. Olmedo-Álvarez, & L. E. Eguiarte (Eds.), *Cuatro Ciénegas Ecology, Natural History and Microbiology* (pp. 21-33). Cham: Springer International Publishing.
- Souza, V., Eguiarte, L. E., Siefert, J., & Elser, J. J. (2008). Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nat Rev Microbiol*, 6(7), 559-564. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18521074>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., et al. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17), 6565-6570. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618921>

- Souza, V., Moreno-Letelier, A., Travisano, M., Alcaraz, L. D., Olmedo, G., & Eguiarte, L. E. (2018). The lost world of Cuatro Ciénegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis. *Elife*, 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30457104>
- Spang, A., Caceres, E. F., & Ettema, T. J. G. (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science*, 357(6351). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28798101>
- Spear, J. R., Walker, J. J., McCollom, T. M., & Pace, N. R. (2005). Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7), 2555-2560. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671178>
- Spring, S., Scheuner, C., Lapidus, A., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Tice, H., et al. (2010). The genome sequence of *Methanohalophilus mahii* SLP(T) reveals differences in the energy metabolism among members of the Methanosarcinaceae inhabiting freshwater and saline environments. *Archaea*, 2010, 690737. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21234345>
- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett*, 452(1-2), 22-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10376671>
- Sun, Y., Liu, Y., Pan, J., Wang, F., & Li, M. (2019). Perspectives on Cultivation Strategies of Archaea. *Microb Ecol*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31432245>
- Szynkiewicz, A., Ewing, R. C., Moore, C. H., Glamoclija, M., Bustos, D., & Pratt, L. M. (2010). Origin of terrestrial gypsum dunes—Implications for Martian gypsum-rich dunes of Olympia Undae. *Geomorphology*, 121(1-2), 69-83.
- Taboada, B., Isa, P., Gutierrez-Escolano, A. L., Del Angel, R. M., Ludert, J. E., Vazquez, N., et al. (2018). The Geographic Structure of Viruses in the Cuatro Ciénegas Basin, a Unique Oasis in Northern Mexico, Reveals a Highly Diverse Population on a Small Geographic Scale. *Appl Environ Microbiol*, 84(11). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29625974>
- Takai, K., & Horikoshi, K. (1999). Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics*, 152(4), 1285-1297. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430559>
- Tessler, M., Neumann, J. S., Afshinnekoo, E., Pineda, M., Hersch, R., Velho, L. F. M., et al. (2017). Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. *Sci Rep*, 7(1), 6589. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28761145>
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, 6(8), 579-591. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18587410>
- Tindall, K. R., & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27(16), 6008-6013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2847780>
- Valentine, D. L. (2007). Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Microbiol*, 5(4), 316-323. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334387>
- van de Vossenberg, J. L. C. M., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (1998). The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*, 2(3), 163-170.

- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylo-trophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, 1(12), 16170. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170>
- Velez, P., Gasca-Pineda, J., Rosique-Gil, E., Eguiarte, L. E., Espinosa-Asuar, L., & Souza, V. (2016). Microfungal oasis in an oligotrophic desert: diversity patterns and community structure in three freshwater systems of Cuatro Ciénegas, Mexico. *PeerJ*, 4, e2064. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280070>
- Verhees, C. H., Kengen, S. W., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W., De Vos, W. M., & Van Der Oost, J. (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J*, 375(Pt 2), 231-246. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12921536>
- Visweswaran, G. R., Dijkstra, B. W., & Kok, J. (2011). Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea--a comparative view. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92(5), 921-928. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012341>
- Vogt, J. C., Abed, R. M. M., Albach, D. C., & Palinska, K. A. (2018). Bacterial and Archaeal Diversity in Hypersaline Cyanobacterial Mats Along a Transect in the Intertidal Flats of the Sultanate of Oman. *Microb Ecol*, 75(2), 331-347. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28736793>
- Winter, C., Bouvier, T., Weinbauer, M. G., & Thingstad, T. F. (2010). Trade-offs between competition and defense specialists among unicellular planktonic organisms: the "killing the winner" hypothesis revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(1), 42-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197498>
- Wolaver, B. D., Crossey, L. J., Karlstrom, K. E., Banner, J. L., Cardenas, M. B., Ojeda, C. G., & Sharp, J. M. (2013). Identifying origins of and pathways for spring waters in a semiarid basin using He, Sr, and C isotopes: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Geosphere*, 9(1), 113-125.
- Yachi, S., & Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4), 1463-1468. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990046>
- Yang, J., Ma, L., Jiang, H., Wu, G., & Dong, H. (2016). Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Sci Rep*, 6, 25078. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113678>