

Los ambientes hipersalinos como fuentes naturales de microbios con aplicaciones potenciales en biotecnología: el caso de los sistemas de evaporación solar para producir sal en la provincia de Alicante (España)

NOTA: el presente texto es una traducción literal del documento original publicado en *Current Research in Microbial Sciences*, 100136, con el título *Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: the case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County*

Resumen

Los microorganismos extremófilos muestran un metabolismo único debido a las adaptaciones que muestran para lidiar con parámetros ambientales extremos que caracterizan los ecosistemas extremos que habitan (alta concentración de sal, altas temperaturas y valores de pH extremos, alta exposición a la radiación solar, etc.). Los microorganismos halófilos caracterizados y aislados de marismas, salmueras, estanques salados, lagunas saladas, etc. han llamado la atención recientemente debido a sus posibles aplicaciones biotecnológicas (como células enteras utilizadas para diferentes propósitos, como tratamientos de aguas residuales, o sus biomoléculas: enzimas, antibióticos, carotenoides, bioplásticos). La provincia de Alicante (sureste de España) concentra un número importante de ambientes salinos como balsas saladas costeras o interiores de donde se obtiene el cloruro de sodio (NaCl), marismas, lagunas saladas, etc. El mejor sistema caracterizado hasta el momento desde el punto de vista microbiológico son las “Salinas de Santa Pola”, también denominadas “Salinas Bras del Port”. Sin embargo, existen muchos otros ambientes salados por explorar, como el parque natural de Torrevieja y las lagunas de la Mata y Torrevieja, la laguna salada situada en la ciudad de Calpe o las balsas saladas interiores como las situadas en el noroeste de la comarca. Este trabajo de revisión sistemática de investigaciones realizadas hasta la fecha resume las aplicaciones biotecnológicas más relevantes de los microorganismos halófilos descritas hasta el momento. Además, se presta especial atención a ecosistemas como las lagunas de Torrevieja o las marismas interiores como entornos naturales cuya biodiversidad microbiana merece ser estudiada en busca de nuevas cepas y especies con el objetivo de analizar sus posibles aplicaciones biotecnológicas (farmacéuticas, alimentarias industria, biomedicina, etc.).

1. Introducción

Los "ambientes hipersalinos" son aquellos con concentraciones de sal más altas que el agua de mar (alrededor del 3,5 % p/v en agua de mar frente a hasta el 35 % p/v en salmuera). Este tipo de ambiente incluye ecosistemas como lagos interiores, lagunas, salinas, pantanos o lagunas saladas costeras/interiores y son relativamente abundantes y extendidos en países como Estados Unidos de América, Mozambique, Argelia, España o Canadá (Mcgenity y Oren, 2012).

La mayor parte del conocimiento sobre los ecosistemas hipersalinos se ha obtenido de las salinas del Mediterráneo o de los lagos interiores de países como Israel o España. Así, salinas como las situadas en el sur y sureste de España (provincias de Alicante, Murcia o Huelva) presentan características favorables para su extenso estudio: fácil accesibilidad a estos ambientes, un claro gradiente de agua de mar a saturación salina que permite realizar estudios de microorganismos en cada localidad, salinidad constante de cada estanque, etc. (Casamayor *et al.*, 2002).

Algunos ambientes naturales caracterizados por una alta salinidad se han utilizado durante siglos para obtener NaCl y otras sales, que luego se utilizan para diferentes propósitos. A lo largo de

los siglos, el ser humano ha optimizado la extracción de sal, no solo en la costa, sino también en el interior, con el objetivo de extraer NaCl para cocinar, almacenar alimentos, mantener las carreteras en invierno o para ser utilizado en formulaciones químicas. Las plataformas de producción salina generalmente se organizan en múltiples estanques de producción que van desde agua de mar hasta sal saturada; en estos estanques poco profundos, el agua se transfiere periódicamente desde estanques de menor salinidad, llamados concentradores o calentadores, a estanques llamados "cristalizadores" en los que precipitan las sales (Ventosa *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta los gradientes de sal en estanques poco profundos para la producción de NaCl en sistemas de evaporación solar, esta revisión resume el conocimiento actual sobre la diversidad microbiana en las salmueras, sus adaptaciones moleculares a la alta concentración de sal y las posibles aplicaciones en biotecnología de microorganismos halófilos, así como de sus biomoléculas. También se discute la relevancia de los ecosistemas salinos ubicados en el sureste de España como fuentes naturales a partir de las cuales se podrían aislar nuevas especies y cepas microbianas. Se presta especial atención a aquellos ecosistemas halófilos situados en la Provincia de Alicante (España).

2. Los ecosistemas salinos como fuentes naturales de microorganismos con aplicaciones potenciales en biotecnología: el caso de la Provincia de Alicante (España)

Las salinas costeras e interiores son ecosistemas naturales hipersalinos que ocupan grandes extensiones del sureste de España en general y de la provincia de Alicante en particular. Estos ecosistemas pueden estar formados por i) lagunas naturales saladas, ii) por una mezcla de lagunas naturales y estanques artificiales, o iii) por estanques artificiales que se alimentan con agua de mar o salmuera (agua con alta concentración de sal). La salmuera se extrae habitualmente por bombeo de acuíferos salinos (como es el caso de las salinas interiores de la comarca del Alto Vinalopó, en el municipio de Villena, provincia de Alicante: N 38° 38'11"/W 0° 51'58") o de elementos geológicos singulares como el Cabezo de la Sal de Pinoso (N 38° 24'14,5"/W 1° 02' 11,4"; declarado en octubre de 2021 por el Ayuntamiento como monumento natural).

La salina solar "La Mata-Torre Vieja" es un sistema formado por dos grandes lagunas (N 38° 01'00"/W 0° 39'00") (Fig. 1). La laguna de La Mata funciona como un gran calentador, y la laguna de Torre Vieja se comporta como un gran cristizador. La laguna de La Mata está comunicada con el mar por un canal que permite la entrada de agua de mar para la preconcentración de sal. Ambas lagunas están conectadas entre sí por el canal de las Salinas. La laguna de Torre Vieja recibe agua salina de la laguna de La Mata y aguas salobres del lavado de sal de la salmuera del Cabezo de la Sal a través de una "salmuera". De esta forma, la producción de sal en la laguna de Torre Vieja es posible gracias tanto a la salmuera del Cabezo de la Sal (situado en el municipio de Pinoso) como al agua de mar (Fig. 1).

Otro ejemplo relevante de ambiente hipersalino situado en el sureste de España son las "salinas solares de Santa Pola" (N38° 11'05" / W0° 37'46"). Este es un típico sistema de salina solar de estanques múltiples con un gradiente de salinidad discontinuo. La concentración de sal se mantiene constante en cada estanque individual mediante un flujo artificial regulado. Estos entornos han centrado la atención de tres grupos, principalmente desde hace décadas: profesionales de la gestión local a nivel de municipios y gobiernos regionales; profesionales de la gestión ambiental y turística; y agentes relacionados con la minería.

Finalmente, otro importante ecosistema salino cercano a Santa Pola es el "Parque Natural El Hondo" (N38° 10'55' 'N/W0° 45'09' '), un espacio natural protegido español situado entre los municipios de Crevillente y Elche. El parque natural de El Hondo, junto con el de las Salinas de Santa Pola, forma parte de la cuenca hidrográfica del río Bajo Vinalopó.

Desde el punto de vista de la administración local, estos ecosistemas forman parte de territorios que suelen tener una protección especial por sus características únicas y su biodiversidad, que está muy adaptada a condiciones de estrés (altas concentraciones de sal, baja disponibilidad de agua y oxígeno, alta radiación solar, pH alcalino en la mayoría de los casos). Este es el caso de los ecosistemas ubicados en Torrevieja y Santa Pola, ambos protegidos como parques naturales: Parque Natural de las Lagunas de La Mata y Torrevieja y el Parque Natural de las Salinas de Santa Pola (también denominado "Salinas Bras del Port"). Las lagunas de Santa Pola constituyen uno de los sistemas salinos mejor estudiados del mundo, tanto desde el punto de vista minero y turístico como desde el punto de vista microbiológico y ecológico (Ventosa *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2010; Mojica *et al.*, 2000). En relación con la minería, estos ecosistemas, particularmente las lagunas de precipitación de sal, son herramientas fundamentales para la obtención de sal, que luego se utiliza para el consumo humano, la conservación de alimentos, la formulación de compuestos cosméticos o el mantenimiento de caminos en invierno. Cabe señalar que la Comunidad Valenciana ocupa uno de los primeros lugares en producción de sal de España y el primero en sal marina, siendo las salinas de Bras del Port y las de Torrevieja (ambas en la provincia de Alicante), las que más aportan a esta producción en Europa. En cuanto a la gestión ambiental y turística, actividades como el avistamiento de aves migratorias, o la realización de baños en marismas y lagunas saladas, atraen desde hace años a un importante número de turistas, ecoturistas, ecologistas y naturistas (Mateo *et al.*, 1997).

Las décadas de 1970 y 1980 fueron un punto de inflexión en la forma de ver estas salmueras y, por extensión, los ecosistemas extremófilos representados por marismas y lagunas, tanto costeras como continentales. Era una época en la que biólogos de diversas especialidades intuían que la abundancia y diversidad microbiana de las salmueras podía ser mucho más rica de lo previsto inicialmente. Así, ha comenzado una nueva era en el estudio de la microbiología de los ambientes hipersalinos. En el caso concreto de la provincia de Alicante, los primeros estudios sobre la microbiología de las salinas de Bras del Port (Santa Pola) datan de la década de los 80, estudios liderados por investigadores adscritos en ese momento a la Universidad de Alicante.

Años más tarde, en paralelo a otros estudios realizados por todo el mundo, también se analizaron desde el punto de vista microbiológico otras salinas del interior de la provincia de Alicante (Saleros de Penalva de Villena, al norte de la provincia de Alicante), encontrando que las salmueras de esta zona (a 60 km de la costa) son de origen marino y la biodiversidad microbiana es similar a la identificada en las salinas de Santa Pola (Zafrilla *et al.*, 2010). Los estudios microbiológicos, bioquímicos y biotecnológicos realizados hasta la fecha sobre muestras de las salinas de Santa Pola y Villena muestran el potencial biotecnológico de determinadas especies microbianas (bacterias, arqueas y microalgas) aisladas de estos ecosistemas. Esas aplicaciones se resumen en la Sección 5.

A pesar de los nuevos descubrimientos sobre la ecología microbiana de estos ecosistemas, así como de las posibles aplicaciones de algunos microorganismos y/o sus moléculas en biotecnología, aún existen muchos ecosistemas hipersalinos en la provincia de

Alicante que no han sido estudiados a nivel microbiológico ni molecular. Así, las salinas costeras de Calpe o las lagunas de La Mata y Torrevieja (que destacan por su tamaño y rendimiento en la producción de sal) no han sido caracterizadas integralmente (lodos, columna de agua, sedimentos, salmueras) ni a nivel fisicoquímico ni a los niveles de microbiología y bioquímica. Asimismo, el parque natural "El Hondo" o las salinas interiores como la Salina Vieja de Villena o las termas saladas denominadas "Salinetes" (situadas entre los municipios de Novelda y Petrer) no han sido caracterizadas hasta la fecha.

3. Microorganismo que habita en ecosistemas hipersalinos

Los microorganismos pertenecientes a los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) se pueden encontrar en ambientes salinos (Oren, 2002). El rasgo principal que los caracteriza es su alto requerimiento de sal para estar vivos. Según él, se clasifican en tres categorías diferentes: halófilos débiles (1-3% NaCl); halófilos moderados (3-15% NaCl); y halófilos extremos (15-30% NaCl). Las poblaciones microbianas en estos ambientes están dominadas por microorganismos halófilos, también considerados poliextremófilos, porque están bien adaptados no solo a estas altas concentraciones de sal, sino también a otros parámetros ambientales extremos como valores de temperatura o pH extremadamente altos y bajos (Bowers *et al.*, 2009).

La concentración media de sal en el agua de mar es del 3,5 % (p/v), mientras que puede alcanzar el 35-40 % (p/v) en estanques salados (concentradores y cristalizadores). A lo largo del gradiente salino que muestran los ambientes costeros hipersalinos, a mayor salinidad, menor diversidad microbiana, pero mayor número de microorganismos procariotas que muestran un perfil halófilo extremo. Así, la abundancia de arqueas halófilas aumenta a medida que el sistema se dirige hacia los cristalizadores, debido al aumento de su salinidad, entre otros factores como la radiación solar (Andrei *et al.*, 2012). Por el contrario, la abundancia de miembros del dominio Bacteria disminuye a lo largo de este gradiente salino, siendo mayor en los calentadores. El número de virus aumenta en los cristalizadores, siendo así un grupo que actúa como controlador poblacional del dominio Archaea (Rodríguez-Varela *et al.*, 2009). Las siguientes subsecciones muestran información relevante sobre las especies microbianas halófilas más abundantes en los sistemas de evaporación solar costeros e interiores que producen sal.

3.1. Dominio de arqueas

Los miembros del dominio Archaea representan las principales poblaciones microbianas en ambientes halofílicos extremos, además de abundantes bacterias como *Salinibacter ruber* (Woese *et al.*, 1990). Las arqueas halófilas extremas se clasifican principalmente dentro del filo Euryarchaeota, clase Halobacteria (Grant *et al.*, 2001; Cavicchioli, 2011). Actualmente, se han caracterizado hasta 260 especies de arqueas halófilas y se han agrupado en 70 géneros (Oren, 2020), tres órdenes y seis familias: orden Halobacteriales (familias *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* y *Halococcaceae*), orden Haloferacales (familias *Haloferacaceae* y *Halorubraceae*) y orden Natribales (familia Natribaceae) (Fig. 2) (Gupta *et al.*, 2016).

Estas especies son, en general, quimioorganoheterótrofos aeróbicos, aunque algunas especies pueden utilizar nitrato (NO_3^-) u otros compuestos como nitrito (NO_2^-), clorato (ClO_3^-) y perclorato (ClO_4^-) como aceptores finales de electrones en un proceso respiratorio anóxico, mostrando así una gran diversidad metabólica. Además, la mayoría de las especies

de arqueas halófilas se caracterizan por su pigmentación anaranjada y roja debido a la presencia de carotenoides, así como proteínas de membrana coloreadas como bacteriorrodopsina, halorrodopsina y otras proteínas retinianas (Andrei *et al.*, 2012).

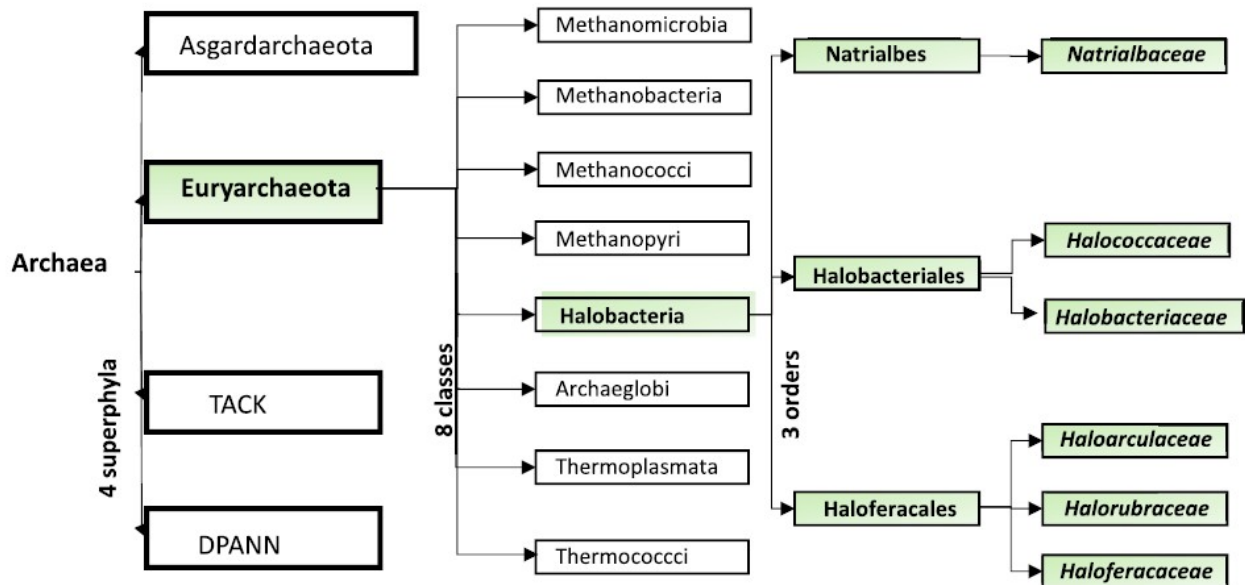


Fig. 2. Resumen de la clasificación actual del dominio Archaea. El color verde resalta los grupos que constituyen las principales poblaciones microbianas en ambientes halofílicos extremos como estanques salados, marismas y lagunas costeras (Adaptado de Gupta *et al.*, 2016). TACK es un grupo de archaea acrónimo o Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Thermoproteota y Korarchaeota, los primeros grupos descubiertos. DPANN es un superfilya de Archaea propuesta por primera vez en 2013 (se les conoce como nanoarchaea o archaea ultrapequeñas debido a su tamaño más pequeño (nanométrico) en comparación con otras archaea).

La haloarquea más abundante es *Haloquadratum walsbyi*, ya que puede constituir hasta el 80% de la población procariótica en muestras de agua cercanas a la saturación (Dyall-Smith *et al.*, 2011). Este microorganismo presenta forma cuadrada o rectangular y sintetiza vesículas de gas y gránulos de polihidroxibutirato (PHA) (Stoeckenius *et al.*, 1981). Su citoplasma está bien adaptado para ser funcional en presencia de altos niveles de cloruro de potasio y requiere una concentración mínima de sal del 14% (p/v), siendo capaz de tolerar altas concentraciones molares de Mg²⁺.

En consecuencia, este microorganismo, así como muchas otras haloarqueas, pueden vivir en situaciones de actividad de agua extremadamente bajas (Bolhuis *et al.*, 2006). El genoma de este microorganismo tiene un contenido de G+C cercano al 48%, porcentaje inferior al del resto de especies de la familia *Halobacteriaceae* (Oren, 2007). Este microorganismo fue aislado simultáneamente en 2007 en Australia (cepa C23T) y España (cepa HBSQ001) (Burns *et al.*, 2007). La secuencia del gen rRNA 16S presentó una gran similitud, con una hibridación del 80%. La principal diferencia entre las dos cepas radica en la estructura de sus paredes celulares (Burns *et al.*, 2007; Falb *et al.*, 2008).

Junto con el género *Haloquadratum*, *Halorubrum* representa el segundo género más abundante perteneciente a la clase *Halobacteria* (Oren, 2020). Algunas especies de este género sintetizan arqueroopsina-3, que es un fotorreceptor que también actúa a través de la energía solar para crear una fuerza motriz de protones necesaria para la síntesis de ATP (Bada *et al.*, 2021). Se han encontrado especies de este género en ambientes salados en diferentes continentes, como África, la Antártida, Asia y América del Norte. El análisis de cristalizadores pertenecientes a las salinas de Santa Pola (España) mostró que 16 de las 17 colonias analizadas pertenecían al género *Halorubrum* (Benlloch *et al.*, 2001). En Isla Cristina, Huelva (España), la mayoría de las secuencias obtenidas por metagenómica estaban relacionadas con este género, y la abundancia de bacteriorrodopsina y halorrodopsina estaba relacionada con la abundancia de las secuencias del gen rRNA 16S (Ferández *et al.*, 2014). El análisis filogenético de muestras de diferentes estanques españoles mostró que las poblaciones de *Halorubrum* experimentan variaciones genómicas rápidas (Mohan *et al.*, 2014).

Especies como *Halorubrum lacusprofundi* no solo están adaptadas a ambientes hipersalinos, sino que también pueden sobrevivir a bajas temperaturas, como las que se encuentran en la Antártida. Esta especie muestra características típicas de microorganismos halófilos, con un alto contenido de G + C, un proteoma ácido y grandes replicones extracromosómicos. Este proteoma ácido permite una formación de proteínas más flexible, que es un requisito clave en entornos de baja temperatura (Anderson *et al.*, 2016).

Finalmente, el género *Haloferax* cobra relevancia en este tipo de ambiente debido a su amplia distribución y versatilidad en cuanto a adaptaciones moleculares. Los miembros de este género se caracterizan por un pleomorfismo extremo y un amplio requerimiento de sal en comparación con el resto de haloarqueas, ya que pueden crecer en presencia de 10 a 35 % de sal (p/v) (D'Souza *et al.*, 1997). Estas especies son Gram negativas y muestran una morfología irregular (bastones, copas o discos). La membrana citoplasmática está recubierta por una capa hexagonal denominada capa S, la cual está formada principalmente por glicoproteínas (Mengele y Samper, 1992). La mayoría de las especies de *Haloferax* presentan metabolismo aeróbico, aunque hay ciertas especies que se comportan como desnitrificantes, utilizando nitrato como aceptor de electrones en condiciones aeróbicas (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2020). Muchas de las especies presentan un interés biotecnológico muy especial ya que pueden producir compuestos poliméricos como materiales de reserva (Lillo *et al.*, 1990). Bajo ciertas condiciones de crecimiento, algunas especies son capaces de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) como copolímero de poli(3-hidroxi)butirato (PHB) y poli(3-hidroxi)butirato-hidroxivalerato (PHBV) (Simó-Cabrera *et al.*, 2021). Como se discutió en la Sección 4, los miembros de *Haloarcula*, *Halorubrum* y *Haloferax* han llamado la atención de los investigadores durante las últimas dos décadas debido a sus posibles aplicaciones biotecnológicas como productores de PHA o carotenoides bajo ciertas condiciones de crecimiento (Asker y Ohta, 2002). Además, algunas haloarqueas son más competitivas en el medio ambiente gracias a la producción de halocinas, pequeñas moléculas que inhiben el crecimiento de otras especies de haloarqueas (Naor *et al.*, 2013).

Se pensaba que las haloarqueas mencionadas anteriormente eran las más abundantes en entornos halofílicos extremos, pero gracias a una investigación masiva basada en la secuenciación, recientemente se ha descubierto un grupo de pequeñas arqueas extremófilas (0,6). Representan un gran porcentaje de la comunidad ($>10^6$ células/mL que representan hasta el 14%) y constituyen un nuevo filo llamado Nanohaloarchaeota (Oren, 2020).

Mediante análisis metagenómicos se han identificado 3 especies del género *Candidatus* de lagos salados y salmueras: *Candidatus nanosalina* y *Candidatus nanosalinicola* del lago Tyrrel (Australia) y *Candidatus haloredivivus* de las salinas de Alicante (España) (Podell *et al.*, 2013; Gomariz *et al.*, 2015). Se han identificado genes de rodopsina en todos los genomas de los miembros de Nanohaloarchaeota, suponiendo que estos genes pueden estar relacionados con el metabolismo fotoheterótrofo (Oren, 2020). Inicialmente se pensó que estos microorganismos podrían vivir libremente en este tipo de ambiente. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que necesitan coexistir con otro tipo de microorganismos. Por ejemplo, *Candidatus antarticus* requiere la presencia de *Halorubrum lacusprofundis* como huésped para su crecimiento (Hamm *et al.*, 2019).

3.2 Dominio bacteriano

La aparición de técnicas moleculares para estudiar los genes 16S rRNA, así como los enfoques de hibridación fluorescente in situ (FISH), permitieron la detección de microorganismos del dominio Bacteria en ambientes hipersalinos, desmantelando la creencia de que estos ambientes sólo estaban habitados por miembros del dominio Archaea (Antón *et al.*, 2000). Así, en ambientes hipersalinos, la abundancia de miembros del dominio Archaea es de alrededor del 70-95 %, mientras que las poblaciones bacterianas representan alrededor del 5-30 % de la comunidad microbiana general (Anton *et al.*, 2008). Las bacterias halófilas representativas más abundantes en este tipo de ambientes corresponden a la especie denominada *Salinibacter ruber*, aunque existen otros géneros menos representados, como *Salisaeta*, *Salicola*, *Halomonas* o *Chromohalobacter* (Antón *et al.*, 2002).

La especie *Salinibacter ruber* pertenece al filo *Bacteroidetes* y generalmente se encuentra en ambientes extremadamente salados como cristalizadores de ambientes salinos. Esta bacteria comparte muchos rasgos fenotípicos con haloarqueas, ya que son extremadamente halófilas, aeróbicas y quimioorganotrofos, además de acumular potasio intracelular como soluto compatible (estrategia salt-in). La gran similitud de este tipo de mecanismo adaptativo entre *S. ruber* y haloarqueas puede deberse principalmente a eventos de transferencia horizontal de genes, debido a procesos evolutivos cercanos en el mismo tipo de ambientes extremos (Anton *et al.*, 2002). Esta bacteria también muestra una coloración rojiza debido a la presencia de pigmentos carotenoides como la salinixantina y pigmentos retinianos como la xantorrodopsina. La salinixantina actúa como una antena de luz que transfiere energía al grupo retinol de la xantorrodopsina, que es una bomba de protones como la bacteriorrodopsina (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Este pigmento también se puede utilizar como biomarcador y varios estudios han demostrado que la presencia de salinixantina puede representar del 5 al 7,5% del contenido total de pigmento de las salmueras naturales (Oren y Rodríguez-Varela, 2001). El proteoma de *S. ruber* también es fuertemente ácido (pI promedio cercano a 5,92) debido a la presencia de un alto contenido de aminoácidos ácidos. La composición lipídica de la membrana de las especies bacterianas halófilas es similar a la del dominio Archaea, mostrando lípidos de tipo haloarqueal como fosfatidilserina, N,N-dimetilfatidiletanolamina o cardiolipina. Este último lípido puede representar hasta un 20% del contenido total de lípidos, lo que puede ser una adaptación a la alta concentración de sal para optimizar el funcionamiento de los sistemas bioenergéticos. Además, un lípido menos común llamado acilhalocapnina también está presente en bacterias halófilas en concentraciones que generalmente están moduladas por las concentraciones de sodio y magnesio del medio ambiente (Oren, 2013).

La mayoría de las enzimas, cuyo principal ejemplo es la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD, requieren concentraciones de sal entre 0,5 y 2 M para una actividad óptima, aunque también funcionan bien a concentraciones más altas (Oren y Mana, 2002). Además, los cambios en la salinidad del medio pueden tener ligeros efectos sobre la composición lipídica de la membrana (Lattanzio *et al.*, 2009). En este descubrimiento, mediante técnicas DGGE (electroforesis en gradiente desnaturizante) se puso de manifiesto la presencia de dos filotipos diferentes, *EBH-1* y *EBH-2*, siendo el primero el más abundante. Posteriormente se han aislado 5 cepas diferentes de este primer filotipo: M1, M8 y M31 (de las salinas de Campos de Mallorca), así como P13 y P18 (de las salinas de Bras del Port en Santa Pola) (Antón *et al.*, 2002).

La gran abundancia de *S. ruber* no solo se ha determinado en España, sino que también forma parte importante de diferentes ambientes en Turquía, Argentina, México, Túnez, Italia e Israel. A pesar de esta gran abundancia de *S. ruber* en casi todos los ambientes salinos, hay zonas donde este dominio no sigue el mismo patrón. En ambientes como el Salar de Maras, estudios han determinado que la bacteria dominante es *Salicola maranensis* (Maturrano *et al.*, 2006).

La familia *Halomonadaceae* (perteneciente al filo *Proteobacteria*) también tiene un especial interés en este tipo de ambientes debido a su adaptación osmótica basada en la acumulación de solutos compatibles como la ectoína. Especies como *Halomonas elongata* pueden crecer en un amplio rango de concentraciones de sal gracias a la producción de solutos compatibles que actúan como estabilizadores enzimáticos y protectores celulares (Schwibbert *et al.*, 2011). Esas moléculas han llamado la atención a nivel mundial gracias a sus potenciales usos industriales (Ventosa *et al.*, 1998).

3.3 Dominio Eukarya

Aunque la diversidad y la abundancia de organismos en el dominio Eukarya disminuyen a medida que aumenta la concentración de sal, algunos organismos pueden vivir y adaptarse a ambientes salados. Las especies pertenecientes al género *Dunaliella* son los organismos eucariotas más abundantes (algas pertenecientes a la clase *Chlorophyceae* y orden *Volvocales*). Estas algas se caracterizan por carecer de la pared celular rígida y por la presencia de una membrana celular externa constituida por glicoproteínas (Polle *et al.*, 2009). Especies del género *Dunaliella* como *Dunaliella salina*, *D. parva*, *D. bardawil*, *D. pseudosalina* y *D. viridis* juegan un papel relevante como productores primarios de biomasa fotosintética en pantanos y lagunas saladas (Polle *et al.*, 2009). Las dos especies que más destacan en este tipo de ambiente son *D. salina* y *D. viridis*, que pueden soportar concentraciones de sal de 9 a 200 g/l hasta la saturación total (Borovkov *et al.*, 2020). La eficiente adaptación de estas especies a los altos niveles de sal (incluso a la saturación completa) les permite dominar el ecosistema al carecer de competidores (Buchheim *et al.*, 2010). Las especies de *Dunaliella* se han vuelto sólidas a nivel industrial y biotecnológico debido a su bajo costo de producción, alta tasa de crecimiento y capacidad de crecer bajo diferentes fuentes de estrés (alta salinidad, alta radiación solar y limitación de nutrientes) (Minhas *et al.*, 2016). Dentro de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de *Dunaliella spp.*, cabe mencionar la producción de carotenos (α -caroteno, all-trans β -caroteno, 9-cis β -caroteno, 15-cis β -caroteno y licopeno), proteínas, ácidos grasos y xantofilas (zeaxantina, luteína, α y β -criptoxantina, violaxantina y equinenona) (Ben-Amotz, 2002).

Artemia salina es también uno de los eucariotas más abundantes en ambientes hipersalinos. Este es un crustáceo micro branquiópodo que suele habitar lagos y lagunas salobres mostrando baja biodiversidad microbiana y una cadena trófica simple (Dhont *et al.*, 2002). *A. salina* muestra varias adaptaciones a altas concentraciones de sal. La principal adaptación a nivel molecular es una alta eficiencia en la osmorregulación (lo que le permite soportar concentraciones diez veces superiores a las del agua de mar) (Clegg *et al.*, 2002) y la capacidad de desarrollar diversidad genética basada en de la región en la que se ubica la especie ("endemismo regional") (Gajardo y Beardmore, 2012). Además, en ambientes donde las lagunas se secan en ciertas etapas, se protege de la extinción quistes que son altamente resistentes a la deshidratación severa (Muñoz *et al.*, 2010). La información genética relacionada con las condiciones ambientales a las que se ha enfrentado previamente la población también se almacena en los quistes (Gajardo y Beardmore, 2012).

Otros componentes del dominio Eukarya, como los hongos, no han sido identificados como componentes relevantes de ambientes hipersalinos. Las especies de hongos más abundantes descritas en ecosistemas hipersalinos son hongos negros y melanizados como *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* y *Trimmatostroma salinum*. Todas estas especies muestran características similares como la presencia de paredes celulares gruesas y melanizadas, crecimiento lento y meristemático, y proliferación con endoconidiación, siendo todas estas características adaptaciones a estos ambientes estresantes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000).

Finalmente, los protistas heterótrofos son un grupo que juega un papel importante en el control de la población en ambientes hipersalinos. La presencia de este tipo de especies se observa principalmente en estanques con concentraciones intermedias de sal (entre 10 y 15% de sal p/v). Generalmente, estas especies son ciliadas o flageladas. Una de las especies de este grupo identificadas en estanques salados es *Halocafeteria seosinensis*, que puede crecer con concentraciones de 15% de sal, aunque tolera hasta el 35%, y actúa como controlador de población (Park *et al.*, 2006). Por otro lado, varios estudios han tratado de relacionar la presencia del protista heterótrofo *Fabrea salina* con el control de la población de *D. salina* en áreas con concentraciones salinas en torno al 9%, aunque aún no ha habido suficiente evidencia que demuestre este control. (Hong y Choi, 2015).

3.4 Halovirus

Los entornos hipersalinos cercanos a la saturación están repletos de los llamados virus extremófilos o halovirus. Se han contado hasta 109 virus en un mililitro de muestra de agua salada (Atanasova *et al.*, 2015) y varios estudios reportan que las poblaciones microbianas en ecosistemas halófilos extremos están bajo control llevado a cabo por estos halovirus (Rodríguez-Varela *et al.*, 2009).

Se han identificado cerca de 100 virus como depredadores de microorganismos halófilos, de los cuales 90 virus infectan haloarchaea, mientras que los 10 restantes son capaces de infectar bacterias o eucariotas (Luk *et al.*, 2014). La clasificación de estos virus se realiza según su morfología, y pertenecen a diferentes familias miovirus (52), sifovirus (20), virus pleomórficos (11), podovirus (5) y virus en forma de limón (1) (Atanasova *et al.*, 2015). Estos virus se caracterizan por tener colas contráctiles (miovirus) o no contráctiles (sifovirus y podovirus) y ADN lineal de doble cadena (Sencilo y Roine, 2014).

En cuanto a las bacterias, se han identificado menos de diez virus capaces de infectar bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Salinivibrio*, *Salisaeta* y *Salicola*. Estos virus generalmente pertenecen a la familia de los miovirus, aunque también se han identificado virus pertenecientes a la familia de los podovirus (Atanasova *et al.*, 2012).

4. Adaptaciones moleculares de microorganismos a ambientes salinos

Los microorganismos que se adaptan a la vida en ambientes extremos, como los ecosistemas salinos extremos, no solo se adaptan a altas concentraciones de sal, sino que también suelen adaptarse a una amplia variedad de factores, como alta irradiación y temperatura, así como baja difusión de oxígeno. La supervivencia en esos ambientes requiere adaptaciones especializadas a nivel celular y enzimático, para preservar el equilibrio osmótico. Este equilibrio es muy importante ya que los microorganismos pueden perder agua, causando marchitamiento y pérdida fatal de la estructura y función celular (Mongodin *et al.*, 2005). Por lo tanto, las proteínas podrían sufrir deshidratación debido a la disminución del contenido de agua dentro de las células, promoviendo interacciones desfavorables que pueden evitarse mediante la modulación de su carga neta. En consecuencia, la principal diferencia entre las proteínas halófilas y las no halófilas es la gran proporción de glutamato y aspartato en la superficie de las proteínas halófilas. Otras características que definen a los microbios halófilos y sus proteínas son un número sustancial de cargas proteicas y la hidrofobicidad de las proteínas en comparación con sus contrapartes bacterianas, así como proteomas ácidos (pI \approx 4,5) o alto contenido de G + C (Edbeib *et al.*, 2016). Las principales adaptaciones moleculares se resumen en la tabla 1 y se explican en detalle en las siguientes secciones.

Table 1
summary of the molecular adaptations showed by the microorganisms to be alive in extreme saline environments.

Environmental parameter	Adaptation	Reference
High salt concentration	Salt-in strategy	Oren, 2000
	Synthesis of compatible solutes	Oren, 2002
Low oxygen availability	Synthesis of bacteriorhodopsin, gas vesicles or denitrification as respiratory pathway.	Hellingwerf, 2002
		Oren 2012
High solar radiation	Capability to regenerate intact chromosomes from dispersed fragments, synthesis of antioxidant enzymes, increase of the [Mn]/[Fe] ratio in the cell, or the production of carotenoids.	Torregrosa-Crespo <i>et al.</i> , 2018
		Soppa, 2014
		Confalonieri and Sommer, 2011
Competition for lack of resources	Indirect approach: microbes compete by nutrients, limiting the availability of nutrients for the rest of the microorganisms. Direct approach: production of toxins and chemicals that inhibit the growth of other microorganisms (bacteriocins, archaeocins (halocins).	Daly <i>et al.</i> , 2007
		Rodríguez-Baños <i>et al.</i> , 2015
		Ghoul and Mitri, 2016
		Mazguene <i>et al.</i> , 2018
		Charlestown and Burns, 2015

Tabla 1

Resumen de las adaptaciones moleculares que muestran los microorganismos para estar vivos en ambientes salinos extremos.

4.1 Adaptación a altas concentraciones de sal

Para la supervivencia celular, la presión osmótica del citoplasma debe superar la del medio extracelular, ya que esta presión es fundamental como fuerza motriz de la célula para mantener el citoplasma al menos isoosmótico con respecto al medio extracelular (Kempf y Bremer, 1998).

La gran diversidad de microorganismos descrita en ambientes halófilos provoca una considerable diversidad de mecanismos por los cuales los microorganismos halófilos y halotolerantes pueden tolerar la gran presión osmótica generada por el ambiente salino (Oren, 1999a; Siglioccolo *et al.*, 2011).

La primera estrategia, denominada "salt-in", se basa en la acumulación intracelular de concentraciones molares de potasio y cloruro, lo que requiere una adaptación eficiente de la maquinaria enzimática intracelular a altas concentraciones de sal. Las proteínas citoplasmáticas requieren altas concentraciones de sal para ser estables y activas. Para lograr este objetivo, estos microorganismos cuentan con un proteoma ácido, que es un sistema que requiere relativamente poca energía (Roberts, 2005). Esta estrategia es utilizada por un número limitado de halófilos, siendo las arqueas del orden *Halobacteriales* el principal representante, que acumulan KCl en concentraciones iguales o superiores a las concentraciones de NaCl del medio extracelular. En el dominio Bacteria, el único orden en el que se ha caracterizado esta estrategia es *Halanaerobial*, en el que se encuentran bacterias anaerobias fermentativas u homoacetogénicas (Oren, 2000). La composición y estructura de las proteínas también se adaptan a la alta concentración de sal. El proteoma de las arqueas halófilas es muy ácido. Las proteínas tienen un bajo contenido de residuos hidrofóbicos en la superficie como la lisina, mientras que tienen un alto contenido de residuos cargados negativamente como el aspartato. El interior de las proteínas es rico en valina y bajo en isoleucina. El uso de residuos negativos en la superficie permite una mejor organización de la red de agua en la superficie de la proteína y puede ser importante para prevenir la agregación (Gundee-Cimerman *et al.*, 2018).

La segunda estrategia consiste en la expulsión de sales del citoplasma con la mayor eficacia posible, acompañada de la acumulación de los denominados solutos compatibles para conseguir un adecuado equilibrio osmótico (Oren, 2002). Estos solutos forman estructuras que quedan excluidas de la capa de hidratación de las proteínas, por lo que contribuyen a la estabilización de esta capa al disminuir el coeficiente de actividad del agua (Held *et al.*, 2010). En la mayoría de los extremófilos, estos compuestos se acumulan no solo en respuesta a altas concentraciones de sal, sino también en respuesta al estrés por temperatura. El uso de solutos orgánicos requiere una menor respuesta adaptativa de la maquinaria enzimática celular que la estrategia "salt-in", aunque requiere un mayor aporte energético (Oren, 1999b). Esta estrategia está ampliamente distribuida en los tres dominios, aunque existen diferencias químicas en los solutos acumulados por cada tipo de microorganismo. Los solutos más abundantes en las bacterias son la ectoína y la glicina betaína (Galinski, 1995). En el caso del alga *Dunaliella* se han encontrado concentraciones intracelulares de glicerol (Oren, 2002). También se han reportado solutos orgánicos en el

dominio Archaea, en el que la mayoría de los miembros caracterizados del orden *Halobacteriales* sintetizan este tipo de soluto incluso en presencia de altas concentraciones intracelulares de KCl (Oren, 2000).

4.2. Adaptación a la baja disponibilidad de oxígeno

Estos ambientes también se caracterizan por una baja difusión de oxígeno, convirtiéndose en un factor limitante para la vida en ambientes con una concentración extremadamente alta de sales (hasta la saturación). Para hacer frente a esta disminución de oxígeno, gran parte de los organismos poliextremófilos utilizan diversas estrategias, como los mecanismos basados en la bacteriorrodopsina. Esta molécula es una proteína integral de membrana ubicada en la membrana celular del dominio Archaea, principalmente en el orden *Halobacteriales* (Haupts *et al.*, 1999). Esta proteína puede absorber luz verde a una absorbancia de 500 a 650 nm, con un máximo de 568 nm, y puede convertir la luz en un gradiente electroquímico que se usa para producir ATP (Hellingwerf, 2002). Esta maquinaria hace posible la producción de ATP de forma similar a la cadena de transporte de electrones, a diferencia de que los protones expulsados en este caso provienen de una bomba de protones fotoexcitables. En situaciones de baja disponibilidad de oxígeno, la bacteriorrodopsina se encuentra en torno al 50% (v/v) de la masa total de la membrana celular, demostrando así la gran capacidad de adaptación de estos microorganismos a estas situaciones y la relevancia de esta proteína. (Haupts *et al.*, 1999).

Otra estrategia para superar el agotamiento del oxígeno es la producción de vesículas de gas que promueven la flotación celular para hacer que el oxígeno sea más accesible para las células. Además de esta función general, se han identificado diferentes funciones específicas de estas estructuras: alcanzar mayores intensidades lumínicas para la bomba de protones, reducir el volumen citoplasmático para conseguir una mayor relación superficie-volumen en las arqueas y facilitar la dispersión de las endosporas en el caso de las bacterias anaerobias. Se han encontrado vesículas de gas en diferentes especies de los géneros *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloplanus*, *Haloquadratum* y *Halorubrum* (Oren, 2012).

Debido a la falta de oxígeno en tales entornos, la respiración rara vez es 100 % aeróbica, que es el proceso más rentable para producir energía. Por tanto, hay especies que en ausencia de oxígeno pueden activar otras vías metabólicas que les permitan utilizar otros aceptores de electrones además del oxígeno para respirar y producir ATP. En este contexto, la desnitrificación se revela como la vía respiratoria anóxica más importante llevada a cabo por microorganismos en los que se utilizan nitratos o nitritos como aceptores finales de electrones en lugar de oxígeno (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018). La desnitrificación ha sido bien estudiada hasta el momento en suelos, sin embargo, los primeros estudios sobre el ciclo del nitrógeno en general y particularmente sobre la desnitrificación en ambientes salinos no se han reportado hasta principios de este siglo (Martínez-Espinosa *et al.*, 2006; Martínez-Espinosa *et al.*, 2011). Los microorganismos halófilos desnitrificantes podrían clasificarse en dos grupos principales según la maquinaria molecular que soporta la desnitrificación: desnitrificantes completos y parciales. Los desnitrificantes completos son aquellos microorganismos capaces de reducir completamente el nitrato a dinitrógeno gracias a cuatro reacciones enzimáticas consecutivas. Los desnitrificantes parciales solo pueden impulsar algunas de las cuatro reacciones, contribuyendo así a la emisión de productos intermedios como N₂O y NO, que son gases de efecto invernadero (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016). Considerando que las haloarqueas constituyen las principales poblaciones microbianas en ecosistemas extremadamente salados, varias investigaciones tuvieron como objetivo evaluar

cuál es el fenotipo desnitrificante más abundante (parcial vs. completo). Resultados recientes han revelado que la desnitrificación llevada a cabo por haloarqueas está más extendida de lo que inicialmente se pensaba, siendo los desnitrificantes parciales importantes fuentes de emisión de gases nitrogenados en ecosistemas salados áridos y semiáridos (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018, 2019). Por el contrario, los desnitrificantes halofílicos completos han sido considerados como buenos organismos modelo para el diseño de estrategias de biorremediación para el tratamiento de salmueras y aguas residuales saladas con alto contenido de compuestos nitrogenados, metales pesados y oxiclóruros (Nájera Fernández *et al.*, 2012); Martínez-Espinosa *et al.*, 2015; Miralles-Robledillo *et al.*, 2019).

4.3. Adaptación a la alta radiación solar

La radiación conduce a la formación de múltiples iones y electrones que modifican biomoléculas principalmente a través de reacciones que involucran especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ejemplo, las ROS causan daño a las células debido a modificaciones de las bases nitrogenadas o rupturas en las hebras de ADN (Halliwell y Gutteridge, 1999). Debido a la adaptación a estas modificaciones del ADN, muchas especies de haloarqueas muestran un genoma constituido por varios cromosomas y las células muestran la capacidad potencial de regenerar cromosomas intactos a partir de fragmentos dispersos, por lo que podría existir una superposición de fragmentos genómicos (Soppa, 2014).

El principal mecanismo de protección frente a este estrés oxidativo se basa en enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa. La superóxido dismutasa cataliza la conversión de oxígeno en peróxido de hidrógeno y se han encontrado genes que codifican para esta enzima en genomas del género *Halobacterium* (la mayoría de las especies son estrictamente aeróbicas). En otras especies anaeróbicas, esta enzima es reemplazada por superóxido reductasa (Confalonieri y Sommer, 2011).

Otro mecanismo de defensa es el aumento de la relación $[Mn]/[Fe]$ en la célula, lo que impide la formación de ROS dependientes de hierro. A su vez, la presencia de Mn también puede eliminar ROS (Daly *et al.*, 2007).

Finalmente, la mayoría de los microorganismos halófilos que habitan ambientes extremadamente salados altamente expuestos a la radiación solar se caracterizan por la pigmentación, principalmente debido a la producción de carotenoides. Esos pigmentos protegen contra la radiación solar. Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos que contienen al menos 40 grupos hidrocarbonados que muestran actividad antioxidante y actúan como secuestradores de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Rodríguez-Baños *et al.*, 2015). Algunos de los carotenoides más abundantes producidos por microorganismos halófilos son el betacaroteno, el licopeno, la astaxantina y la bacteriorrubrina, este último producido principalmente por haloarqueas (Vilchez *et al.*, 2011; Giani *et al.*, 2020).

4.4. Competencia por falta de recursos

Las poblaciones microbianas compiten constantemente por nutrientes y nichos, y esta competencia es significativa en ambientes extremos caracterizados por la baja disponibilidad de nutrientes. Hay dos tipos diferentes de competencia, indirecta y directa. En el enfoque indirecto, los microorganismos compiten por nutrientes, limitando la disponibilidad de nutrientes para el resto de los microorganismos. El segundo enfoque

implica la producción de biomoléculas como toxinas y productos químicos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Ghoul y Mitri, 2016). Entre las toxinas se pueden destacar las bacteriocinas (Jack *et al.*, 1995). Estas son toxinas proteicas o peptídicas producidas por bacterias para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas similares o estrechamente relacionadas. Sus homólogos sintetizados por las arqueas se denominan arqueocinas, que se dividen en dos grandes grupos: las sulfolobocinas (asociadas a la membrana y sintetizadas por miembros del orden *Sulfolobales*) y las halocinas (secretadas al exterior de las células y sintetizadas por miembros del orden *Halobacteriales*). En el caso de ambientes hipersalinos, las halocinas son de relevancia. Estas proteínas también se pueden dividir en dos grandes grupos: péptidos de halocina, también denominados microhalocinas, que son menores de 10 kDa (Halocinas S8, C8, R1 y A4), y proteínas de halocina, que son mayores de 10 kDa (Halocinas H1, H4, H6 y H7) (Mazguene *et al.*, 2018).

La producción de halocinas está determinada por una serie de factores como la composición del medio, la temperatura, la aireación o el pH, ocurriendo al inicio de la fase exponencial y alcanzando niveles óptimos en la transición entre esta fase y la estacionaria. Además, la actividad de estas proteínas varía según la especie y puede permanecer constante (Halocinas H1, 28 y C8) o disminuir (Halocinas H4, H6, KPS1, HA1, HA3 y H17) durante el crecimiento de la población microbiana (Mazguene *et al.*, 2018). Las bacteriocinas se desnaturalizan e inactivan en ecosistemas salados, mientras que las halocinas requieren sal para estar activas. Este patrón confiere ventajas a las haloarqueas frente a las bacterias no halofílicas en ecosistemas halofílicos (Tadeo *et al.*, 2009).

Según el tipo de halocinas, éstas podrían promover la inhibición del crecimiento o la muerte celular. Así, los mecanismos moleculares de acción son variados: promover cambios en el pH interno o potencial de membrana, modular la fuerza motriz del protón, modificar el flujo Na^+/H^+ o provocar la inhibición del antiportador Na^+/H^+ , etc. Las halocinas suelen actuar contra especies de haloarqueas que también son productores de halocinas, y se ha demostrado que muy pocos tienen efectos adversos contra las especies bacterianas. Estas proteínas son generalmente neutras o aniónicas, por lo que no pueden interactuar con las membranas bacterianas cargadas negativamente (Charlestown y Burns, 2015).

5. Aplicaciones biotecnológicas de biomoléculas a partir de microbios halófilos

El uso de microorganismos extremófilos como fábricas celulares para producir biomoléculas está cobrando especial interés en el descubrimiento de nuevas biomoléculas con una amplia variedad de aplicaciones en muchos campos, desde la biomedicina hasta la biotecnología. El continuo desarrollo de todas las técnicas "ómicas" y bioinformáticas ha permitido estudiar multitud de genes implicados en la síntesis de compuestos para la adaptación en respuesta a condiciones extremas. Se ha descrito que los microorganismos extremófilos producen una amplia variedad de compuestos interesantes, como pigmentos carotenoides, biopolímeros, bioplásticos, enzimas hidrolíticas, proteínas retinianas y biofertilizantes (Yin *et al.*, 2015).

5.1. Pigmentos antioxidantes

Los carotenoides son pigmentos terpenoides naturales hechos de residuos de isopreno. Son compuestos hidrófobos y suelen estar formados por un esqueleto de 40 átomos de carbono, aunque la mayoría de los derivados presentes en el dominio Archaea tienen 50 átomos de carbono. Esta cadena puede ser terminada por anillos o grupos

funcionales con oxígeno (Jehlička *et al.*, 2013). Pueden absorber luz en el rango de 300 a 600 nm y son responsables de la pigmentación característica que muestran estos microorganismos. La capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda está relacionada con el número de grupos funcionales y dobles enlaces que presenten en su estructura (Johnson *et al.*, 1996).

Los carotenoides se pueden clasificar según dos criterios: i) estructura y presencia o ausencia de átomos de oxígeno y ii) relación con la vitamina A. En cuanto a su estructura, se pueden distinguir dos grandes grupos: los carotenos, que están compuestos exclusivamente por carbono e hidrógeno (p. licopeno o β -caroteno); y xantofilas, que tienen átomos de oxígeno en su estructura y pueden contener varios grupos carbonilo, epoxi o hidroxilo, entre otros (por ejemplo, xantofila, zeaxantina, luteína) (Walter y Strack, 2011). La clasificación basada en la relación con la vitamina A permite identificar varios grupos de pigmentos: precursores de la vitamina A no pigmentantes (β -caroteno); pigmentos con actividad parcial de vitamina A (criptoxantina); precursores de vitamina A no pigmentantes (violaxantina) y precursores de vitamina A no pigmentantes (luteína o zeaxantina) (Tanaka *et al.*, 2012). La principal función biológica asociada a estos compuestos está relacionada con sus propiedades antioxidantes. Los pigmentos como las xantofilas son captadores de radicales libres de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) (Vilchez *et al.*, 2011).

La mayoría de los miembros de la familia *Haloferacaceae* pueden sintetizar carotenoides C50, entre los que destacan la bacteriorruberrina y sus precursores (2 isopentenil-3,4-dehidrorrodopina (IDR), bisanhidrobacteriorruberrina (BABR) y monoanhidrobacteriorruberrina (MABR). Otros carotenoides también producidos a menor concentración son fitoeno, licopeno y β -caroteno (Goodwin y Britton, 1980). En varias especies del género *Halorubrum* se ha cuantificado el contenido de bacteriorruberrina en más del 65% del total de carotenoides producidos (Yatsunami *et al.*, 2014). La síntesis de bacteriorruberrina es inducida principalmente por factores como baja tensión de oxígeno, alta radiación solar, estrés osmótico y la presencia de diferentes compuestos como la anilina (El-Sayed *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 1997; Raghavan *et al.*, 2005).

La producción de carotenoides a partir de haloarqueas tiene muchas aplicaciones en el campo de la biotecnología, especialmente en la industria alimentaria, como colorantes para la alimentación de aves, ganado y peces. Otras aplicaciones muy prometedoras están relacionadas con la biomedicina (como antioxidantes, antitumorales, agentes de prevención de enfermedades cardíacas, precursores de vitamina A y potenciadores de la producción de anticuerpos) (Vilchez *et al.*, 2011; Naziri *et al.*, 2014). Así, un estudio utilizando la línea celular tumoral HepG2 de humanos demostró que el aumento de la concentración de carotenoides extraídos de la especie *Halobacterium halobium* consiguió disminuir la viabilidad de esta línea celular (Abbes *et al.*, 2013).

Más de 600 carotenoides se producen naturalmente. Los β -carotenos, la astaxantina, la cantaxantina y la luteína son muy comercializados. Hasta el momento, la comercialización de estos compuestos se realiza a través de la producción química, lo que presenta ventajas y desventajas frente a la producción natural. Así, los carotenoides producidos químicamente se caracterizan por una excelente pureza y consistencia, con un costo de producción relativamente bajo. Sin embargo, la síntesis química de carotenoides implica el uso de reactivos que no son amigables con el medio ambiente. Además, la síntesis de pigmentos de mayor complejidad estructural es costosa y requiere mucho tiempo. Teniendo en cuenta

todas estas desventajas, la producción de pigmentos naturales utilizando fábricas de células se revela como un enfoque prometedor para obtener carotenoides a gran escala (Naziri *et al.*, 2014).

Aunque algunas especies de haloarqueas son buenas fuentes naturales para obtener carotenoides, ninguna de ellas ha sido utilizada a gran escala para obtener carotenoides. Hasta el momento, el único organismo halófilo utilizado con éxito para la producción industrial de carotenoides es *D. salina*. Esta especie puede producir un alto porcentaje del derivado 9-cis β -caroteno. Como ejemplo, Borovkov y sus colaboradores estudiaron la producción potencial de alto nivel de carotenoides desde condiciones de laboratorio controladas hasta balsas al aire libre utilizando *D. salina*. Los resultados obtenidos revelaron una producción de 600 mg m² de carotenoides en otoño frente a 200 mg m² en verano, siendo el 9-cis β -caroteno el carotenoide predominante. Este derivado se probó como parte de un tratamiento para diversas enfermedades como la psoriasis, la aterosclerosis o la retinosis pigmentaria (Borovkov *et al.*, 2020).

5.2. Solutos compatibles

Los solutos compatibles son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan como moléculas osmorreguladoras en el interior de las células. Su acumulación intracelular no afecta los procesos celulares normales y es promovida por transporte desde el exterior celular o por síntesis de novo (Liu *et al.*, 2021).

Los compuestos que acumula cada microorganismo dependen principalmente del tipo de microorganismo y de su nivel de adaptación al estrés osmótico. Las especies tolerantes débiles generalmente acumulan azúcares simples como sacarosa y trehalosa (Klahn *et al.*, 2011). Los organismos tolerantes moderados acumulan glucosil glicerol, que juega un papel muy importante en la sustentabilidad de la división celular (Ferjani *et al.*, 2003). Finalmente, los microorganismos que mejor se adaptan a este estrés osmótico lo hacen acumulando ectoína, glicina y betaína (Klahn *et al.*, 2011).

Entre todos los solutos que se producen en este tipo de ambientes para hacer frente al estrés osmótico, destacan tanto la ectoína como la betaína, con sus múltiples aplicaciones biotecnológicas. En cuanto a la ectoína, sus beneficios están relacionados con la estabilización de proteínas y ácidos nucleicos, la prevención de daños causados por altas concentraciones de sal, temperatura, desecación y congelación. Además, permite contrarrestar los efectos de las radiaciones UV-A sobre la piel, por lo que su principal aplicación se centra en el campo de la cosmética como aditivo dermatológico en cremas hidratantes. En el campo de la biomedicina, se ha demostrado que este compuesto inhibe la agregación de β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer, así como sus beneficios potenciales en la enfermedad del asma (Oren, 2010). Otras aplicaciones están relacionadas con la industria alimentaria, ya que se utiliza como estabilizador en diversos alimentos (Detkova *et al.*, 2007). Los principales microorganismos capaces de producir este compuesto pertenecen al género *Halomonas* (*H. elongata*, *H. boliviensis*, *H. salina*), además de otras especies como *Chromohalobacter israelensis* y *C. salexigens* (Liu *et al.*, 2021).

La betaína es de particular interés en el campo de la biomedicina, especialmente como un tratamiento potencial para la infiltración adiposa del hígado al inicio de la cirrosis (Detkova *et al.*, 2007). Sus propiedades anticoagulantes pueden utilizarse para prevenir la aparición de trombos y ataques al corazón (Messadek, 2005). Algunos de los

microorganismos que pueden acumular estos compuestos son *Halorhodospira halochloris* o *Thioalkalovibrio versutus* (Shivanand y Mugeraya, 2011).

5.3. Bacteriorrodopsina

La bacteriorrodopsina es una proteína de membrana integral que se encuentra en especies del dominio Archaea, dentro de la denominada "membrana púrpura", principalmente en la clase *Halobacteria*. Esta proteína puede absorber luz verde a una absorbancia entre 500 y 650 nm, con un máximo a 568 nm (Trivedi *et al.*, 2011). Esta luz se utiliza para generar un gradiente electroquímico para producir ATP, de modo que los protones se bombean hacia el exterior utilizando esta energía solar (Li *et al.*, 2018).

Esta proteína tiene características que la convierten en un producto muy interesante para su uso a gran escala. A pesar de ser una proteína presente en microorganismos de ambientes hipersalinos, es estable en ausencia de sal, manteniendo sus propiedades fisicoquímicas durante largos periodos de tiempo. Tiene un amplio rango de operación en temperatura (0–45°C) y pH (1–11) (Li *et al.*, 2018).

Fue descubierto por primera vez a principios de los años 70 en la arquea *Halobacterium salinarum*, desarrollando sus aplicaciones potenciales en el mundo de la bioelectricidad a partir del año 2000, con su uso como prótesis retiniana artificial (Frydrych *et al.*, 2000). El uso potencial de esta proteína en este campo está determinado por su fotociclo, en el cual existe interconversión entre las diferentes formas de la proteína (estado B \leftrightarrow estado M) (Li *et al.*, 2018).

Las diferentes aplicaciones de la bacteriorrodopsina en este campo se pueden dividir en dos partes diferenciadas: aplicaciones fotoquímicas y fotoeléctricas. En cuanto a sus aplicaciones fotoquímicas, su uso se centra en la producción de memorias ópticas. Cuando la bacteriorrodopsina es excitada por la luz verde, el fotociclo comienza con el estado K y termina con el estado O. Después de la segunda excitación con luz roja, el ciclo se bifurca en los estados P y Q, en los que estos dos estados se consideran 1 en el código binario y el estado O como 0. Es en esta transición cuando se pueden escribir datos y almacenada en estas memorias ópticas. Además, los estados P y Q son excitables con luz azul, por lo que el uso de esta luz permite borrar los datos almacenados (Li *et al.*, 2018).

En el apartado fotoeléctrico se puede encontrar una mayor variedad de aplicaciones, entre las que destacan los biosensores de movimiento, los sensores de rayos X y las células fotovoltaicas. Los biosensores de movimiento son sistemas de información visual que se basan en biomateriales que son sensibles a la luz y que detectan el flujo óptico para detectar el movimiento de los objetos. La bacteriorrodopsina se utiliza como fotodetector en estos sistemas ya que su respuesta fotoeléctrica muestra un amplio rango dinámico, así como alta resolución debido al alto grado de fotosensibilidad que permite lograr un procesamiento en tiempo real (Wang *et al.*, 2005). En este mismo sentido, se han desarrollado nuevos materiales para mejorar la sensibilidad de la técnica de detección por rayos X. La bacteriorrodopsina se utiliza como fotodetectores para la detección de rayos desde el ultravioleta hasta el infrarrojo, logrando una detección en tiempo real y utilizable (Pei *et al.*, 2001).

5.4. Enzimas hidrolíticas

Algunas de las enzimas utilizadas por los organismos halófilos pueden funcionar en condiciones fisicoquímicas extremas, como altas concentraciones de sal o temperatura. Esta eficiente adaptación otorga gran interés a estas proteínas en la industria biotecnológica, en procesos con altos niveles de salinidad donde la mayoría de los catalizadores son inhibidos (van den Burg, 2003). La ventaja de estas enzimas radica en su estructura, con muchos aminoácidos altamente ácidos en la superficie, así como un componente menor de cadenas laterales hidrofóbicas. Ambas características les permiten presentar mayor flexibilidad e hidratación (DasSarma *et al.*, 2013).

Se ha potenciado el uso de diferentes enzimas de organismos halófilos, entre las que destacan hidrolasas, lipasas, esterasas, proteasas y nucleasas. Las hidrolasas concentran un grupo de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas, entre las que se encuentran las amilasas, lipasas y proteasas. Las amilasas catalizan la hidrólisis interna de los enlaces α -1,4-glucosídicos del almidón en productos de bajo peso molecular como la maltosa o la glucosa (Souza, 2010). Han podido obtener amilasas con un alto grado de purificación de diferentes especies: *Haloferax mediterranei*, cuya amilasa requiere una alta concentración de sal (2-4 M) y un pH entre 7 y 8; o *Hfx. sp. HA10*, que requiere concentraciones de sal entre 1 y 3 M, así como una temperatura cercana a los 55 °C (Pérez Pomares *et al.*, 2018; Bajpai *et al.*, 2015). Las principales aplicaciones que se le pueden dar a estas proteínas están relacionadas con la industria alimentaria, en procesos de panificación, elaboración de cerveza y jugos de frutas, donde se agregan para degradar este almidón (Dekhordi y Javan, 2012). La industria de producción de biocombustibles también utiliza una cantidad importante de amilasas, para producir etanol, en el cual se debe procesar el almidón para obtener azúcares (Sánchez y Cardona, 2008). En la industria farmacéutica, las ciclodextrinas glucosiltransferasas se utilizan para mejorar la vida útil de diferentes fármacos en un intento por disminuir la dosis efectiva. Estas proteínas generan ciclodextrinas, que pueden formar cuerpos de inclusión para eliminar compuestos tóxicos (Park *et al.*, 2000).

Las celulasas son exoenzimas capaces de hidrolizar enlaces glucósido 1,4- β -D en celulosas y hemicelulosas. Estas enzimas pueden desempeñar un papel fundamental en el descubrimiento de nuevas fuentes de energía renovable. El uso de residuos de lignina y celulosa presenta ciertas limitaciones económicas, especialmente en los procesos de despolimerización, debido a las condiciones extremas de pH y temperatura (Kasirajan y Maupin-Furlow, 2020). Por lo tanto, las enzimas obtenidas de haloarqueas como *Hfx. sulfurifontis* puede facilitar este proceso ya que pueden trabajar con un rango de pH entre 3 y 9, concentraciones de sal entre 0 y 5 M, así como temperaturas entre 20 y 80 °C (Malik y Furtado, 2018). Además, estas proteínas se han utilizado en otras industrias como la agricultura, para el control del crecimiento vegetal; la extracción de carotenoides, acelerando el proceso de hidrólisis en las plantas; la industria alimentaria, para la extracción de zumos de frutas; preparación de detergentes, reduciendo el daño tisular (Bhat, 2000; Cinar, 2005; Karmakar y Ray, 2011).

Las deshidrogenasas representan otro gran grupo de enzimas ampliamente utilizadas en diferentes industrias y que han logrado ser aisladas y producidas con gran eficiencia a partir de microorganismos halófilos. Un grupo de ellas, las alcohol deshidrogenasas, se han potenciado en la producción de biosensores o diversos compuestos como sabores o fármacos (Goldberg *et al.*, 2007). Se trata de enzimas que trabajan en condiciones extremas, como la especie aislada *Haloarcula marismortui* (2 M KCl y temperaturas de hasta 60 °C) (Timpson *et al.*, 2012). Otros ejemplos son las glucosas deshidrogenasas, que son muy

utilizadas en la industria farmacéutica para producir medicamentos o actúan como biocatalizadores en procesos para producir biocombustibles (Chansaenpak *et al.*, 2021).

En el campo de la biorremediación y el tratamiento de aguas contaminadas, entran en juego un importante grupo de enzimas de haloarqueas denominadas nitrito y nitrato reductasas. Estas enzimas se pueden encontrar ampliamente distribuidas en haloarqueas, destacando especialmente especies como *Hfx. mediterranei* o *H. marismortui* (Martínez-Espinosa *et al.*, 2007). Por lo tanto, los residuos de agua contaminada que contienen nitritos o nitratos son buenas fuentes para la desnitrificación, proceso que permitiría su eliminación. Además, estas enzimas también se pueden utilizar para construir biosensores para detectar la presencia de estos compuestos contaminantes (Martínez-Espinosa *et al.*, 2006).

5.5. Bioplásticos

Los llamados polihidroxialcanoatos (PHAs) representan una familia de biopolímeros que pueden ser utilizados como bioplásticos degradables. Son poliésteres que son almacenados por microorganismos, generalmente como fuente de carbono. Dentro de esta familia, existen dos compuestos que destacan especialmente por sus propiedades y usos en la industria: el poli(3-hidroxibutirato) (PHB) y el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (Chen, 2009).

Estos compuestos se caracterizan por su completa biodegradabilidad, biocompatibilidad y sostenibilidad, lo que los convierte en una alternativa ecológica a los plásticos de origen petroquímico. Además, la producción de estos compuestos por microorganismos halófilos tiene varias ventajas que reducen los costos de producción de fermentación y recuperación: la alta concentración de sal a la que pueden crecer los microorganismos halófilos evita la contaminación por otros microorganismos; se pueden utilizar fuentes de agua salada reduciendo el uso de agua dulce en la producción; su producción puede llevarse a cabo a través de un proceso continuo que aumenta la eficiencia; sustratos de bajo coste, ya que se pueden utilizar residuos de diferentes industrias (celulosa, residuos de cocina, etc.); la recuperación de los PHA se puede realizar por métodos simples como la lisis celular por choque hipoosmótico (Quillaguamán *et al.*, 2010).

La acumulación de PHAs ha sido descrita en diversas especies del dominio bacteriano como fijadores de nitrógeno (*Rhizobium*). Sin embargo, por todas las propiedades discutidas anteriormente, las especies halófilas del dominio Archaea representan el grupo más interesante a nivel industrial. *Hfx. mediterranei* es una de las especies que más se ha utilizado para producir bioplásticos, especialmente por su alta tasa de crecimiento, versatilidad metabólica, su estabilidad genética y sus eficientes sistemas de transformación (Zuo *et al.*, 2018). Una de las ventajas de este microorganismo radica en que puede sintetizar PHBV sin necesidad de un precursor en el medio. El bioplástico PHBV es de mayor interés que el PHB por su versatilidad y flexibilidad, lo que le permite ser utilizado en la fabricación de materiales sanitarios o de empaque (Koller *et al.*, 2007).

Además, las bacterias halófilas son buenas productoras de PHA. Las especies *Halomonas boliviensis* sintetizan PHB de alto peso molecular bajo un amplio rango de condiciones de cultivo, concentraciones de sal de 0 a 25 %, temperaturas de 0 a 45 °C, así como pH en el rango de 6 a 11 (Quillaguamán *et al.*, 2007).

5.6. Compuestos antimicrobianos

Los compuestos anteriores representan la amplia variedad de compuestos de mayor interés que se pueden obtener de fuentes naturales como los microorganismos halófilos de ambientes hipersalinos. Sin embargo, más compuestos se están volviendo más importantes con el tiempo, incluidas las halocinas y los compuestos antimicrobianos.

Uno de los problemas de salud más graves en la actualidad está relacionado con el continuo aumento de la resistencia a los antibióticos de numerosas especies bacterianas. Por ello, la búsqueda de nuevas terapias antimicrobianas se convierte en uno de los objetivos fundamentales de la ciencia a corto plazo. Los ambientes extremos, como los hipersalinos, así como los microorganismos que los habitan, se han convertido en una nueva fuente prometedora para la obtención de este tipo de compuestos.

En suelos salinos de diferentes partes del mundo se han aislado especies bacterianas que producen moléculas que tienen acción contra otras bacterias. Este es el caso de la especie haloalcalófila *Nocardiopsis sp. AJ1*, en el que se ha podido estudiar la producción de dos moléculas, pirrol (1,2-A (pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-) y actinomicina C2, que tienen propiedades antimicrobianas acción ante diversas especies como *E. coli*, *S. aureus* o *P. aeruginosa* (Adlin-Jenifer *et al.*, 2019).

En el dominio Archaea, a principios de la década de los 80 se descubrió un grupo de sustancias que eran secretadas por especies del género *Halobacterium*. Estas sustancias, llamadas halocinas, son proteínas y péptidos antimicrobianos que podrían causar la muerte de la microbiota que se encuentra alrededor de estas especies (Rodríguez-Valera *et al.*, 1982). Esta actividad antimicrobiana está relacionada con el dominio del nicho ecológico, en el que debe competir con otras especies con adaptaciones y requerimientos nutricionales similares (Shand y Leyva, 2007).

En este campo, no solo se han descubierto compuestos con actividad antimicrobiana, sino también compuestos que pueden usarse como terapias contra el cáncer. Este es el caso de los carotenoides del dominio Archaea, discutidos en secciones anteriores. Las especies halófilas y halotolerantes también han sido objeto de atención por su producción de compuestos anticancerígenos. Se ha demostrado que diferentes especies del género *Bacillus*, *Halomonas*, *Vibrio* o *Marinobacter* poseen actividad L-asparaginasa y L-glutaminasa. En un ensayo con linblastocitos humanos y líneas celulares de leucemia mieloide, se pudo detectar una mejora en la citotoxicidad de este compuesto frente a estas líneas celulares (Ghasemi *et al.*, 2017).

6. Conclusión

Este trabajo destaca la relevancia de los ecosistemas hiper/salinos. Albergan una gran diversidad microbiológica que aún está lejos de ser completamente descrita y explotada. En el sureste de España, estos ecosistemas representan un área importante y tradicionalmente han sido utilizados para la extracción de sal.

Durante las últimas tres décadas se ha estudiado la adaptación molecular y el metabolismo de los microorganismos que habitan en este ambiente extremo y se han propuesto aplicaciones biotecnológicas prometedoras. Como ejemplos de aplicaciones biotecnológicas se han resumido aquí varias moléculas y procesos además de la tecnología CRISPR-Cas cuyas bases se describieron en primer lugar a partir de una haloarquea aislada de salmueras de Santa Pola.

Sin embargo, aún son necesarios más estudios genómicos y proteómicos para descubrir la importancia que estos microorganismos pueden tener en el equilibrio del ecosistema, las interacciones entre ellos y en el descubrimiento de nuevas aplicaciones.

Contribuciones de autor

Rosa María Martínez-Espinosa (RMME) concibió el proyecto global y gestionó la financiación. Guillermo Martínez (GMM) y Rosa María Martínez-Espinosa realizaron el análisis bibliométrico y bibliográfico e integraron todos los datos a la base de datos local. Carmen Pire (CP), GMM y RMME analizaron los resultados y contribuyeron igualmente a la redacción del borrador original, revisión de los resultados y edición final. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Fondos

Este trabajo ha sido financiado por el Ayuntamiento de Torrevieja y por una beca de investigación de VIGROB-309 (Universidad de Alicante)

Declaración de interés en competencia

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Abbes, M., Baati, H., Guermazi, S., Messina, C., Santulli, A., Gharsallah, N., Ammar, E., 2013. Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern. *BMC Complement Altern Med.* 13, 255. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-255>.
- Adlin-Jenifer, J., Michaelbabu, M., Eswaramoorthy, C., Jeraldin-Nisha, S.R., Uma, G., Citarasu, T., 2019. Antimicrobial potential of haloalkaliphilic *Nocardiopsis* sp. AJ1 isolated from solar salterns in India. *J. Basic Microbiol.* 59, 288–301. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800252.r>.
- Anderson, I., DasSarma, P., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Del-Rio, T., Tice, H., Dalin, E., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Sims, D., Brettin, T., Detter, J., Han, C., Larimer, F., Hauser, L., Land, M., Ivanova, N., Richardson, P., Cavicchioli, R., Antarctic Halorubrum lacusprofundi type strain ACAM 34. *Stand Genomic Sci.* 11 (1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0194-2>.
- Andrei, A., Banciu, H., Oren, A., 2012. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* 330 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x>.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Varela, F., Amann, R., Rosell’o-Mora, R., 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov, sp, a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 485–4291. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-485>.

Antón, J., Peñna, A., Santos, F., Martínez-García, M., Schmitt-Kopplin, P., Rosselló-Mora, R., 2008. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Syst.* 4 (1), 15. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-15>.

Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7), 3052–3057. <https://doi.org/10.1128/aem.66.7.3052-3057.2000>.

Asker, D., Ohta, Y., 2002. *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 729–738. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-729>.

Atanasova, N., Oksanen, H., Bamford, D., 2015. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.001>.

Atanasova, N., Roine, E., Oren, A., Bamford, D., Oksanen, H., 2012. Global network of specific virus–host interactions in hypersaline environments. *Environ. Microbiol.* 14, 426–440. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02603.x>.

Bada, J., Judge, P., Adam, S., Axford, D., Vinals, J., Birch, J., Kwan, T., Hoi, K., Yen, H., Vial, A., Milhiet, P., Robinson, C., Schapiro, I., Moraes, I., Watts, A., 2021. Structures of the archaeorhodopsin 3 transporter reveal that disordering of internal water networks underpins receptor sensitization. *Nat. Commun.* 12 (1), 629. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20596-0>.

Bajpai, B., Chaudhary, M., Saxena, J., 2015. Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food Technol. Biotechnol.* 53, 11–17. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.01.15.3824>.

Ben-Amotz, A., 2002. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 273–280.

Benlloch, S., Acinas, S., Antón, J., López-López, A., Luz, S.P., Rodríguez-Valera, F., 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern. Culture versus PCR. *Microbial Ecol.* 41, 12–19. <https://doi.org/10.1007/s002480000069>.

Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 355–383. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00041-0).

Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., Falb, M., Rampp, M., 2006. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* 7, 169. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-169>.

Borovkov, A., Gudvilovich, I., Avsiyan, A., 2020. Scale up of *Dunaliella salina* cultivation: from strain selection to open ponds. *J. Appl. Phycol.* 32 (3), 1545–1558. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02104-5>.

- Bowers, K.J., Mesbah, N.M., Wiegel, J., 2009. Biodiversity of poly-extremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Syst.* 23, 5–9. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>. Buchheim, M., Kirkwood, A.,
- Buchheim, J., Verghese, B., Henley, W., 2010. Hypersaline soil supports a diverse community of *Dunaliella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 46, 1038–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00886.x>.
- Burns, D., Janssen, P., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 387–392. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64690-0>.
- Casamayor, E., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4 (6), 338–348. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00297.x>.
- Cavicchioli, R., 2011. Archaea – timeline of the third domain. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 51–61. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2482>.
- Chansaenpak, K., Kamkaew, A., Lisnund, S., Prachai, P., Ratwirunkit, P., Jingpho, T., Blay, V., Pinyou, P., 2021. Development of a sensitive self-powered glucose biosensor based on an enzymatic biofuel cell. *Biosensors (Basel)* 11, 16. <https://doi.org/10.3390/bios11010016>.
- Charlesworth, J., Burns, B., 2015. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in Archaea. *Archaea* 2015, 282035. <https://doi.org/10.1155/2015/282035>.
- Chen, G., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>.
- Cinar, I., 2005. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. *Process Biochem.* 40, 945–949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.022>. Clegg, J.S., Trotman, C., 2002. Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology. In: Abatzopoulos, T., Beard-more, J.,
- Clegg, J., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 129–170.
- Confalonieri, F., Sommer, S., 2011. Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J. Phys. Conf. Ser.* 261, 012005 <https://doi.org/10.1088/1742-6596/261/1/012005>.
- D'Souza, S., Altekari, W., D'Souza, S., 1997. Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (<20%) in the growth medium. *Arch Microbiol* 168, 68–71. <https://doi.org/10.1007/s002030050471>.
- Daly, M., Gaidamakova, E., Matrosova, V., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R., Lai, B., Ravel, B., Li, S., Kemner, K., Fredrickson, J., 2007. Protein oxidation implicated as the primary

determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol.* 5 (4), e92. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050092>.

DasSarma, S., Capes, M., Karan, R., DasSarma, P., 2013. Amino acid substitutions in cold-adapted proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an extremely halophilic microbe from antarctica. *PLoS ONE* 8, e58587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058587>.

Dehkordi, M., Javan, F., 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. Today's World* 1, 39–50. <https://doi.org/10.15412/j.jbtw.01010104>.

Detkova, E., Boltyanskaya, Y., 2007. Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application. *Microbiol.* 76, 511–522. <https://doi.org/10.1134/S0026261707050013>.

Dhont, J., Sorgeloos, P., 2002. Applications of *Artemia*. In: Abatzopoulos, T., Beardmore, J., Clegg, J., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 251–277.

Dyall-Smith, M., Pfeiffer, F., Klee, K., Palm, P., Gross, K., Schuster, S., Rampp, M., Oesterheld, D., Lopez-Garcia, P., 2011. *Haloquadratum walsbyi*: limited diversity in a global pond. *PLoS ONE* 6 (6), e20968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020968>.

Edbeib, M., Wahab, R., Huyop, Fahrul., 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32 (8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>.

El-Sayed, W., Takaichi, S., Saida, H., Kamekura, M., Abu-Shady, M., Seki, H., Kuwabara, T., 2002. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. *Plant Cell Physiol.* 43, 379–383. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf044>.

Falb, M., Muller, K., Konigsmair, L., Oberwinkler, T., Horn, P., 2008. Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12, 177–196. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0138-x>.

Ferjani, A., Mustardy, L., Sulpice, R., 2003. Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiol.* 131, 1628–1637. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017277>.

Fernandez, A., Vera-Gargallo, B., Sanchez-Porro, C., Ghai, R., Papke, R., Rodriguez-Valera, F., 2014. Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front. Microbiol.* 5, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00196>.

Frydrych, M., Silfsten, P., Parkkinen, S., Parkkinen, J., Jaaskelainen, T., 2000. Color sensitive retina based on bacteriorhodopsin. *Biosystems* 54, 131–140. [https://doi.org/10.1016/s0303-2647\(99\)00074-x](https://doi.org/10.1016/s0303-2647(99)00074-x).

Gajardo, G., Beardmore, J., 2012. The brine shrimp *artemia*: adapted to critical life conditions. *Front. Physiol.* 3, 185. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185>.

- Galinski, E., 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37, 273–328. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60148-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60148-4).
- Ghasemi, A., Asad, S., Kabiri, M., Dabirmanesh, B., 2017. Cloning and characterization of halomonas elongate L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 7227–7238. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8456-5>.
- Ghoul, M., Mitri, S., 2016. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol.* 24 (10), 833–845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>.
- Giani, M., Miralles-Robledillo, J.M., Peir'ó, G., Pire, C., Martínez-Espinosa, R.M., 2020. Deciphering pathways for carotenogenesis in haloarchaea. *Molecules* 25 (5), 1197. <https://doi.org/10.3390/molecules25051197>, 6.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., 2007. Biocatalytic ketone reduction — A powerful tool for the production of chiral alcohols — Part I: processes with isolated enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 237–248. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1002-0>.
- Gomariz, M., Martinez-Garcia, M., Santos, F., Rodriguez, F., Capella-Gutierrez, S., Gabaldon, T., 2015. From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic Bacteroidetes generalists. *ISME J.* 9, 16–31. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.95>.
- Goodwin, T., Britton, G., 1980. Distribution and analysis of carotenoids. In: Goodwin, T. (Ed.), *Plant Pigments*. Academic Press, London, UK, pp. 61–132.
- Grant, W.D., Kamekura, M., McGenity, T.J., Ventosa, A., 2001. Class III, Halobacteria class, nov. In: Boone, D., Castenholz, R. (Eds.), *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 294–334. In: Garrity, G., (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenita's, A., Oren, A., 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol. Rev.* 42 (3), 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Hoog, S., Plemenitas,, A., 2000. Hypersaline waters in salterns —Natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbi Ecol.* 32, 235–240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00716.x>.
- Gupta, R., Naushad, S., Fabros, R., Adeolu, M., 2016. A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class Halobacteria: proposal to divide the order Halobacteriales into the families Halobacteriaceae, Haloarculaceae fam. nov., and Halococcaceae fam. nov., and the order Haloferacales into the families, Haloferacaceae and Halorubraceae fam. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 109, 565–587. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0660-2>.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, reparation, senescence, and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp. 199–282.

Hamm, J., Erdmann, S., Eloë-Fadrosh, E., Angeloni, A., Zhong, L., Brownlee, C., Williams, T., Barton, K., Carswell, S., Smith, M., Brazendale, S., Hancock, A., Allen, M., Raftery, M., Cavicchioli, R., 2019. Unexpected host dependency of Antarctic nanohaloarchaeota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 116 (29), 14661–14670. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905179116>.

Haupts, U., Tittor, J., Oesterhelt, D., 1999. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 367–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.367>.

Held, C., Neuhaus, T., Sadowski, G., 2010. Compatible solutes: thermodynamic properties and biological impact of ectoines and prolines. *Biophys. Chem.* 152, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.07.003>.

Hellingwerf, K., 2002. The molecular basis of sensing and responding to light in microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81 (1–4), 51–59. <https://doi.org/10.1023/a:1020521424582>.

Hong, H., Choi, J., 2015. Can the halophilic ciliate *Fabrea salina* be used as a biocontrol of microalgae blooms in solar salterns? *Ocean Sci. J.* 50, 529–536. <https://doi.org/10.1007/s12601-015-0048-7>.

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 (2), 171–200. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.171-200.1995>.

Jehlička, J., Edwards, H.G., Oren, A., 2013. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and bacteria: a Raman spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 106, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.12.081>.

Johnson, E., Schroeder, W., 1996. Microbial carotenoids. In: Fiechter, A. (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, pp. 119–178.

Karmakar, M., Ray, R., 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res. J. Microbiol.* 6, 41–53. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.41.53>.

Kasirajan, L., Maupin-Furlow, J., 2020. Halophilic archaea and their potential to generate renewable fuels and chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 118, 1066–1090. <https://doi.org/10.1002/bit.27639>.

Kempf, B., Bremer, E., 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170, 319–330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>.

Klahn, S., Hagemann, M., 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 13, 551–562. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02366.x>.

Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlic, A., Braunegg, G., 2007. Potential of various archaea-and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. *Macromol. Biosci.* 7, 218–226. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600211>.

- Lattanzio, V., Baronio, M., Oren, A., 2009. Characterization of polar membrane lipids of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber* and possible role of cardiolipin. *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.10.003>.
- Li, Y., Tian, Y., Tian, H., Tu, T., Gou, G., Wang, Q., Qiao, Y., Yang, Y., Ren, T., 2018. A review on bacteriorhodopsin based bioelectronic devices. *Sensors*. 18 (5), 1368. <https://doi.org/10.3390/s18051368>.
- Lillo, J., Rodriguez-Valera, F., 1990. Effects of culture conditions on poly (betahydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2517–2521. <https://doi.org/10.1128/aem.56.8.2517-2521.1990>.
- Liu, M., Liu, H., Shi, M., Jiang, M., Li, L., Zheng, Y., 2021. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. *Microb. Cell Fact* 20 (1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>.
- Luk, A., Williams, T., Erdmann, S., Papke, R., Cavicchioli, R., 2014. Viruses of haloarchaea. *Life (Basel)*. 4, 681–715. <https://doi.org/10.3390/life4040681>.
- Malik, A., Furtado, I., 2018. Clarification of saline textile dye waters using haloarchaeal aerobic sequential bioreactor system. *Int. J. Pharma Biol. Sci.* 8, 22–28. Martínez-Espinosa, R.M., Cole, J.A., Richardson, D., Watmough, N.J., 2011. Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem. Soc. Trans.* 39 (1), 175–178. <https://doi.org/10.1042/BST0390175>.
- Martínez-Espinosa, R.M., Dridge, E., Bonete, M.J., Butt, J., Butler, C., Sargent, F., Richardson, D., 2007. Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00887.x>.
- Martínez-Espinosa, R.M., Richardson, D., Bonete, M.J., 2015. Characterisation of chlorate reduction in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1850 (4), 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.01>.
- Martínez-Espinosa, R.M., Richardson, D., Butt, J., Bonete, M.J., 2006. Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 115–117. <https://doi.org/10.1042/BST0340115>.
- Mateo, R., Dolz, J.C., Aguilar-Serrano, J.M., Belliure, J., Guitart, R., 1997. An epizootic of lead poisoning in greater flamingos (*Phoenicopterus ruber roseus*) in Spain. *J. Wildl Dis.* 33 (1), 131–134. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.1.131>.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R., Antón, J., 2006. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (6), 3887–3895. <https://doi.org/10.1128/aem.02214-05>.
- Mazguene, S., Rossi, M., Gogliettino, M., Palmieri, G., Cocca, E., Mirino, S., Imadalou-Idres, N., Benallaoua, S., 2018. Isolation and characterization from solar salterns of North Algeria of a

haloarchaeon producing a new halocin. *Extremophiles* 22 (2), 259–270.
<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0994-3>.

Mcgenity, T., Oren, A., 2012. Hypersaline environments. In: Bell, E., (Ed.), *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. pp. 402–437.

Mengele, R., Sumper, M., 1992. Drastic differences in glycosylation of related S-layer glycoproteins from moderate and extreme halophiles. *J. Biol. Chem.* 267, 8182–8185.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42424-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42424-6).

Minhas, A., Hodgson, P., Barrow, C., Adholeya, A., 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front. Microbiol.* 7, 546. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>.

Miralles-Robledillo, J.M., Torregrosa-Crespo, J., Martínez-Espinosa, R.M., Pire, C., 2019. DMSO Reductase Family: phylogenetics and applications of extremophiles. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (13), 3349. <https://doi.org/10.3390/ijms20133349>, 8.

Mohan, N., Fullmer, M., Makkay, A., Wheeler, R., Ventosa, A., 2014. Evidence from phylogenetic and genome fingerprinting analysis suggests rapidly changing variations in *Halorubrum* and *Haloarcula* populations. *Front. Microbiol.* 5, 143.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00143>.

Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., Juez, G., 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36 (1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.

Mongodin, E., Nelson, K., Daugherty, S., Deboy, R., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D., Papke, R., Sanchez-Perez, G., Sharma, A., Nesbø, C., MacLeod, D., Baptiste, E., Doolittle, W., Charlebois, R., Legault, B., Rodríguez-Valera, F., 2005. The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 18147–18152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509073102>.

Muñoz, J., Gómez, A., Green, A.J., Figuerola, J., Amat, F., Rico, C., 2010. Evolutionary origin and phylogeography of the diploid obligate parthenogen *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda: anostraca). *PLoS ONE* 5 (8), e11932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011932>.

Nájera-Fernández, C., Zafrilla, B., Bonete, M.J., Martínez-Espinosa, R.M., 2012. Role of the denitrifying Haloarchaea in the treatment of nitrite-brines. *Int. Microbiol.* 15 (3), 111–119. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.164>.

Naor, A., Yair, Y., Gophna, U., 2013. A halocin-H4 mutant *Haloferax mediterranei* strain retains the ability to inhibit growth of other halophilic archaea. *Extremophiles* 17, 973–979. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0579-8>.

Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Maleki-Zanjani, B., Nazemyieh, H., Hejazi, M., Hejazi, M., 2014. Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126: an

extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake. *Adv. Pharm. Bull.* 4, 61–67.
<https://doi.org/10.5681/apb.2014.010>.

Oren, A., 1999b. The enigma of square and triangular bacteria. In: Seckbach, J (Ed.), *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environmental Habitats*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 337–355.

Oren, A., 1999a. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 334–348.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.334-348.1999>.

Oren, A., 2000. Life at high salt concentrations. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A Handbook On the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 3rd ed. Springer -Verlag, New York, pp. 263–283.

Oren, A., 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Int. Microbiol Biotechnol.* 28 (1), 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>.

Oren, A., 2007. The Order Halobacteriales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, pp. 113–164.

Oren, A., 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31, 825–834. <https://doi.org/10.1080/09593330903370026>.

Oren, A., 2012. The function of gas vesicles in halophilic archaea and bacteria: theories and experimental evidence. *Life* 3 (1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/life3010001>.

Oren, A., 2013. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol. Lett.* 342 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12094>.

Oren, A., 2020. The microbiology of red brines. *Adv. Appl. Microbiol.* 113, 57–110.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.07.003>.

Oren, A., Mana, L., 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles* 6, 217–223. <https://doi.org/10.1007/s007920100241>.

Oren, A., Rodr'iguez-Valera, F., 2001. The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 123–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00832.x>.

Park, J., Cho, B., Simpson, A., 2006. *Halocafeteria seosinensis* gen. et sp. nov. (Bicosoecida), a halophilic bacteriovorous nanoflagellate isolated from a solar saltern. *Extremophiles* 10, 493–504. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0001-x>.

Park, K., Kim, T., Cheong, T., Kim, J., Oh, B., Svensson, B., 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltoamylase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1478, 165–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00041-8).

- Pei, R., Cui, X., Yang, X., Wang, E., 2001. Assembly of alternating polycation and DNA multilayer films by electrostatic layer-by-layer adsorption. *Biomacromolecules* 2, 463–468. <https://doi.org/10.1021/bm0001289>.
- Pérez-Pomares, F., Pire, C., Vegara, A., Bautista, V., Bonete, M.J., 2018. Amylolytic activities excreted by the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* to assimilate available starch depend on the nitrogen source. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 18, 1–15. <https://doi.org/10.9734/JABB/2018/43040>.
- Podell, S., Ugalde, J., Narasingarao, P., Banfield, J., Heidelberg, K., 2013. Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. *PLoS ONE* 8, e61692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061692>.
- Polle, J., Tran, D., Ben-Amotz, A., 2009. History, distribution, and habitats of algae of the genus *Dunaliella* Teodoresco (Chlorophyceae). In: Ben-Amotz, A., Polle, J., Subba-Rao, D. (Eds.), *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 1–13.
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., Hatti-Kaul, R., 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1687–1696. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2397-6>.
- Quillaguamán, J., Muñoz, M., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R., 2007. Optimising conditions for poly(β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LD1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 981–986. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0754-2>.
- Raghavan, T., Furtado, I., 2005. Expression of carotenoid pigments of haloarchaeal cultures exposed to aniline. *Environ. Toxicol.* 20, 165–169. <https://doi.org/10.1002/tox.20091>.
- Roberts, M., 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Syst.* 1 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>.
- Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M., Martínez-Espinosa, R., 2015. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Mar Drugs* 13 (9), 5508–5532. <https://doi.org/10.3390/md13095508>.
- Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Kushner, D., 1982. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. *Can. J. Microbiol.* 28, 151–154. <https://doi.org/10.1139/m82-019>.
- Rodríguez-Valera, F., Martín-Cuadrado, A., Rodríguez-Brito, B., Pasic, L., Thingstad, F., Rohwer, F., Mira, A., 2009. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 828–828. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2235>.
- Sánchez, O., Cardona, C., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>.

- Santos, F., Yarza, P., Parro, V., Briones, C., Antón, J., 2010. The metavirome of a hypersaline environment. *Environ. Microbiol.* 12 (11), 2965–2976. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02273.x>.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, i., Heidrich, g., Lentzen, g., Seitz, H., Rampp, M., Schuster, S., Klenk, H., Pfeiffer, F., Oesterhelt, D., Kunte, H., 2011. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environ. Microbiol.* 13 (8), 1973–1994. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02336.x>.
- Sencilo, A., Roine, E., 2014. A glimpse of the genomic diversity of haloarchaeal tailed viruses. *Front. Microbiol.* 5, 84. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00084>.
- Shand, R., Leyva, K., 2007. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfobiotics. In: Riley, M., Chavan, M. (Eds.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 93–109.
- Shivanand, P., Mugeraya, G., 2011. Halophilic bacteria and their compatible solutes—osmoregulation and potential applications. *Curr. Sci.* 100 (10), 1516–1521.
- Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., Pascarella, S., 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Struct. Biol.* 11 (1), 50. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-50>.
- Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., AbdElgawad, H., Arribas-Agüero, A., Monzó-Sánchez, F., Cánovas, V., Pire, C., Martínez-Espinosa, R.M., 2021. Haloarchaea as cell factories to produce bioplastics. *Mar. Drugs* 19, 159. <https://doi.org/10.3390/md19030159>.
- Soppa, J., 2014. Polyploidy in archaea and bacteria: about desiccation resistance, giant cell size, long-term survival, enforcement by a eukaryotic host and additional aspects. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 24 (5–6), 409–419. <https://doi.org/10.1159/000368855>.
- Souza, P., 2010. Application of microbial α -amylase in industry – a review. *Braz. J. Microbiol.* 41, 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>.
- Tadeo, X., Lopez-Mendez, B., Trigueros, T., Laín, A., Castaño, D., Millet, O., 2009. Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea. *PLoS Biol.* 7 (12), e1000257 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000257>.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H., 2012. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules* 17, 3202–3242. <https://doi.org/10.3390/molecules17033202>.
- Timpson, L., Alsafadi, D., Donnchadha, C., Liddell, S., Sharkey, M., Paradisi, F., 2012. Characterization of alcohol dehydrogenase (ADH12) from *Haloarcula marismortui*, an extreme halophile from the Dead Sea. *Extremophiles* 16, 57–66. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0405-0>.

Torregrosa-Crespo, J., Bergaust, L., Pire, C., Martínez-Espinosa, R.M., 2018. Denitrifying haloarchaea: sources and sinks of nitrogenous gases. *FEMS Microbiol. Lett.* 365 (3) <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx270>, 1.

Torregrosa-Crespo, J., Martínez-Espinosa, R.M., Esclapez, J., Bautista, V., Pire, C., Camacho, M., Richardson, D., Bonete, M.J., 2016. Anaerobic metabolism in haloferax genus: denitrification as case of study. *Adv. Microb. Physiol.* 68, 41–85 <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.00>.

Torregrosa-Crespo, J., Pire, C., Bergaust, L., Martínez-Espinosa, R.M., 2020. *Haloferax mediterranei*, an Archaeal model for denitrification in saline systems, characterized through integrated physiological and transcriptional analyses. *Front. Microbiol.* 11, 768.

Torregrosa-Crespo, J., Pire, C., Martínez-Espinosa, R.M., Bergaust, L., 2019. Denitrifying haloarchaea within the genus *Haloferax* display divergent respiratory phenotypes, with implications for their release of nitrogenous gases. *Environ. Microbiol.* 21 (1), 427–436. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.1447>.

Trivedi, S., Prakash, O., Gharu, J., 2011. Different proposed applications of Bacteriorhodopsin. *Recent Pat DNA Gene Seq* 5 (1), 35–40. <https://doi.org/10.2174/187221511794839273>.

Van den Burg, B., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 213–218. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00060-2).

Ventosa, A., Fernández, A., León, M., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., 2014. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* 18 (5), 811–824. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0681-6>.

Ventosa, A., Nieto, J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (2), 504–544. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998>.

Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., Vega, J., 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar. Drugs* 9, 319–333. <https://doi.org/10.3390/md9030319>.

Walter, M., Strack, D., 2011. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.* 28, 663–692. <https://doi.org/10.1039/c0np00036a>.

Wang, W.W., Knopf, G.K., Bassi, A.S., 2005. Protein-based photocell for high-speed motion detection. *Proceedings of the 2005 IEEE Conference on Control Applications CCA 2005*, Toronto, ON, Canada, 28–31 August 2005. IEEE, Piscataway, NJ, USA, pp. 731–736. <https://doi.org/10.1109/CCA.2005.1507215>.

Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M., 1990. Towards a natural system of organisms-proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>.

Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., Ikeda, H., Fukui, T., Nakasone, K., Fujita, N., 2014. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Front. Microbiol.* 5, 100–105. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00100>.

Yin, J., Chen, J., Wu, Q., Chen, G., 2015. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 33, 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.008>.

Zafrilla, B., Martínez-Espinosa, R.M., Alonso, M.A., Bonete, M.J., 2010. Biodiversity of Archaea and floral of two inland saltern ecosystems in the Alto Vinalopó Valley, Spain. *Saline Syst.* 13 (6), 10. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-6-10>.

Zuo, Z., Xue, Q., Zhou, J., Zhao, D., Han, J., Xiang, H., 2018. Engineering *Haloferax mediterranei* as an efficient platform for high level production of lycopene. *Front. Microbiol.* 9, 2893. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02893>.