



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

FILIFE BARBOSA MARQUES DOS SANTOS

Caracterização de *Archaea* halófilas presentes em Sais Alimentares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Cynthia M. Kyaw

Brasília

2023

FILIFE BARBOSA MARQUES DOS SANTOS

Caracterização de *Archaea* halófilas presentes em sais alimentares

Brasília, 27 de Abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cynthia Maria Kyaw
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ricardo Henrique Krüger
Universidade de Brasília

Dra. Aline Belmok de Araújo Dias Iocca
Analista de Biologia Molecular no Laboratório Sabin de Análises Clínicas

Dedico este trabalho a minha mãe e irmão, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e proporcionaram as condições materiais para que me dedicasse a esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de aproveitar este espaço para expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho de mestrado. Primeiramente, quero agradecer à minha mãe; Alda, e meu irmão Pedro Paulo; pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos, inclusive durante o período de isolamento social que enfrentamos. Obrigado por me apoiarem e incentivarem nessa breve jornada. Por acreditarem no meu potencial, aguentar meu mau humor quando chegava em casa após um dia trabalho no laboratório e as coisas as vezes não tinham saído como o planejado.

Agradeço minha orientadora: professora Dra Cynthia Maria Kyaw, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório nesse extenso tempo. Agradeço o coleguismo, a amizade, os ensinamentos, puxadas de orelha sempre visando lapidar esse diamante bruto que sou. Cada palavra foi um aprendizado, agradeço por cada momento de engrandecimento que puder ter ao lado de uma pessoa que no seu profissional tinha tudo de melhor a dar a quem quisesse aprender com muito respeito e generosidade.

Também não posso deixar de agradecer ao técnico de laboratório do nosso corredor; George Louis pela amizade e papos. Seu trabalho foi fundamental para a realização dos experimentos e obtenção dos resultados apresentados neste trabalho. Obrigado pela companhia na hora do almoço. Venceremos, Camarada! Não poderia deixar de agradecer também aos secretários da pós-graduação do Instituto de Biologia pela ajuda com toda a burocracia necessária para a realização do mestrado. Um forte Abraço Luciana de Medeiros.

Quero agradecer também às trabalhadoras e trabalhadores do instituto de Biologia, que com seu empenho tornam nossos corredores e laboratórios limpos e organizados, garantindo que pudesse trabalhar em um ambiente seguro e saudável.

"Os **filósofos** têm apenas interpretado o mundo de maneiras diferentes; a questão, porém, é transformá-lo." (Karl Marx)

RESUMO

Organismos halófilos crescem em ambientes com altas concentrações de sais e são distribuídos nos três domínios da vida: *Bacteria*, *Eukarya* e *Archaea*. Tais ambientes incluem águas salgadas, solos, alimentos salgados fermentados e sais alimentares. A presença de arqueias halófilas em sais alimentares é comum e tem sido descrita em diversos trabalhos científicos, entretanto, não há informações sobre sua ocorrência em sais comercializados no Brasil. Assim, este trabalho teve como objetivo principal a caracterização de arqueias halófilas extremas presentes em sais alimentares, por meio de abordagens dependentes da cultura. Aliquotas de quatro sais comerciais foram inoculadas em dois meios de cultura para halófilos (ATCC e MGM), com a adição de NaCl 3 ou 4 M, em busca de organismos halófilos extremos. Os resultados obtidos sugerem a presença procariotos nos sais analisados, uma vez que o crescimento microbiano foi observado em todos os meios analisados. A maioria das colônias obtidas apresentou coloração avermelhada, típico de *Archaea* halófilas, enquanto a análise microscópica revelou a presença cocos e bacilos, predominantemente Gram negativos. Todas as culturas foram submetidas à extração de DNA, seguido de PCR, com primers específicos para os domínios *Archaea* e *Bacteria*, a fim de verificar que tipos de procariotos se encontravam presentes nos sais analisados. Os amplicons obtidos de alguns dos sais foram então ligados em vetores de clonagem e transformados em *Escherichia coli* XL1-Blue. Os clones recombinantes foram analisados por sequenciamento de DNA e os resultados revelam a presença de *Archaea* cujos genes 16S rRNA exibem alto grau de identidade com os respectivos genes dos gêneros *Halobacterium* e *Halolamina*.

Palavras-chave Sais alimentares, Halófilos extremos, *Archaea*, *Halobacterium*, *Halolamina*.

ABSTRACT

halophile organisms separate in environments with high concentrations of salts and are distributed in the three domains of life: *Bacteria*, *Eukarya* and *Archaea*. Such environments include salt waters, soils, fermented salt foods and food salts. The presence of halophilic Archaea in food salts is common and has been prescribed in several scientific works, however, there is no information about their occurrence in salts sold in Brazil. Thus, this work had as main objective the characterization of extreme halophilic Archaea presents in the feeding salts, through culture-dependent approaches. Aliquots of four commercial salts were inoculated into two culture media for halophiles (ATCC and MGM), with the addition of 3 or 4 m NaCl, in search of extreme halophiles. the results obtained suggest the presence of prokaryotes in the analyzed salts, since microbial growth was observed in all analyzed media. Most colonies had reddish colors, typical of halophilic Archaea, while microscopic analysis revealed the presence of cocci and bacilli, predominantly gram negative. All cultures were maintained with DNA inheritance, followed by PCR, with specific primers for the Archaea and Bacteria domains, to verify which types of prokaryotes were present in the analyzed salts. The amplicons obtained from some of the salts were then ligated into cloning vectors and transformed into *Escherichia coli* x11-blue. The recombinant clones were analyzed by DNA sequencing and the results revealed the presence of Archaea whose 16s rRNA genes exhibit a high degree of identity with the respective genes of the *Halobacterium* and *Halolamina* genera.

Keywords: Food salts, Extreme Halophiles, *Archaea*, *Halobacterium*, *Halolamine*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Tabela 1 — Composição do Meio MGM..... | 25 |
| Tabela 2 — Composição do Meio ATCC- 974..... | 26 |
| Tabela 3 — Características dos iniciadores e tamanho esperado dos fragmentos de DNA amplificados..... | 28 |
| Tabela 4 — Condições empregadas nos ensaios de PCR..... | 29 |
| Tabela 5 — Tipos morfológicos das culturas obtidas nos diferentes meios..... | 36 |
| Figura 1 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas a partir da amostra de Sal do Irã, em meio ATCC 3M..... | 33 |
| Figura 2 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas em meio ATCC 4M, a partir de diferentes amostras de sal..... | 34 |
| Figura 3 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas em meio MGM 3M (A) e 4M (B)..... | 35 |
| Figura 4 — Coloração de Gram de algumas das culturas obtidas..... | 36 |
| Figura 5 — Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos diferentes DNAs genômicos extraídos por meio de lise osmótica com água destilada das culturas líquidas. | 37 |
| Figura 6 — Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos diferentes DNAs genômicos extraídos com fenol-clorofórmio, das culturas crescidas em meios líquidos. | 38 |
| Figura 7 — Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados a partir de culturas crescidas em diferentes sais, empregando os iniciadores 21f/958r, dirigidos ao gene de rRNA 16S do domínio <i>Archaea</i> | 39 |
| Figura 8 — Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados a partir de culturas crescidas em diferentes sais, empregando os iniciadores 27f/1492r, dirigidos ao gene de rRNA 16S do domínio Bacteria. | 40 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 | SAIS ALIMENTARES E ORGANISMOS HALÓFILOS | 11 |
| 1.2 | CLASSIFICAÇÃO DOS ORGANISMOS HALÓFILOS | 12 |
| 1.2.1 | Arqueias Halófilas | 12 |
| 1.2.2 | Bactérias Halófilas | 13 |
| 1.3 | ECOLOGIA DOS PROCARIOTOS HALÓFILOS..... | 14 |
| 1.4 | HALÓFILOS E AS SALINAS SOLARES..... | 14 |
| 1.5 | CARACTERÍSTICAS DE PROCARIOTOS HALÓFILOS | 18 |
| 1.5.1 | Morfologia | 18 |
| 1.5.2 | Pigmentos de Membrana | 19 |
| 1.5.3 | Halocinas | 20 |
| 1.5.4 | Adaptações osmóticas | 21 |
| 1.6 | POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PROCARIOTOS HALÓFILOS..... | 23 |
| 3 | OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | AMOSTRAS DE SAIS | 25 |
| 4.2 | MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO | 25 |
| 4.2.1 | Meio MGM | 25 |
| 4.2.2 | Meio ATCC-974 | 26 |
| 4.2.3 | Preparo do inóculo e condições de cultivo | 26 |
| 4.3 | COLORAÇÃO DE GRAM | 26 |
| 4.4 | EXTRAÇÃO DE DNA GÊNOMICO | 27 |
| 4.4.1 | Lise Osmótica | 27 |
| 4.4.2 | Extração com Fenol/Clorofórmio | 27 |
| 4.5 | PCR DIRIGIDA AO GENE DE RRNA 16S DE <i>ARCHAEA E BACTERIA</i> | 28 |
| 4.6 | PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS | 29 |
| 4.7 | CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS..... | 29 |
| 4.7.1 | Preparação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 4.7.2 | Ligação dos fragmentos amplificados ao vetor de clonagem | 30 |
| 4.7.3 | Transformação por choque térmico | 30 |
| 4.7.4 | Extração de DNA plasmidial | 30 |
| 4.8 | SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA..... | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1 | OBTENÇÃO DE CULTURAS A PARTIR DOS DIFERENTES SAIS | 32 |
| 5.2 | MICROSCOPIA ÓPTICA | 35 |
| 5.3 | EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL | 37 |
| 5.4 | ENSAIOS DE PCR DIRIGIDOS AO GENE DE RRNA 16S DE <i>ARCHAEA E BACTERIA</i> | 38 |
| 5.5 | CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR OBTIDOS 40 | |
| 5.5.1 | Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes | 41 |
| 5.6 | SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISES PRELIMINARES DE BIOINFORMÁTICA..... | 41 |

Delet

Delet

Delet

| | | |
|-------|--|----|
| 5.6.1 | gênero <i>Halobacterium</i> | 44 |
| 5.6.2 | Gênero <i>Halolamina</i> | 44 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 45 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. _____ | 46 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 SAIS ALIMENTARES E ORGANISMOS HALÓFILOS

O cloreto de sódio ("sal") tem sido fundamental para os humanos ao longo da história. Com o surgimento da civilização, o sal tornou-se uma das principais commodities comerciais do mundo antigo, sendo também usado como conservante de diferentes alimentos. O sal é um ingrediente presente em muitos alimentos industrializados e na culinária mundial, sendo um dos principais gêneros alimentícios consumidos pelos seres humanos. O sal era tão valioso que as pessoas o utilizavam para cerimônias religiosas, para selar acordos e como moeda, em algumas culturas. A própria palavra "salário" vem da palavra latina "sal", mostrando assim sua importância na civilização humana (Cirillo et al., 1994).

O sal na indústria de alimentos e bebidas possui três papéis fundamentais, tais como conferir sabor específico ao produto, aprimorar e modificar o sabor de outros ingredientes e reduzir a sensação de amargor (Man, 2007 e Hutton, 2002). No entanto, talvez o principal uso do sal seja como conservante de alimentos, reduzindo a atividade da água e, por consequência, a atividade microbiana já que essa é dependente daquela (Henney, 2010 e Hutton, 2002). As diferentes concentrações de sal presentes nos alimentos como queijos, alimentos processados, conservas, assim como no próprio sal, criam condições que permitem o crescimento de uma grande diversidade de organismos, denominados genericamente de halófilos (Ma et al., 2010).

Há divergências quanto à nomenclatura dos organismos halófilos pois, de acordo com alguns autores, estes são classificados como halotolerantes, halófilos moderados e halófilos extremos. Por outro lado, em algumas publicações há a descrição de halotolerantes, ligeiramente halófilos, halófilos moderados e halófilos extremos. Essas diferenças referem-se à concentração de sal tolerada por cada grupo. Para simplificar, nesse trabalho consideraremos como organismos halotolerantes aqueles capazes de se desenvolver ambientes contendo até 5% de NaCl, mas que apresentam crescimento exuberante em menores concentrações de sal. Halófilos moderados são aqueles que crescem em meios com 5 a 20% de NaCl, como as bactérias *Halomonas elongata* e as arqueias *Haloferax sulfurifontis*, enquanto halófilos extremos são aqueles capazes de crescer em ambientes com concentrações de sal que variam de 20 a 30%, como salinas

ou mesmo cristais de sal alimentar (Kushner e Kamekura, 1988; Olivier, 1994; Lee et al., 2013; Tamang et al., 2020; Sekar et al., 2020;), como exemplos de halófilos extremos temos a espécie bacteriana *Salinibacter Ruber* e a arqueia *Halobacterium salinarum* (Ánton, 2002).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ORGANISMOS HALÓFILOS

Organismos halófilos possuem representantes nos três domínios da vida (Ma et al., 2010) e um dos primeiros relatos sobre a presença destes em alimentos data de 1878, por Farlow, que descreveu a deterioração do bacalhau causada por um avermelhamento, que resultava em um impacto econômico pela impossibilidade da venda do produto. Anos depois se constatou que tal fenômeno era decorrente do crescimento de arqueias halófilas, oriundas do sal utilizado para a salga do bacalhau. No domínio *Eukarya* há representantes halófilos como as algas do gênero *Dunaliella* (Oren, 2005) e o fungo *Hortaea werneckii* (Śliżewska, Struszczyk-Świta, Marchut-Mikołajczyk, 2022).

No domínio *Bacteria* temos *Salinibacter Ruber* (Antón, 2002) e *Halorhodospira halophila* (Imhoff e Süling, 1996), que são halófilos extremos. No domínio *Archaea*, temos organismos halófilos distribuídos em três classes do filo *Euryarchaeota*: *Halobacteria*, *Methanonatronarchaeia* (Sorokin et al., 2018) e *Methanomicrobia*, além do superfilo DPANN: *Nanohaloarchaea*, a arqueia extremamente halófila nanométrica (Feng et al., 2021).

1.2.1 Arqueias Halófilas

A maioria das arqueias halófilas pertence à classe *Halobacteria*, distribuídas nas ordens *Haloferacales*, *Natrialbales* e *Halobacteriales*, embora relatos mais recentes descrevam o isolamento de arqueias metanogênicas, essas halófilas moderadas (Dyall-Smith e Cui, 2021).

A classe *Halobacteria* possui 71 gêneros e um total de 275 espécies, sendo 49,8% destas isoladas do ambiente marinho salino e 50,2% de ambientes salinos continentais (Dyall-Smith e Cui, 2021). Dentre as arqueias metanogênicas de ambientes salinos, temos como exemplo a espécie halófila moderada *Methanocalculus halotolerans*, que cresce em

até 12% de NaCl (McGenty, 2010 e Thauer et al., 2008; Ollivier et al., 1998). No entanto, existem outros representantes halófilos na família *Methanosarcinaceae*, sendo *Methanohalobium evestigatum* a espécie com maior tolerância a concentrações elevadas de sal, crescendo em uma concentração ideal de NaCl de 4,3 mol/L, mas podendo variar em um intervalo de 2,6 mol/L a 5,1 mol/L. (Zhilina e Zavarzin, 1987 e Zhilina e Merkel, 2015). Em 2018 foi proposta uma nova linhagem, "*Methanonatronarchaeia*", com características semelhantes aos membros da classe *Halobacteria* (Sorokin, 2018).

O superfilo DPANN é composto por organismos que possuem como característica unificadora o pequeno tamanho de seus representantes, muitas vezes com dimensões nanométricas, como os membros do gênero *Nanohaloarchaea*, um grupo de arqueias halófilas, identificadas primariamente por meio de estudos metagenômicos (Hamm et al., 2019; Feng et al., 2021).

1.2.2 Bactérias Halófilas

Embora em ambientes salinos a abundância de membros do domínio *Archaea* seja de cerca de 70-95%, as populações bacterianas representam cerca de 5-30% da comunidade microbiana geral (Antón et al., 2008). Bactérias halófilas são encontradas em vários filos, com espécies halotolerantes e halófilas extremas (Ventosa et al., 1998). Essas exibem uma ampla capacidade metabólica e ecológica, o que as torna adaptadas a uma gama de ambientes, os quais muitas vezes não são estáveis, pois apresentam gradientes de concentração de sais em suas composições (Oren, 2008 e Olivier, 1994). Essa tamanha heterogeneidade se mostra presente na diversidade metabólica, com organismos aeróbicos, anaeróbios, fototróficos e heterotróficos (Oren, 2006; Ventosa, 2006 e de la Haba et al., 2011).

Salinibacter, um interessante membro extremamente halofílico das bactérias, anteriormente classificado no filo *Bacteroidetes*, agora é classificado como uma ordem separada, os *Rhodothermales*, no filo *Rhodothermaeota* (Oren et al., 2004). O filo *Cyanobacteria* possui representantes que crescem em altas concentrações de sal, embora não nas concentrações extremas como aquelas encontradas em salinas solares. Dentre as espécies de cianobactérias temos: *Aphanothece halophytica*, *Coleofasciculus chthonoplastes* e *Halospirulina tapeticola* (Oren, 2015). O filo *Proteobacteria* abrange a maioria das espécies halofílicas ou halotolerantes, as quais podem ser isoladas de

ambientes hipersalinos. Há ainda relatos de espécies halófilas nos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Spirochaeta* (Arahal e Ventosa, 2006 e Oren, 2008).

1.3 HALÓFILOS, SAL DE COZINHA E SAÚDE HUMANA

O sal alimentício tem sido objeto de estudo quanto à ocorrência de procariotos halófilos. Os trabalhos de Grant e Gemmell (1998) e McGenty (2000) revelaram ser possível cultivar procariotos halófilos a partir de cristais de halita (NaCl), pois esses permanecem viáveis mesmo quando enclausurados nos cristais. Henriet e colaboradores (2014) indicaram que, por meio da combinação de metagenômica e abordagens de isolamento e cultivo, a ocorrência e diversidade de arqueias halófilas em alguns sais, superam em muito as bactérias nessas amostras. Gibtan e colaboradores (2017) mostraram que a presença de muitos gêneros únicos de bactérias e arqueias em diferentes amostras de sal pode ser atribuída a fatores ambientais locais e regionais que afetam a formação das comunidades microbianas. Satari e colaboradores (2021) sugerem que a origem do sal é um fator importante na determinação da composição microbiana, com os sais de origem marinha apresentando uma maior abundância de arqueias, enquanto os sais não marinhos apresentam uma maior diversidade de bactérias.

Diversos estudos foram conduzidos para analisar diferentes tipos de sais alimentares, o que permitiu a identificação da presença de diversos procariotos halófilos. Dentre esses, as análises revelaram a existência de muitas arqueias halófilas, como a *Halobacterium salinarum*, que foram encontradas em inclusões de cristais de halita (Mormile et al., 2003). Outros trabalhos foram capazes de isolar de sais marinhos comerciais espécies também de arqueias halófilas como *Halobaculum magnesiophilum* (Shimoshige et al., 2013), *Halarchaeum nitratireducens* (Minegishi et al., 2013), *Natronoarchaeum mannanilyticum* (Shimane et al., 2010) e *Salarchaeum japonicum* (Shimane et al., 2011), entre outras. Diversas espécies de bactérias halófilas também foram identificadas, como a *Halogramma salarium* isolada de sal marinho (Kim et al., 2011). Algumas espécies são isoladas de outros alimentos, como *Halococcus thailandensis* (Namwong et al., 2007), encontrado em molho de peixe na Tailândia. Além disso, espécies de arqueias halófilas foram identificadas em alimentos fermentados e no intestino humano, tais como a *Natronoarchaeum mannanilyticum* (Lee, 2013).

Outros trabalhos buscaram estudar a diversidade de procariotos halófilos em um conjunto de sais alimentares. Dentre esses se destacam trabalhos como o de Henriët e colaboradores (2014), que após a análise de 26 sais de qualidade alimentícia, descreveram os gêneros *Haloarcula*, *Halobacterium* e *Halorubrum* como os mais representativos. Outros gêneros, como *Halonotius*, também foram detectados, embora em menor frequência. O uso de sequenciamento de DNA de alto rendimento mostrou que dentre os sais analisados, os gêneros predominantes foram *Halorubrum*, *Halonotius* e *Haloarcula*. Algumas bactérias também foram detectadas em menor proporção como *Salinibacter ruber*, *Halobacillus alkaliphilus*, *Pontibacillus marinus* e *Actinopolyspora halophila*. No estudo de Gibtan e colaboradores (2017) onde foram analisados quatro tipos de sais, os gêneros mais recorrentes de arqueias halófilas foram *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halonotius*, *Natronomonas*, *Halarchaeum*, *Halomicrobium* e *Salarchaeum*, presentes em todos os sais. Já os gêneros mais recorrentes de bactérias halófilas foram *Enterobacter*, *Halovibrio*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. No trabalho de Satari e colaboradores (2021) onde foram analisados seis sais, os gêneros predominantes de arqueias foram *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Hallobellus*, *Natronomonas*, *Haloplanus*, *Halonotius*, *Halomarina* e *Haloarcula*. Dentre as bactérias halófilas, *Sulfitobacter sp.* foi a mais frequente, representada em quase todos os sais.

Em suma, esses estudos destacam a grande diversidade de procariotos halófilos que podem ser encontrados em sais alimentares, incluindo arqueias e bactérias com adaptações únicas para sobreviver em ambientes altamente salinos.

Diante do exposto, devido ao alto consumo de alimentos salgados e do próprio sal como gênero alimentício, não é surpreendente que os procariotos halófilos sejam detectados em humanos (Seck et al., 2019). Com o isolamento de halófilos adaptados a ambientes de baixa salinidade (Purdy et al., 2004) e o conteúdo de sódio médio do intestino saudável humano ser de 135–145 mM (Kaptein et al., 2016), se levantou a possibilidade da coexistência desses organismos com humanos (Oxley et al., 2010). Seck (2018) estima que a quantidade de halófilos na microbiota intestinal humana seja expressiva, com a predominância de membros dos filos bacterianos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e de arqueias do filo *Euryarchaeota*, especialmente espécies metanogênicas. Trabalhos de metagenômica ampliaram o rol de arqueias, principalmente halófilas presentes no ser humano, incluindo diversos organismos pertencentes a *Halobacteria* (Nkamga, Henrissat e Drancourt, 2017), com a

descrição espécies de *Halorubrum koreense*, *Halococcus morrhuae*, *Halorubrum saccharovororum* e *Halorubrum alimentari* (Kim et al., 2020; Gaci et al., 2014; Nam et al., 2008). Khelaifia e colaboradores (2018) isolaram a primeira arqueia halófila, *Haloferax massiliense*, a partir de amostras de fezes humanas, porém ainda não é compreendido se esses procariotos são comensais ou transitórios.

De forma geral estudos buscam compreender o papel desses procariotos nos humanos. Krawczyk, Loch e Kowalewicz-Kulbat (2022) sugerem que *Halorhabdus rudnickae* e *Natrinema salaciae*, procariotos halófilos, têm potencial como adjuvantes imunológicos, o que significa que podem ser usados para ajudar a aumentar a eficácia das respostas imunológicas humanas a patógenos e vacinas. Por outro lado alguns relatos relacionam a microbiota intestinal halófila a algumas doenças crônicas, como a obesidade, de forma que a ingestão excessiva de sal poderia alterar a composição da microbiota intestinal, levando à proliferação de procariotos halófilos e à depleção de bactérias benéficas como a *Akkermansia muciniphila*, uma bactéria benéfica que desempenha papel importante na saúde intestinal e no controle do peso corporal, já que a mesma é responsável por preservar a homeostase do intestino humano (Seck, 2019). Outro relato, associa a presença de halófilos a doenças como diabetes tipo 2, doença celíaca ou doença inflamatória intestinal (Satari et al., 2021). O consumo de sal é também relacionado à hipertensão, principalmente o sal de origem marinha, muito rico em sódio. Por questões culturais e de saúde, há algum tempo está em voga o uso dos sais gourmet, sais de origens diversas como o rosa do Himalaia, o sal Guérande da França, os quais também começaram a integrar o cardápio brasileiro. Esses sais são menos salgados ao paladar, pois contêm menos sódio e mais minerais traços (Carapeto et al., 2018). Alguns estudos foram realizados visando avaliar seus benefícios para a saúde. Por exemplo, Loyola e colaboradores (2022) sugerem que não há diferenças significativas no impacto do consumo de sal rosa do Himalaia em comparação com o sal marinho na pressão arterial e na concentração urinária de sódio em indivíduos com hipertensão arterial.

1.4 ECOLOGIA DOS PROCARIOTOS HALÓFILOS

A maioria do conhecimento sobre os ecossistemas hipersalinos vem das salinas solares mediterrâneas ou lagos salinos de Israel ou Espanha, os quais são utilizados para

a produção de sal (Martínez, 2022). Esses ecossistemas exibem grande diversidade microbiana, com muitos tipos de bactérias e arqueias halófilas (Santos et al., 2012 e Viver et al., 2015). Compreender a ecologia desses ambientes é importante, pois muitos dos procariotos que formam a microbiota desses ambientes influenciam diretamente no processo de produção do sal, seja de forma positiva, melhorando a evaporação, ou de forma negativa quando cianobactérias, por exemplo, secretam grandes quantidades de polissacarídeos viscosos que resultam na formação de sal de baixa qualidade, quebradiço (Rodrigues et al., 2011).

As salinas solares são sistemas de produção de sal a partir da água do mar. Estas consistem em uma série de lagoas de evaporação rasas conectadas por tubos/canais que direcionam a salmoura para lagoas menores onde a salinidade aumenta de forma sucessória devido à evaporação (Davis, 2009). Durante o processo de evaporação, ocorre uma precipitação sequencial, que segue a ordem: carbonato de cálcio, sulfato de cálcio (gesso) e NaCl (halita) (Al-Shammiri, 2002). Essa evaporação leva a diferentes gradientes de salinidade, que permite florações sequenciais de diferentes espécies microbianas adaptadas às diferentes faixas de salinidade. Desta forma, são suportadas populações de algas (Oren, 2014), crustáceos do tipo artémia (Mohebbi, 2010), larvas de moscas de salmoura, protozoários (Harding, 2018) e fungos (Oren, 2009).

Há quatro fatores que dirigem a vida desses microrganismos nas salinas solares: a concentração de sal, pH, disponibilidade de nutrientes e aeração (Pedrós-Alió, 2005). Em relação à salinidade foi observado que, quanto mais ela aumenta, menor a diversidade de microrganismos (Benlloch et al., 2002). Em relação ao pH, esse é totalmente variável e depende da composição iônica. Quanto ao oxigênio, nas salmouras ele é em baixa concentração e até mesmo ausente. E as concentrações de nutrientes encontradas nas salinas solares dependem de uma variedade de parâmetros, como fatores geográficos, o estado dos nutrientes que estão presentes na água do mar, a natureza e as práticas do manejo (Gasol et al., 2004). Nesses sistemas há também a formação de tapetes microbianos, os quais têm papéis fundamentais de evitar vazamentos das salinas e auxiliar na evaporação (Wong et al., 2016; SØRENSEN et al., 2004; Desmarais, 1995).

O uso de técnicas dependentes de cultivo resultou no isolamento de muitas arqueias da família *Halobacteriaceae* a partir de várias salinas solares, como representantes do gênero *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum* e *Haloferax*, bem como de bactérias extremamente halófilas, sendo *Salinibacter ruber* o principal

representante (Antón et al., 2008; Benlloch et al., 2002; Oren, 2002). Análises metagenômicas em salinas solares relatam frequentemente a presença dos gêneros *Halorubrum* e *Haloquadratum* (Pàsic et al., 2009), além de *Nanohaloarchaea* (Narasingarao et al., 2012). Em relação às bactérias, estudos realizados em salinas solares com diferentes concentrações de sal revelam que salinas de baixa concentração de sal, possuem filotipos abundantes de *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Tenericutes*. Nas salinas de concentrações moderadas e elevadas de sal os filos bacterianos mais representativos foram *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Verruimicrobia* (Mani, 2020 e Oren, 2008).

O uso de salinas solares no Brasil para a produção de sal foi iniciado pelos colonizadores portugueses, que estabeleceram as primeiras minas de sal localizadas em pontos de deságua dos rios que se encontram com o oceano atlântico, especialmente no Nordeste. A partir dos anos 60-70 esta atividade foi modernizada pela substituição da extração manual pela mecanizada, dando um caráter de produção industrial do sal. As salinas mecanizadas constituem a maior parte da produção de sal no Brasil, restando às salinas manuais o valor histórico. Atualmente, o principal estado produtor é o Rio Grande do Norte, com 97% da produção de sal do país, sendo o município de Macau o maior produtor de sal do estado (Costa et al. 2013, Saldanha et al., 2017 e Costa et al., 2015). Apesar de estudos em salinas do Rio de Janeiro revelarem a ocorrência de espécies de cianobactérias dos gêneros *Phormidium* e *Lyngbya*, há ainda uma enorme carência de trabalhos envolvendo a caracterização das comunidades microbianas presentes nestes ambientes em nosso país (Feder, 2013).

1.5 CARACTERÍSTICAS DE PROCARIOTOS HALÓFILOS

1.5.1 Morfologia

Embora a grande maioria das bactérias e arqueias halófilas apresentem morfologia cocóide ou bacilar, algumas espécies de arqueias exibem morfologia bastante peculiar, como formas triangulares, no caso de *Haloarcula japonica* ou quadradas, como *Haloquadratum walsbyi*, além de representantes pleomórficos (Oren, 1999; Burns et al., 2007; Birbir et al., 2007; Juez et al., 1986; Arnoldi et al., 2000).

1.5.2 Pigmentos de Membrana

A presença de procariotos halófilos podem ser detectada a olho nu em ambientes salinos devido às cores vermelho, laranja, roxo ou verde vibrantes, presentes nesses ambientes (Oren, 2006). Tais colorações são devidas aos pigmentos encontrados nas membranas desses organismos, que se tornam visíveis quando a população aumenta nos estados de florações. A intensidade desses pigmentos depende do estado nutricional da célula e da salinidade do meio (Ali et al., 2016).

As arqueias halófilas possuem geralmente uma coloração que varia do alaranjado ao vermelho (Khanafari, Khavarinejad e Mashinchia; 2010), devido ao alto conteúdo de pigmentos retiniais (bacteriorodopsinas, halorodopsinas, rodopsinas) e carotenoides (bacterioruberinas “c-50” e β -carotenos) em suas membranas (Oren e Rodrigues-Valera, 2001). Algumas raras espécies, como *Halorhabdus tiamatea*, não apresentam pigmentação (Antunes et al., 2008).

Duas funções são atribuídas à bacterioruberina: proteção contra danos por altas intensidades de UV e reforço da estrutura da membrana celular (Rodrigo-Baños et al., 2015). Os pigmentos carotenóides, como os da *Halobacterium salinarum*, também protegem as células contra a radiação UV e auxiliam na foto-reativação (Jehlicka; Edwards; Oren, 2013). Os pigmentos retiniais têm papel importante para as arqueias destacando-se a bacteriorodopsina da bomba de prótons, a halorodopsina da bomba de cloreto e duas rodopsinas sensoriais envolvidas na detecção da luz para fototaxia (Song et al., 2014 e Andersson, 2009).

A maioria dos estudos sobre bombas acionadas pela luz em arqueias halófilas foram realizados com *Halobacterium salinarum*, que sob determinadas condições apresenta uma mudança de coloração de vermelho para o roxo. A *Halobacterium salinarum* produz grandes quantidades de um pigmento púrpura, a bacteriorodopsina, cuja presença confere vantagens ecológicas, pois permite às células utilizarem diretamente a energia luminosa quando as fontes energéticas orgânicas são escassas e há baixas concentrações de oxigênio (Oren, 2010).

Esses pigmentos convertem a energia dos raios luminosos em energia química por meio de uma bomba de prótons H^+ . Esses pigmentos são locais de fotossíntese, mas diferentemente da clorofila, a luz não é utilizada para gerar poder redutor e fixar o CO_2 ,

sendo usada apenas como um suplemento para as arqueias quando se encontram sob condições de baixa concentração de O₂ (Rozenberg, 2021).

A bactéria *Salinibacter ruber* possui coloração vermelho/alaranjada devido à presença de pigmentos carotenoides, como a salinixantina (C40) e de pigmentos retinais, como a xantorrodopsina. A salinixantina funciona como uma antena de luz, transferindo energia para o grupo retinol da xantorrodopsina, que é uma bomba de prótons similar à bacteriorrodopsina (Balashov et al., 2005). Além disso, a salinixantina pode ser utilizada como biomarcador, uma vez que estudos indicam que sua presença pode representar de 5% a 7,5% do total de pigmentos em salmouras naturais (Martínez Martínez et al., 2022).

Os pigmentos de bactérias fotossintéticas, principalmente em cianobactérias que vivem em tapetes microbianos, possuem clorofila e ficocianina que conferem uma cor azul-esverdeada ao sedimento (De Beer et al., 2017). Há uma abundância de diferentes pigmentos carotenoides, principalmente mixoxantofilas e equinenona, que conferem coloração amarelo-alaranjada aos tapetes (Sorensen et al., 2005).

1.5.3 Halocinas

Ambientes hipersalinos podem apresentar comunidades microbianas complexas, onde diferentes membros interagem e competem entre si por alimento e espaço. Halocinas são compostos produzidos por arqueias, que inibem o crescimento de outros organismos. As “arqueocinas” foram detectadas pela primeira vez em culturas de *Halobacterium* e, por essa razão, receberam o nome de halocinas (Rodríguez-Valera, 1982). Atualmente, o termo refere-se aos diferentes compostos antimicrobianos secretados por arqueias e bactérias halófilas (Kumar e Tiwari, 2019). Algumas halocinas são específicas para certas espécies ou gêneros, enquanto outras têm um amplo espectro de ação.

Halocinas são divididas em proteínas halocinas e micro-halocinas, com base em sua massa molecular. As micro-halocinas, são caracterizadas pela capacidade de resistir às baixas concentrações de sal, aquecimento e armazenamento de longo prazo, enquanto as halocinas são proteínas geralmente mais sensíveis ao estresse ambiental (Shand e Leyva, 2007). As halocinas podem atingir massas moleculares de até 35 kDa, enquanto as micro-halocinas não ultrapassam 3,6 kDa. Até o momento quinze halocinas foram descritas e somente três genes, halC8, halS8 e halH4, foram sequenciados. Produtos com propriedades semelhantes às halocinas, produzidos por arqueias do gênero *Sulfolobus*,

foram também identificados e denominados sulfolobocinas (O'Connor et al., 2002; Prangishvili et al., 2000).

1.5.4 Adaptações osmóticas

Com relação aos processos realizados para obter energia e carbono para o crescimento, o mundo halófilo é tão diversos quanto esperado, em vista da grande diversidade filogenética dos procariotos presentes em altas concentrações de sal (Oren, 2002). De forma que processos metabólicos que acontecem em ambientes com baixas concentrações de sal não ocorrem em ambientes de alta concentração, assim como em ambientes tipicamente hipersalinos. Para que tais processos ocorram são necessárias adaptações celulares que tornem o conteúdo citoplasmático osmoticamente equivalente ao meio externo (Oren, 1999).

Dentre essas adaptações, há uma bomba de sódio (antiportador Na^+/H^+ dependente de energia) que expulsa o Na^+ do citoplasma. Porém o sódio deve ser substituído para manter o equilíbrio osmótico, sendo isto feito com diferentes componentes moleculares, nos diferentes microrganismos. As principais formas de substituição incluem a estratégia salt-in, que é o acúmulo de íons de potássio e cloreto em concentrações semelhantes às concentrações iônicas no meio, e a salt-out, mais comum, exclui íons e acumula pequenos solutos orgânicos eletricamente neutros, denominados solutos compatíveis (Siglioccolo, 2011).

A estratégia salt-in, requer uma adaptação de toda a célula no que tange sua maquinaria, proteínas/enzimas e funções celulares, já que o funcionamento de certos processos e a atividade de enzimas cessam ou diminuem na presença de altas concentrações de sais. Essas adaptações envolvem principalmente as proteínas, que assumem natureza ácida, devido à maior presença de resíduos de glutamato e aspartato, conferindo carga negativa à molécula. A estratégia de salt-in tem a vantagem de ser energeticamente mais barata, quando comparada à síntese de solutos osmóticos orgânicos. Portanto, aqueles microrganismos que usam a estratégia salt-in são organismos halófilos sempre adaptados às maiores concentrações de sal (Oren, 2013).

Por outro lado, o salt-out é muito comum e envolve a síntese de solutos a partir de compostos encontrados no ambiente, ou sua absorção quando já se encontram presentes no ambiente. A vantagem dessa adaptação se reflete na capacidade de adaptação a

diversas concentrações de sais. A diversidade de solutos utilizados pelos procariotos halófilos é variada, incluindo glicerol e outros polióis, açúcares simples como sacarose e trealose, diferentes derivados de aminoácidos, como glicina betaína e ectoína, entre outros (Roberts, 2005 e Welsh, 2000).

1.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PROCARIOTOS HALÓFILOS

A bacteriorodopsina é uma proteína encontrada em *Halobacterium salinarum* que atua como uma bomba de prótons quando exposta à luz solar e tem diversas aplicações em tecnologia aqui se destacam os vários representantes do gênero *Halobacterium*, como a *Halobacterium halobium* (Das et al., 2019 e Wu, Lin e Song, 2022). Os carotenoides são antioxidantes com aplicações em biotecnologia, como corantes em alimentos e agentes antitumorais, mas ainda não são produzidos em grande escala a partir de forma sintética. A produção de pigmentos naturais usando fábricas celulares é vista como uma abordagem promissora para a obtenção de carotenoides em grande escala. Ambas as proteínas são altamente estáveis e resistentes a condições extremas de temperatura e salinidade (Rodrigo-Baños, 2015; Giani et al., 2019 e Moopantakath et al., 2023).

A ectoína e betaína possuem múltiplas aplicações, como em cosméticos e como possíveis tratamentos para doenças como a asma e a infiltração adiposa do fígado (Martínez e Martínez-Espinosa, 2022; Hoffmann, 2012 e Roberts, 2005). As enzimas halofílicas são altamente estáveis em condições extremas de salinidade e temperatura, e são utilizadas em processos biotecnológicos como hidrolases, desidrogenases e enzimas nitrito e nitrato redutases, como a *Halobacterium cutirubrum* que produz lipossomas (DasSarma, 2015; Mesbah, 2022 e Martínez-Espinosa et al., 2022). Além disso, compostos com potencial anticancerígeno, como as enzimas L-asparaginase e L-glutaminase, foram descobertos em espécies halofílicas e halotolerantes (Corral, 2020).

polihidroxialcanoatos (PHAs), uma família de biopolímeros, como alternativa ecológica aos plásticos baseados em petroquímicos. Dois compostos dessa família, o PHB e o PHBV, são particularmente interessantes por suas propriedades e uso na indústria. A produção desses compostos por microrganismos halofílicos tem vantagens como a alta concentração de sal em que podem crescer, uso de fontes de água salgada, substratos de baixo custo e recuperação simples dos PHAs. Espécies halofílicas de arqueias são interessantes para a produção de PHAs devido às suas propriedades únicas, como a capacidade de crescer em ambientes extremos de alta salinidade e temperaturas elevadas, e podem produzir PHAs com propriedades físicas e químicas diferentes das produzidas pelas bactérias. *Haloferax mediterranei* é uma das espécies mais utilizadas para produzir bioplásticos (Abdallah et al., 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização fenotípica e genética de procarióticos presentes em amostras de sal alimentício.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivo e isolamento de organismos procarióticos presentes em amostras de sal alimentício.

Comparação da eficiência de diferentes meios de cultura e diferentes condições de cultivo na obtenção de isolados microbianos.

Caracterização morfológica dos isolados, por técnicas de microscopia e coloração.

Caracterização filogenética dos isolados, por PCR dirigida ao gene codificador de rRNA 16S, seguida de sequenciamento de DNA dos produtos obtidos.

Análise da diversidade microbiana presente nas amostras de sal analisadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE SAIS

Foram utilizados três sais de qualidade alimentar, de origens e aspectos morfológicos diversos, conforme identificado abaixo: Sal Rosa do Himalaia (Smart), de grãos rosados; Sal Francês Guérande (Smart), de grãos acinzentados e Sal do Irã/Pérsia (Drogheria Alimentari), de grãos azulados.

3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Tendo em vista a grande diversidade de meios de cultura utilizados para o crescimento de halófilos, optamos por testar duas formulações distintas: o meio MGM (Dyall-Smith, 2009), por ser um meio bastante utilizado e também por sua composição bastante simples. O segundo meio, denominado ATCC-974 (www.atcc.org), foi escolhido por tratar-se de um meio anteriormente utilizado em nosso laboratório, para o cultivo e manutenção de *Haloferax volcanii*.

3.2.1 Meio MGM

Os meios MGM foram confeccionados adicionando-se NaCl para as concentrações finais de 3 M e 4 M, visando o enriquecimento de organismos halófilos extremos. No caso do uso de meios sólidos, 1,5% de ágar foi adicionado aos meios (Tabela 1).

Tabela 1 — Composição do Meio MGM.

| Componentes | 3M NaCl | 4M NaCl |
|----------------------|----------|---------|
| Peptona | 0,5 g | 0,5 g |
| Extrato de levedura | 0,1 g | 0,1 g |
| NaCl | 17,532 g | 23,376g |
| H2O destilada q.s.p. | 100 mL | 100 mL |

O pH do meio foi ajustado para 7,5 e esterilizado em autoclave

3.2.2 Meio ATCC-974

Os meios ATCC foram também adicionados de NaCl para as concentrações finais de 3M e 4 M, visando o enriquecimento de organismos halófilos extremos. No caso do uso de meios sólidos, 1,5% de ágar foi adicionado aos meios (Tabela 2).

Tabela 2 — Composição do Meio ATCC- 974.

| Componentes | 3M NaCl | 4M NaCl |
|--------------------------------------|----------|----------|
| MgCl ₂ | 2,342 g | 1,71 g |
| K ₂ SO ₄ | 0,5 g | 0,5 g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,013 g | 0,013 g |
| Triptona | 0,5 g | 0,5 g |
| Extrato de levedura | 0,5 g | 0,5 g |
| NaCl | 17,532 g | 23,376 g |
| H ₂ O destilada q.s.p. | 100 mL | 100 mL |

O pH do meio foi ajustado para 6,8 e esterilizado em autoclave.

3.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

Alíquotas de 1% de cada sal foram pesadas em balança de precisão, sob condições assépticas em fluxo laminar, e adicionadas aos diferentes meios de cultura líquidos. Em seguida, os tubos foram agitados manualmente para dissolver as amostras de sal nos meios, sendo então incubados em shaker a 37°C, sob agitação de 120 rpm. Ao se observar turvação nos meios líquidos, alíquotas de cada cultura foram semeadas nos respectivos meios sólidos, sendo as placas incubadas em estufa a 37°C, até o crescimento de colônias visíveis.

3.3 COLORAÇÃO DE GRAM

Amostras dos diferentes cultivos foram submetidas à coloração diferencial de Gram. Por se tratar de organismos halófilos, o procedimento apresenta pequenas modificações, conforme descrito a seguir. Uma vez preparados os esfregaços, esses foram secos à temperatura ambiente e, em seguida, imersos em solução de ácido acético 2% por

5 minutos. Esse passo é necessário pois a alta concentração de cristais salinos em meios de cultura para halófilos prejudica a fixação dos corantes pelas células. Dessa forma, a solução de ácido acético tem o papel de solubilizar esses cristais, favorecendo a absorção dos corantes (Dyall-Smith, 2009). Transcorrido o tempo, a solução ácida foi escorrida e as lâminas novamente secas à temperatura ambiente, para então serem submetidas a protocolo convencional de coloração de Gram.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GÊNOMICO

Foram utilizados dois procedimentos para a extração de DNA total: lise osmótica, ou extração por meio de tratamento com fenol/clorofórmio.

3.4.1 Lise Osmótica

No caso de culturas em meios líquidos, alíquotas de 1,5 mL foram transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 5000 g/4 °C/2 min. O sobrenadante foi descartado e, em casos de culturas com pouco crescimento, o processo foi repetido, visando a obtenção de maior quantidade de células. Em seguida, foram adicionados 100 µL de água destilada ao sedimento, homogeneizando-se suavemente. As amostras foram incubadas em água fervente por 5 minutos e novamente centrifugadas sob as mesmas condições, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo.

3.4.2 Extração com Fenol/Clorofórmio

Os sedimentos celulares provenientes de meios líquidos foram ressuspensos em tubos tipo eppendorf contendo 472 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), 8 µL de RnaseA 4 mg/mL e 3 µL de Proteinase K 20 mg/mL. Em seguida, foram adicionados 15 µL de SDS 20% e os tubos foram mantidos em estufa a 37 °C/1 h. Em seguida, foram adicionados aos tubos 500 µL de clorofane (25 V de fenol:24 V de clorofórmio:1 V de álcool iso-amílico), sendo então homogeneizados e submetidos à centrifugação a 8000 g/4 °C/5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e adicionados de 500 µL de clorofil (24 V de clorofórmio:1 V de álcool iso-amílico),

seguido de nova homogeneização e centrifugação sob as mesmas condições. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos aos quais se adicionou NaCl para a concentração final de 0,3 M e 2,5 V de etanol 100% gelado. Os tubos foram então armazenados a -20 °C por uma noite e centrifugados a 12.000 g/4 °C/20 min. Os sobrenadantes foram descartados e cada sedimento lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições e descarte do etanol 70%. Os tubos foram invertidos e mantidos à temperatura ambiente até a secagem dos sedimentos. Os DNA extraídos pelos dois procedimentos tiveram sua qualidade e concentração estimadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (solução estoque de 10 mg/mL), empregando-se como referência o marcador de massa molecular 1 kb Ladder (Kasvi).

3.5 PCR DIRIGIDA AO GENE DE RRNA 16S DE *Archaea* E *Bacteria*

Foram realizadas reações de PCR com iniciadores específicos para os domínios *Archaea*: 21f/958r (DeLong, 1992) e *Bacteria*, 27f/1492r (Lane, 1991). As reações de PCR foram preparadas em sistemas com volume final de 30 µL, aos quais foram adicionados volumes de DNA para concentrações finais de 10 a 50 ng. Os demais reagentes foram adicionados nas seguintes concentrações finais: 1X de tampão de reação, 1,5 µM de MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTPs e 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). A efetividade de amplificação dos fragmentos de DNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. As características dos iniciadores e condições empregadas nos ensaios de PCR são apresentadas nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3 — Características dos iniciadores e tamanho esperado dos fragmentos de DNA amplificados.

| Domínio | Sequência (5'- 3') | Tamanho |
|-----------------|----------------------------|---------|
| <i>Archaea</i> | | |
| 21F | TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA | 937 pb |
| 958R | YCC GGC GTT GAM TCC AAT T | |
| <i>Bacteria</i> | | |
| 27F | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | 1465 pb |
| 1492R | GGT TAC CTT GTT ACG ACT T | |

Y: pirimidina, M: adenina ou citosina.

Tabela 4 — Condições empregadas nos ensaios de PCR.

| Etapas | <i>Archaea</i> | | <i>Bacteria</i> | |
|--|----------------|----------------|-----------------|--------|
| | Temperatura | Tempo | Temperatura | Tempo |
| 1. Desnaturação | 94 °C | 1 min | 94 °C | 5 min |
| 2. Desnaturação | 94 °C | 1 min | 94 °C | 1 min |
| 3. Anelamento | 55 °C | 1 min | 55 °C | 1 min |
| 4. Extensão | 72 °C | 1 min e 30 seg | 72 °C | 2 min |
| Repetição das etapas 2 a 4 por 29 vezes | | | | |
| 5. Extensão Final | 72 °C | 10 min | 72 °C | 10 min |
| 6. Manutenção | 4 °C | | 4 °C | |

3.6 PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS

Todos os produtos de amplificação resultantes das reações de PCR foram submetidos à purificação com o kit Wizard® Genomic (Promega), conforme as instruções do fabricante.

3.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

3.7.1 Preparação de células competentes de *Escherichia coli*

Células de *E. coli* XL1-Blue foram inoculadas em 10 mL de meio Luria Bertani (Tripton: 10 g/L, Extrato de levedura: 5,0 g/L, Cloreto de Sódio: 5,0 g/L e H₂O destilada q.s.p.: 1000ml. pH ajustado para 7,0 e esterilizado em autoclave) e incubadas em estufa a 37 °C por uma noite. Após esse período, 300 µL da cultura foram inoculados em 30 mL de meio LB, sendo o sistema incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm até que a densidade óptica (OD₆₀₀) da cultura alcançasse um valor entre 0,2 e 0,3. Neste momento, a cultura foi centrifugada a 4000 g/4 °C/10 min, o sobrenadante descartado, o sedimento ressuspenso em 15 mL de solução gelada de cloreto de cálcio 100 mM e incubado em gelo por 30 minutos. Após a incubação, a cultura foi novamente centrifugada 2000 g/4 °C/10 min, sendo o sobrenadante descartado, o sedimento gentilmente ressuspenso em 1 mL da solução de cloreto de cálcio 100 mM fria e incubado em gelo, até sua utilização.

3.7.2 Ligação dos fragmentos amplificados no vetor de clonagem

Os fragmentos amplificados a partir do DNA total das amostras foram purificados e ligados ao vetor pGEM-T easy (Promega), na proporção de 3:1 de inserto em relação ao vetor. Os sistemas de ligação foram mantidos por 1h em temperatura ambiente e em seguida foram armazenados a 4 °C por uma noite.

3.7.3 Transformação por choque térmico

Alíquotas de 100 µL das células competentes de *E. coli* XL1-Blue foram adicionadas a tubos de hemólise contendo 5 µL de cada sistema de ligação. Os tubos foram incubados em gelo por 30 min e, em seguida, submetidos ao choque térmico em banho a 37 °C, por 5min. Após transcorrido o tempo, 1 mL de meio LB foi adicionado a cada tubo e os sistemas incubados em estufa a 37 °C por 1h. Após a incubação, alíquotas de 100 a 200 µL das células transformadas foram semeadas em ágar LB suplementado com ampicilina (100µg/mL), Xgal (0,00625%) e IPTG (0,5mM), com o auxílio de pérolas de vidro estéreis. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por uma noite.

Os clones recombinantes foram inoculados em meio LB suplementado com ampicilina (100µg/mL), incubados por uma noite em shaker a 37 °C/120 rpm. Após a incubação, uma alíquota de 500 µL de cada cultura foi adicionada a tubos tipo eppendorf estéreis, contendo o mesmo volume de glicerol 70%, que foram armazenados a -20 °C. O restante de cada cultura foi utilizado para a extração de DNA plasmidial.

3.7.4 Extração de DNA plasmidial

Alíquotas de 1,5 mL de cada cultura recombinante foram centrifugadas a 6000 g/4 °C/5 min por duas vezes, sendo o sobrenadante descartado em cada etapa. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 100 µL de solução I (50mM de glicose, 25mM de Tris-HCl, 10mM de EDTA, pH 8,0) e incubados por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200µL de solução II (1% SDS, 0,2M de NaOH) foram adicionados aos tubos, que foram suavemente homogeneizados por inversão e incubados em gelo por 5 min. Transcorrido o tempo, foram adicionados 150 µL de solução III (3M de acetato de potássio, 2M de ácido acético glacial), nova homogeneização foi realizada e os tubos foram novamente incubados por 5 min em gelo.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12000 g/4 °C/5min, sendo os sobrenadantes transferidos para novos tubos, adicionados de 5µL de RNase A (10mg/mL) e incubados em estufa a 37 °C/1h. Em seguida, um volume igual de clorofane foi adicionado às amostras, que foram então homogeneizadas por inversão, centrifugadas a 7000 g/4 °C/5 min, transferindo-se ao final do processo a fase aquosa para novos tubos. Um volume igual de clorofil foi adicionado a cada tubo, repetindo-se o processo de homogeneização, centrifugação e transferência da fase aquosa para novos tubos.

Cada sistema foi então adicionado de 2,5 V de etanol 100% gelado, incubado a -20 °C por uma noite, para a precipitação do DNA plasmidial. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 12000 g/4 °C/30 min, o sobrenadante descartado e 300µL de etanol 70% gelado foram adicionados às amostras. Os tubos foram então mais uma vez centrifugados nas mesmas condições anteriores. Após o descarte dos sobrenadantes os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para a secagem dos sedimentos, que foram posteriormente ressuspensos em diferentes volumes de água destilada, de acordo com seus tamanhos. A qualidade e concentração dos plasmídeos obtidos foram analisadas em eletroforese de gel de agarose 1%, com o marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder (Kasvi).

3.8 SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM DE DNA E ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.

Os plasmídeos contendo os fragmentos de interesse foram sequenciados no Centro de Genômica de Alto Desempenho do DF. Os iniciadores 21f foram utilizados no sequenciamento, dos produtos de PCR dirigidos ao gene de rRNA 16S de Archaea. As sequências de DNA obtidas foram analisadas quanto à qualidade pelo algoritmo PHRED (Ewing et al., 1998), através da ferramenta *Electropherogram quality analysis*, disponível no endereço eletrônico: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Foram selecionadas as sequências com mais de 250 nucleotídeos e que apresentaram valor de Phred superior a 20. As sequências obtidas foram comparadas a sequências de DNA disponíveis no banco de dados do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Estas também foram comparadas entre si para avaliar o grau de identidade, por meio da ferramenta BLAST, disponível online (Altschul et al., 1990).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS A PARTIR DOS DIFERENTES SAIS

O cultivo microbiano em meios hipersalinos, como aqueles empregados nesse trabalho, é geralmente lento, sendo observado ao longo de semanas. Além do NaCl, outros sais como KCl, CaCl₂, MgCl₂, Na-acetato, Na₂S₂O₃, NaBr e NaNO₃ podem ser adicionados aos meios em diferentes concentrações, dependendo das necessidades dos organismos em questão (Sui, Liu, e Deng, 2014; Schneegurt, 2012; Rodríguez-Valera; Ruíz-Berraquero e Ramos-Cormenzana, 1980).

O cultivo de microrganismos halófilos apresenta desafios que exigem a escolha adequada dos meios e condições de crescimento. Os meios utilizados nesse trabalho foram escolhidos por terem sido adotados por diferentes autores para o cultivo de várias espécies e também devido à disponibilidade dos ingredientes em nosso laboratório. A adição de NaCl aos meios de cultura, nas concentrações finais de NaCl de 3 e 4 M, foi o principal fator utilizado para selecionar espécies halófilas extremas, uma vez que concentrações inferiores de sal permitem o crescimento de uma extensa variedade de organismos.

Após a inoculação dos diferentes sais nos meios MGM e ATCC, contendo 3 ou 4 M de NaCl, foi observado o crescimento microbiano entre 15 e 60 dias, revelado pela turbidez dos meios de cultura. Esse tempo de crescimento é compatível com o tempo descrito em manuais que descrevem o isolamento e cultivo de halófilos (Dyall-Smith, 2009). Após 15 dias de incubação, todas as amostras de sal apresentavam crescimento no meio ATCC 4M, enquanto em ATCC 3M a turvação era ainda muito discreta. Nos meios MGM 3 e 4 M as amostras de sal francês e sal rosa exibiram pequena turvação, enquanto a amostra de sal do Irã não apresentava qualquer indício de crescimento. A necessidade de períodos mais longos de incubação é muito recorrente nos trabalhos envolvendo o cultivo de halófilos (Pedrós-Alió et al., 2000; Bolhuis et al., 2004). Como discutido amplamente na literatura, o cultivo de micro-organismos em meios artificiais apresenta desafios, pois amostras ambientais podem abrigar grandes comunidades que, quando submetidas ao crescimento *in vitro*, podem encontrar condições que favoreçam determinados grupos de organismos, em detrimento de outros.

Alíquotas das culturas que apresentavam crescimento em meios líquidos foram inoculadas em meios sólidos, a fim de se verificar o aspecto macroscópico das colônias resultantes. Nas culturas obtidas a partir das amostras dos sais francês, rosa e do Irã inoculadas em meio ATCC 3M, foi possível se observar colônias transparentes, como exemplificado na **Figura 1**. Geralmente, arqueias halófilas produzem colônias com pigmentação avermelhada quando cultivadas em meios artificiais. O mesmo fenômeno ocorre com a espécie bacteriana *Salinibacter ruber*. Por outro lado, a ocorrência de colônias transparentes é um evento raro em arqueias halófilas, excetuando-se a espécie *Halorhabdus tiamatea* (Antunes et al., 2008). Por essa razão, poderíamos especular que as espécies presentes seriam representantes do domínio *Bacteria*.

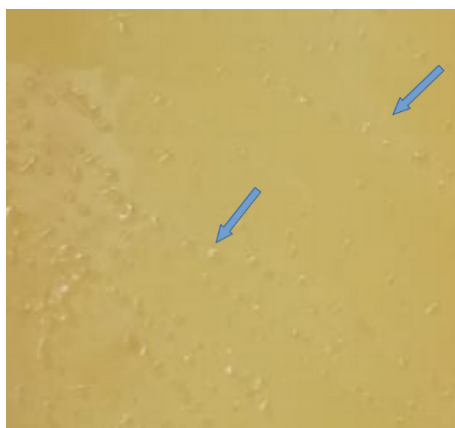


Figura 1 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas a partir da amostra de Sal do Irã, em meio ATCC 3M. As colônias resultantes apresentam não possuem pigmentação, como indicado pelas setas azuis.

Os cultivos das amostras de sal francês, rosa e do Irã em meio ATCC 4M revelaram colônias pequenas, arredondadas, de coloração avermelhada, características de arqueias halófilas, além de colônias transparentes, como observadas neste mesmo meio com menor concentração de sal (**Figura 2**). De acordo com a literatura, a intensidade dos pigmentos depende do estado nutricional da célula e da salinidade do meio (Ali et al., 2016). Assim, poderíamos sugerir que as diferentes intensidades observadas seriam resultantes de diferentes estados metabólicos das espécies presentes nestas culturas.

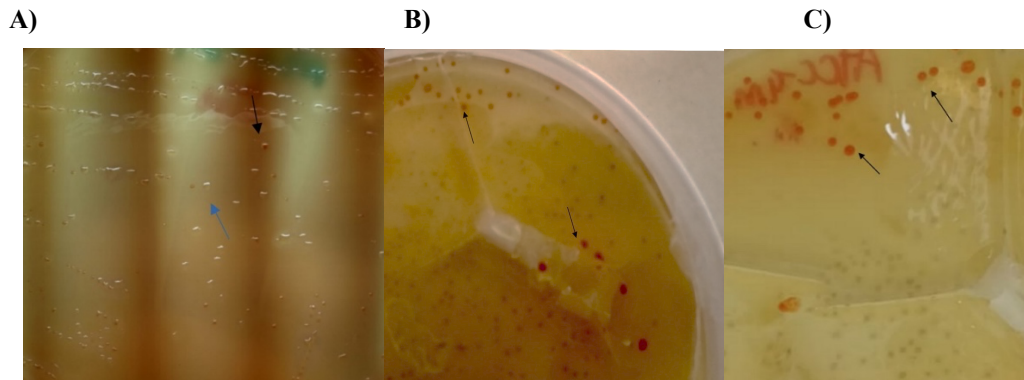


Figura 2 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas em meio ATCC 4M, a partir de diferentes amostras de sal. **A)** amostra de sal francês, com colônias transparentes e avermelhadas (setas). **B)** amostra de sal rosa, com colônias avermelhadas (setas) e **C)** amostra de sal do Irã, também com colônias pigmentadas.

As culturas obtidas a partir da amostra de sal rosa e meios MGM 3M e 4M revelaram crescimento de coloração avermelhado após cerca de 30 dias de incubação (**Figura 3**). As amostras dos sais francês e do Irã inoculadas em meios MGM 3 e 4M não apresentaram crescimento neste período de incubação.

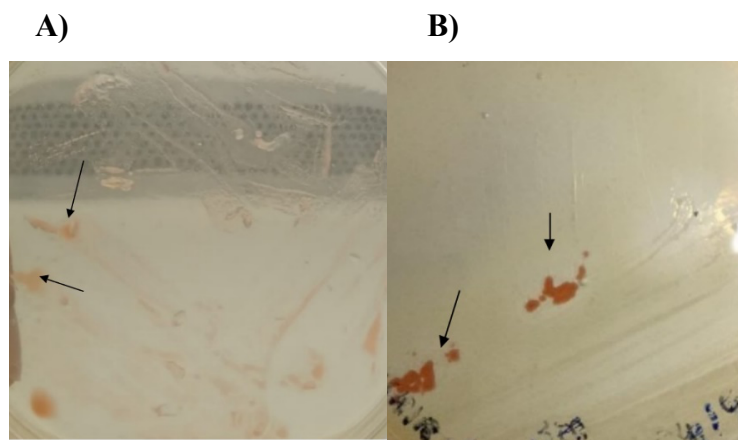


Figura 3 — Aspecto macroscópico das colônias obtidas em meio MGM 3M (**A**) e 4M (**B**). As setas indicam o crescimento ou colônias de coloração avermelhada.

4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

Em busca de se observar as características morfológicas dos organismos obtidos a partir de cada amostra de sal nos diferentes meios de cultura, essas foram submetidas à coloração de Gram. As amostras de sal rosa e sal francês nos meios ATCC e MGM 3M e

4M, bem como as de sal do irã em meios ATCC 974 3M e 4M revelaram células com formas de cocos e bacilos pequenos, em sua maioria Gram negativas, apesar de também terem sido observadas células Gram positivas nas culturas de sal francês em meios MGM 3M e 4M (**Figura 4**).

A presença de organismos Gram positivos pode sugerir a ocorrência de espécies bacterianas ou mesmo arqueias cuja parede celular apresenta estrutura mais espessa. A ocorrência de células Gram positivas foi descrita em culturas de *Halococcus morrhuae*, *Natronococcus occultus* (Usami et al., 2003), *Halalkalicoccus jeotgali* (Roh et al., 2007), *Natronococcus jeotgali* (Roh et al., 2007) e *Natronococcus pandeyae* (Kajale et al., 2022) onde a variação na coloração de Gram estaria relacionada às condições ambientais onde as células se encontravam (Oren, 2018).

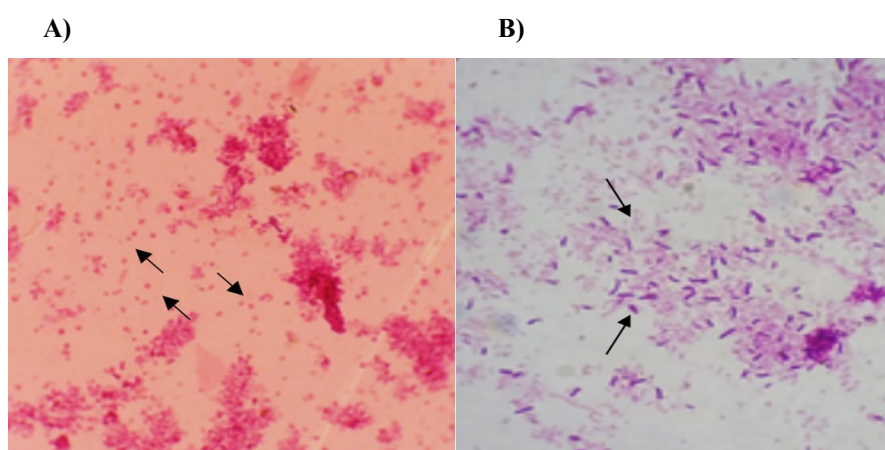


Figura 4 — Coloração de Gram de algumas das culturas obtidas. **A)** Amostra de sal francês em meio ATCC 3M, revelando células cocóides (setas). **B)** Amostra de sal francês em meio MGM 4M, revelando células cocóides e bacilares, Gram positivas e Gram negativas (setas).

A **Tabela 5** apresenta os tipos morfológicos detectados nas diferentes culturas obtidas a partir dos sais francês, rosa e do Irã, quando submetidos à coloração de Gram.

Tabela 5 — Tipos morfológicos das culturas obtidas nos diferentes meios.

| Sal | Meio | Morfologia celular | Gram |
|----------------|--------------|---------------------------|-------------|
| Francês | ATCC 3 e 4M | cocos | - |
| Francês | MGM 3M | bacilos | + |
| Francês | MGM 4M | cocos/ bacilos | + |
| Rosa | ATCC 3 e 4M | cocos | - |
| Rosa | MGM 3M | cocos | - |
| Rosa | MGM 4M | cocos/ bacilos | - |
| Irã | ATCC 3 e 4 M | cocos | - |

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Como as culturas em meios líquidos apresentavam crescimento exuberante, estas foram utilizadas para a extração de DNA total, a fim de se verificar que tipos de organismos estavam presentes nos diferentes meios de cultura. A extração de DNA genômico por lise osmótica com água destilada foi efetiva para as culturas de Sal Francês em ATCC 3 e 4M e MGM 4M; Sal Rosa em ATCC 3M, MGM 3 e 4M, gerando bandas de DNA de alta massa molecular, quando submetidas à eletroforese em gel de agarose. As amostras de Sal Francês em MGM 3M e Sal do Irã ATCC 4M, por outro lado, não geraram bandas de DNA, enquanto as culturas de Sal Rosa ATCC 4M e do Irã ATCC 3M revelaram pequena quantidade de DNA genômico, como ilustrado na **Figura 5**.

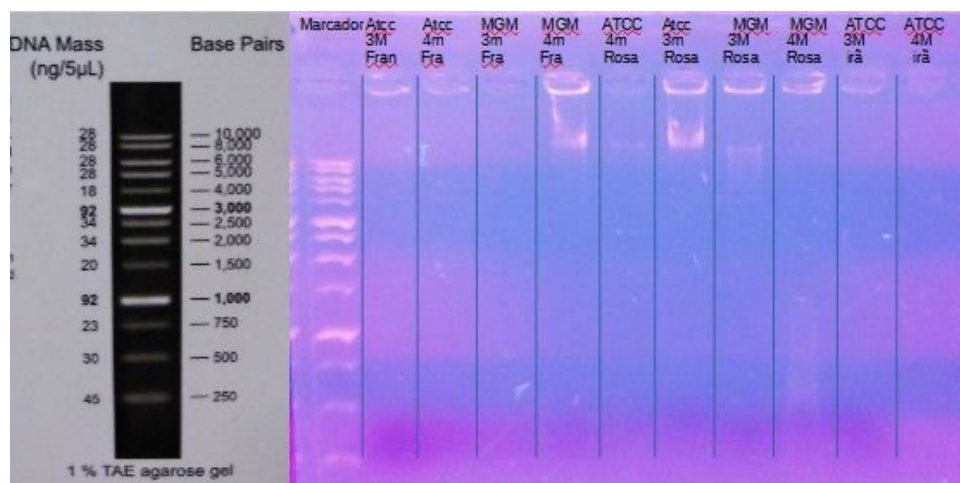


Figura 5 — Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos diferentes DNAs genômicos extraídos por meio de lise osmótica com água destilada das culturas crescidas em meios líquidos. Marcador de massa molecular 1KB DNA Ladder (Kasvi).

Essas variações nas quantidades de DNA extraído pelo método de lise osmótica com água são comuns em halófilos, pois algumas espécies *Halococcus* possuem paredes celulares mais resistentes que protegem a célula contra o estresse osmótico (Dyall-smith, 2009). Por essa razão, foi necessário utilizar o método de extração de DNA pelo protocolo que emprega fenol-clorofórmio. Esse método se mostrou mais eficiente que a lise osmótica. Globalmente, as amostras não exibiam alto grau de degradação, permitindo assim seu uso nos experimentos subsequentes de PCR (**Figura 6**).

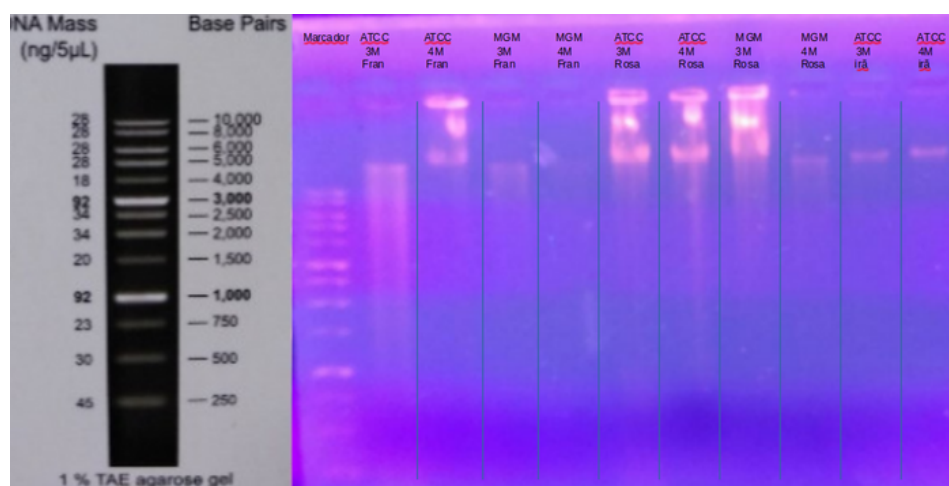


Figura 6 — Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio dos diferentes DNAs genômicos extraídos com fenol-clorofórmio, das culturas crescidas em meios líquidos. Marcador de massa molecular 1KB DNA Ladder (Kasvi).

4.4 ENSAIOS DE PCR DIRIGIDOS AO GENE DE RNA 16S DE *ARCHAEA* E *BACTERIA*

A escolha dos iniciadores se mostra algo essencial nesse tipo de estudo, uma vez que essa decisão pode influenciar bastante na diversidade de comunidades de arqueias reveladas por cada par de iniciadores (Belmok, 2021). DeLong, 1992 propôs e empregou o conjunto 21f/958r para detectar a presença de *Archaea* em amostras de plâncton coletadas em diversas áreas costeiras. Esses iniciadores demonstraram uma alta especificidade para o gene do rRNA 16S das arqueias, sendo empregados em uma série de trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa (Rodrigues, 2013; Dias, 2015, Ambrósio 2016), como também com halófilos, como nos trabalhos de Pedrós-Alió, 2005; Christelle, 2014 e Das, Kumar, Nayak, 2020.

Tendo em vista que as extrações de DNA resultaram em preparações com concentrações distintas, os ensaios de PCR foram realizados empregando-se diferentes volumes de cada amostra. Em alguns casos, as amostras foram diluídas 1:10 e destas diluições foram utilizados os volumes de 1 e 3 μ L em cada sistema de PCR, a fim de empregarmos cerca de 10 ng de DNA em cada reação. Dependendo da concentração estimada de DNA, algumas amostras foram utilizadas sem qualquer diluição prévia. A PCR dirigida ao gene de rRNA 16S de *Archaea*, empregando os iniciadores 21F/958R, resultou na amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado (\cong 940 pb) na maioria das amostras, como ilustrado na **Figura 7**.

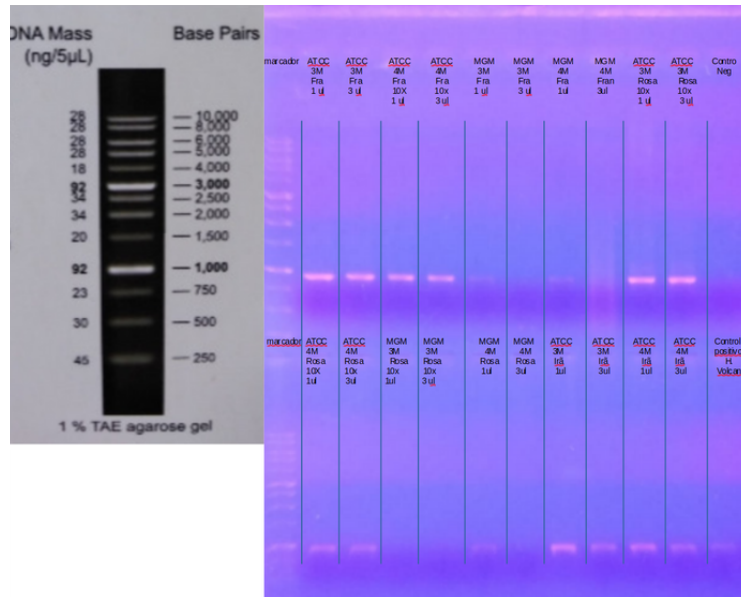


Figura 7 — Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados a partir de culturas crescidas em diferentes sais, empregando os iniciadores 21f/958r, dirigidos ao gene de rRNA 16S do domínio Archaea. O controle negativo foi preparado utilizando-se água destilada em lugar de DNA. Marcador de massa molecular 1KB DNA Ladder (Kasvi).

A PCR dirigida ao gene de rRNA 16S de *Bacteria*, empregando os iniciadores 27f/1492r, resultou na amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado (cerca de 1500 pb) nas amostras referentes à cultura de Sal Francês em ATCC 3M e em MGM 3 e 4M. Quando comparado ao resultado da PCR dirigida ao domínio *Archaea*, tal resultado poderia sugerir que as condições de cultivo utilizadas nesse trabalho permitiram um maior crescimento de representantes de *Archaea* que de *Bacteria*, uma vez que somente a partir de uma pequena fração das amostras foi possível obter a amplificação de fragmentos de DNA de tamanho esperado (**Figura 8**).

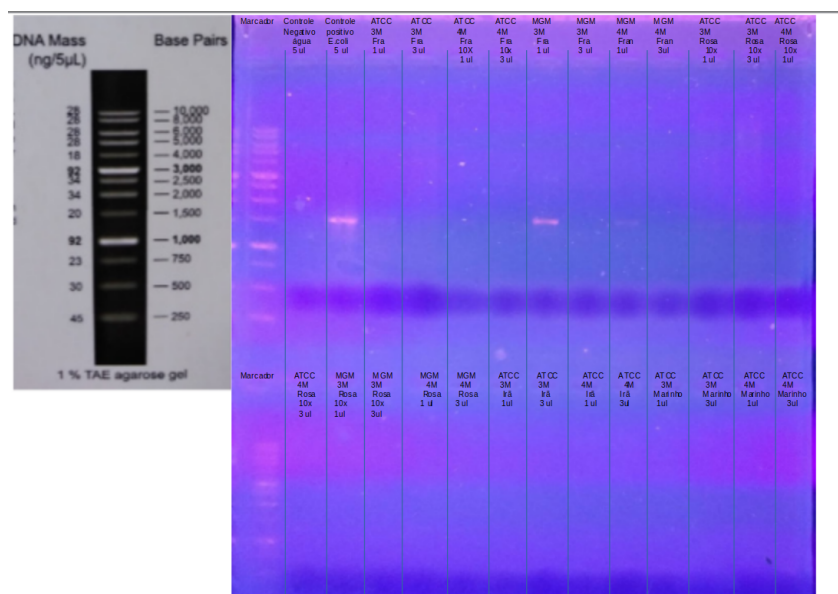


Figura 8 — Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados a partir de culturas crescidas em diferentes sais, empregando os iniciadores 27f/1492r, dirigidos ao gene de rRNA 16S do domínio Bacteria. O controle negativo foi preparado utilizando-se água destilada em lugar de DNA. Como controle positivo foi utilizado o DNA de *E. coli*. Marcador de massa molecular 1KB DNA Ladder (Kasvi).

É importante ressaltar que o fato de apenas a amostra de sal francês ter permitido o cultivo de bactérias, não significa necessariamente que as outras amostras não contenham tal tipo de organismo. Pode-se especular que a diversidade microbiana nas diferentes amostras seja maior que o observado por meio dos métodos utilizados neste estudo, sendo provavelmente necessária a adoção de outras condições de cultivo para melhor caracterizar a presença de outros grupos de microrganismos nas amostras (Gibtan, 2017 e Satari, 2021).

4.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR OBTIDOS

Visando a obtenção de uma maior concentração dos fragmentos de DNA amplificados nas diferentes reações de PCR, os produtos obtidos a partir de uma mesma amostra foram reunidos e purificados, empregando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Seis amostras amplificadas no ensaio dirigido ao gene de rRNA 16S de *Archaea* foram selecionadas para a clonagem devido à maior concentração dos fragmentos de DNA obtidos. Assim, foram preparados seis sistemas de ligação no vetor pGEM-T Easy

(Promega), onde os insertos correspondiam aos fragmentos amplificados a partir das culturas sal rosa ATCC 3M e 4M; sal rosa MGM 3M e 4M e sal do Irã ATCC 3M e 4M.

Após a transformação de células de *E. coli XL1-Blue*, foram observados poucos clones recombinantes e um número extremamente elevado de colônias “piratas”, próximas aos clones transformantes, o que demonstra uma falha técnica no que tange à qualidade da ampicilina usada. Por essa razão, foram selecionados um total de 63 clones, sendo cerca de 10 clones oriundos de cada sistema de transformação.

4.5.1 Extração de DNA plasmidial dos clones recombinantes

Para a extração do DNA plasmidial, os 63 clones foram inoculados em meio LB suplementado com ampicilina e incubados por uma noite em estufa a 37 °C. Após esse período, verificou-se que a grande maioria das amostras não correspondia a clones recombinantes, uma vez que não cresceram na presença do antibiótico. Assim, o número de clones recombinantes foi reduzido para apenas 11, assim distribuídos: 4 clones da cultura de Sal Rosa em MGM 3M, 4 clones do mesmo sal em MGM 4M, 1 clone de Sal do Irã em MGM 3M e 2 do mesmo sal em MGM 4M. Esses tiveram seu DNA plasmidial extraído e submetido ao sequenciamento.

4.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISES PRELIMINARES DE BIOINFORMÁTICA

As 11 amostras de DNA plasmidial das amostras de Sal Rosa em MGM 3M (4), Rosa MGM 4M (4), Irã ATCC 3M (1) e Irã ATCC 4M (2) foram submetidas ao sequenciamento automático de DNA empregando-se o iniciador 21F, específico para o Domínio *Archaea*. Das 11 sequências enviadas, 10 apresentaram Phred (Ewing et al., 1998) de qualidade superior a 20 em mais de 250 nucleotídeos, sendo que a amostra sal rosa MGM 4M não apresentou tal qualidade e, portanto, foi descartada. As dez sequências restantes foram submetidas a análises adicionais de bioinformática.

As dez sequências válidas foram avaliadas em relação à presença de quimeras com a ferramenta Uchime2_ref, na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information), onde nenhuma apresentou características de sequências quiméricas. Utilizando-se também a ferramenta de BlastN do NCBI, as dez sequências de DNA foram

comparadas entre si, visando observar o grau de identidade entre elas. As amostras de sal do Irã obtidas a partir dos meios ATCC 3M e 4M apresentaram identidade de 100.0% entre si. As três amostras do sal do Irã ATCC, duas do meio 4M e uma de meio 3M, se mostraram 100% idênticas. As sequências de sal Rosa em MGM 3M variaram de cerca de 86 a 100% de identidade, enquanto as sequências desse mesmo sal em meio MGM 4M eram 100% idênticas.

Quando comparadas às sequências nucleotídicas depositadas no GenBank, excetuando-se uma única amostra, todas as demais exibiram altos graus de identidade com sequências do gene de rRNA 16S de *Halobacterium*. A única exceção ocorreu com uma sequência proveniente de um dos clones obtidos a partir de Sal Rosa em MGM 3M, que apresentou 98,06% de identidade com o gênero *Halolamina*. Das quatro sequências provenientes do sal Rosa em meio MGM 3M, três exibiram identidades de 93,30%; 98,81% e 100% com sequências do gênero *Halobacterium*. Da mesma forma, as três sequências do sal Rosa em meio MGM 4M apresentaram identidades de 96,46%; 96,66%; 99,30% com *Halobacterium*.

Todas as sequências referentes ao Sal do Irã apresentaram identidades entre 98 e 100% com *Halobacterium*. Como o número de amostras sequenciadas é ainda extremamente baixo, não foi possível realizar qualquer correlação mais robusta em relação às observações de microscopia e as análises de identidade em banco de dados. Além disso, vale ressaltar que as microscopias foram realizadas em culturas distintas daquelas utilizadas para a obtenção de DNAs destinados ao sequenciamento. Entretanto, a título de fornecer maiores informações sobre os gêneros detectados em nossas culturas, abaixo se encontra uma breve descrição destas arqueias.

O gênero *Halobacterium* foi encontrado em diversos sais estudados anteriormente, como o sal rosa do Himalaia e o sal de Guérande. Por outro lado, o gênero *Halolamina* foi encontrado apenas no sal de Guérande, indicando uma baixa abundância desse gênero entre os sais estudados (Henriet et al., 2014). Outro estudo detectou o gênero *Halobacterium* em todas as amostras de sal, diferentes das utilizadas no estudo anterior. O gênero *Halolamina* também foi encontrado em uma quantidade significativa em uma única amostra de sal (Gibtan et al., 2017). Isso sugere que o gênero *Halobacterium* está presente em diferentes tipos de sais comerciais. Em outro estudo, tanto o gênero *Halobacterium* quanto o *Halolamina* foram encontrados em amostras de sal do Atlântico e rosa do Himalaia (Satari et al., 2021).

Com base nessas informações, pode-se sugerir que o gênero *Halobacterium* é abundante entre os diferentes sais estudados, enquanto a abundância do gênero *Halolamina* é geralmente baixa, exceto em algumas amostras específicas. A presença recorrente do gênero *Halobacterium* em diferentes tipos de sais comerciais indica sua ampla distribuição e adaptabilidade a esses ambientes. Já o gênero *Halolamina* pode estar relacionado a condições específicas de salinidade ou outros fatores ambientais presentes em algumas amostras de sal.

Por fim, é importante ressaltar que a ausência de amplificação nas amostras de bactérias, a não ser nas amostras referentes à cultura de Sal Francês em ATCC 3M e em MGM 3 e 4M, não descarta necessariamente a presença desses organismos nelas. A técnica de PCR tem suas limitações, e fatores como a eficiência da extração de DNA e a especificidade dos primers utilizados podem influenciar os resultados. Estudos complementares usando outras técnicas de análise microbiana, como o sequenciamento de próxima geração, podem fornecer uma visão mais abrangente da diversidade bacteriana e arqueal em amostras de sal. Por fim, segue uma breve descrição desses gêneros.

4.6.1 Gênero *Halobacterium*

O gênero *Halobacterium* é amplamente encontrado tanto em ambientes halófilos naturais quanto em sintéticos (Hang e Cui, 2014). Organismos pertencentes a este gênero são bacilos Gram negativos, embora dependendo das condições de cultivo, algumas espécies possam apresentar morfologia cocóide (Gruber et al. 2004). O gênero *Halobacterium* foi descrito pela primeira vez em 1957, sendo considerado o gênero tipo da família e ordem *Halobacteriales*, com sete espécies reconhecidas: *Halobacterium bonnevilliei*, *H. hubeiense*, *H. jilantaiense*, *H. litoreum*, *H. noricense*, *H. rubrum* e *H. salinarum* (NCBI, 2023). Os membros desse gênero são aeróbios, apesar de haver a descrição de crescimento anaeróbico no escuro, conduzido pela fermentação da arginina em *H. salinarum*, *H. noricense* e *H. jilantaiense*. Representantes deste gênero são isolados e recuperados de várias fontes, como peixes salgados, salinas marinhas e sal-gema. O conteúdo de DNA G + C varia de 54,3 a 71,2 mol% (Oren, 2015).

4.6.2 Gênero *Halolamina*

O gênero *Halolamina*, pertence à classe *Halobacteria*, ordem *Haloferacales* e família *Haloferacaceae*. As células de *Halolamina* são bacilos pleomórficos Gram negativos, aeróbios, quimioorganotróficos, que crescem otimamente em pH 6,5-8,0 e em 37-42 °C. Representantes desse gênero são isolados de salinas solares marinhas, minas de sal ou amostras de sal. O conteúdo de DNA G+C varia de 62,7-69,1 mol%. A espécie-tipo é *Halolamina pelagica*. Sua posição filogenética foi confirmada em estudos baseados no gene que codifica a subunidade B da RNA polimerase (Oren, 2015). Sete espécies são reconhecidas: *H. litorea*, *H. pelagica*, *H. rubra*, *H. salifodinae*, *H. salina* e *H. sediminis* (NCBI, 2023).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho revelou a presença arqueias em sais alimentares comercializados no Brasil. A presença de arqueias em sais alimentares, alimentos salgados diversos e salinas solares é uma área ainda pouco explorada em nosso meio. A identificação desses microrganismos e a caracterização de suas propriedades podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos e tecnologias na área de alimentos, como a produção de enzimas e outras biomoléculas de interesse industrial. Portanto, as perspectivas futuras incluem:

- Realizar novas culturas dos sais escolhidos, visando a obtenção de um maior número de clones, a fim de termos uma melhor ideia sobre a diversidade de arqueias presentes nestas amostras.
- Comparar as populações microbianas presentes nos sais analisados, quando cultivados em diferentes meios artificiais e sob diferentes concentrações de NaCl.
- Realizar o sequenciamento de DNA diretamente a partir do sal, sem a necessidade do cultivo, a fim de caracterizar a composição microbiana presente nos sais selecionados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Shammiri, M. 2002. Evaporation rate as a function of water salinity. **Desalination**, 150(2), 189-203.
- Ali, I., Prasongsuk, S., Akbar, A., Aslam, M., Lotrakul, P., Punnapayak, H., & Rakshit, S. K. 2016. Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. **Maejo International Journal of Science and Technology**, 10(3), 330-345.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215(3), 403-410.
- Ambrósio, D. V. Cultivo e caracterização de membros do domínio *Archaea* a partir de sedimentos límnicos do Cerrado. 2016. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular — Universidade de Brasília, Brasília.
- Anderson, I. J.; DasSarma, P.; Lucas, S.; Copeland, A.; Lapidus, A.; Del Rio, T. G.; & Kyrpides, N. C. 2016. Complete genome sequence of the Antarctic *Halorubrum lacusprofundi* type strain ACAM 34. **Standards in genomic sciences**, 11, 1-6.
- Antunes, A.; Taborda, M.; Huber, R.; Moissl, C.; Nobre, M. F.; & da Costa, M. S. 2008. *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58(1), 215-220.
- Antón, J.; Oren, A.; Benlloch, S.; Rodríguez-Valera, F.; Amann, R.; & Rosselló-Mora, R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52(2), 485-491.
- Antón, J.; Peña, 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 Systems**, 4, 1-10.
- Aouad, M.; Taib, N.; Oudart, A.; Lecocq, M.; Gouy, M.; & Brochier-Armanet, C. 2018. Extreme halophilic archaea derive from two distinct methanogen Class II lineages. **Molecular phylogenetics and evolution**, 127, 46-54.

- Arahal, D. R.; & Ventosa, A. 2006. The family halomonadaceae. **The prokaryotes**, 6, 811-835.
- Arnoldi, M.; Fritz, M.; Bäuerlein, E.; Radmacher, M.; Sackmann, E.; & Boulbitch, A. 2000. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. **Physical Review E**, 62(1), 1034.
- ATCC. ATCC medium: 974 Halobacterium medium. www.atcc.org.
- Averhoff, B. & Müller, V. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. **Research in microbiology**, 161(6), 506-514.
- Balashov S.P.; Imasheva E.S.; Boichenko V.A.; Antón J.; Wang J.M. & Lanyi J.K. 2005. Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. **Science**. 309(5743):2061-4.
- Belmok, A.; Rodrigues-Oliveira, T.; Lopes, F. A. C.; Krüger, R. H.; & Kyaw, C. M. 2021. The influence of primer choice on archaeal phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene PCR. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, e247529.
- Abdallah, M. Be.; Karray, F.; & Sayadi, S. 2020. Production of polyhydroxyalkanoates by two halophilic archaeal isolates from Chott El Jerid using inexpensive carbon sources. **Biomolecules**, 10(1), 109.
- Benlloch, S.; Acinas, S.; Antón, J.; López-López, A.; Luz, S.; & Rodríguez-Valera, F. 2001. Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. **Microbial Ecology**, 41, 12-19.
- Bettarel, Y.; Bouvier, T.; Bouvier, C.; Carré, C.; Desnues, A.; Domaizon, I.; & Sime- Ngando, T. 2011. Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full-salinity gradient. **FEMS Microbiology Ecology**, 76(2), 360-372.
- Birbir, M.; Calli, B.; Mertoglu, B.; Bardavid, R. E.; Oren, A.; Ogmen, M. N.; & Ogan, A. 2007. Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23, 309-316.

- Bonete, M. J.; Marhuenda-Egea, F. C.; Pire, C.; Ferrer, J. & Martínez-Espinosa, R. M. 2004. Nitrate assimilation in halophilic archaea. **Halophilic Microorganisms**, 1,193-203.
- Bowers, K. J. & Wiegel, J. 2011. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. **Extremophiles**, 15, 119-128.
- Burns, D. G.; Janssen, P. H.; Itoh, T.; Kamekura, M.; Li, Z.; Jensen, G. & Dyall-Smith, M. L. 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(2), 387-392.
- Carapeto, C., Brum, S. & Rocha, M. J. 2018. Which table salt to choose? **Journal of Nutrition & Food Sciences**, 8, 1-4.
- Cayol, J. L.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C.; Prensier, G.; Guezennec, J. & Garcia, J. L. 1994. Isolation and characterization of *Halothermothrix orenii* gen. nov., sp. nov., a halophilic, thermophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 44(3), 534-540.
- Cira-Chávez, L. A.; Guevara-Luna, J.; Soto-Padilla, M. Y.; Román-Ponce, B.; Vásquez-Murrieta, M. S. & Estrada-Alvarado, M. I. 2018. Kinetics of halophilic enzymes. **Kinetics of Enzymatic Synthesis**, 1, 3-26.
- Círrilo, M., Capasso, G., Di Leo, V. A., & De Santo, N. G. 1994. A history of salt. **American Journal of Nephrology**, 14(4-6), 426-431.
- Corral, P., Amoozegar, M. A., Ventosa, A. 2020. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. **Marine Drugs**, 18 (1), 1- 33.
- Costa, D. F. D. S.; Silva, A. A. D.; Medeiros, D. H. M.; Lucena Filho, M. A.; Rocha, R. D. M.; Lillebo, A. I. & Soares, A. M. 2013. Breve revisão sobre a evolução histórica da atividade salineira no estado do Rio Grande do Norte (Brasil). **Sociedade & Natureza**, 25, 21-34.
- Costa, D. F. S.; Medeiros, D. H. M., Costa; R. S. & Rocha, R. M. 2015. O sal de ontem e as salinas de hoje: análise da produção de sal marinho no Rio Grande do Norte.

Capítulos de Geografia do Rio Grande Norte. 1ed. Natal: Imprensa Oficial do Rio Grande do Norte e CCHLA-UFRN, 2, 37-63.

- Cray, J. A., Russell, J. T., Timson, D. J., Singhal, R. S., & Hallsworth, J. E. 2012. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. **Environmental Microbiology**, 15(1), 287–296.
- Cui, H. L., Gao, X., Yang, X., & Xu, X. W. 2011. *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Halobacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61(7), 1617-1621.
- Cui, H.-L. 2016. Genus *Halolamina*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 17, 1–10.
- Cui, H. L. & Dyal-Smith, M. L. 2021. Cultivation of halophilic archaea (class Halobacteria) from thalassohaline and athalassohaline environments. **Marine Life Science & Technology**, 3, 243-251.
- Das, O.; Kumar, S. H.; & Nayak, B. B. 2020. Relative abundance of halophilic archaea and bacteria in diverse salt-fermented fish products. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, 117, 108688.
- Das, S.; Wu, C.; Song, Z.; Hou, Y.; Koch, R.; Somasundaran, P. & Venkatesan, R. 2019. Bacteriorhodopsin enhances efficiency of perovskite solar cells. **American Chemical Society Applied Materials & Interfaces**, 11(34), 30728-30734.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. **Current Opinion in Microbiology**, 25, 120-126.
- Davis, J. S. 2009. Management of biological systems for continuously operated solar saltworks. **Global nest journal**, 11(1), 73-78.
- de Beer, D.; Weber, M.; Chennu, A.; Hamilton, T.; Lott, C.; Macalady, J. & Klatt, J. 2017. Oxygenic and anoxygenic photosynthesis in a microbial mat from an anoxic and sulfidic spring. **Environmental Microbiology**, 19(3), 1251-1265.
- De la Haba, R. R.; Sánchez-Porro, C.; Márquez, M. C.; & Ventosa, A. 2011. Taxonomy of halophiles. **Extremophiles handbook**, 1, 255-308.

- Des Marais, D. J. 1995. The biogeochemistry of hypersaline microbial mats. **Advances in Microbial Ecology**, 14, 251-274.
- Dias, A. B. A. **Filogenia molecular e cultivo de *Archaea* de solos de Cerrado sensu stricto**. 2015. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular — Universidade de Brasília, Brasília.
- Dyall-Smith, M. 2009. **Halohandbook: Protocols for Haloarchaeal Genetics**.
- Ewing, B. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8(3), 186-194.
- Farlow, W. G. 1878. On the Nature of the Peculiar Reddening of Salted Codfish during the Summer Season. **United States Commission of Fish and Fisheries. Report of The Commissioner for 1878. Washington: Government Printing Office**, 4,969-974.
- Feder, F.; Delfino, D.; Wanderley, M. & Silva, L. 2013. Cyanobacterial Composition of Microbial Mats, Found in Brejo do Espinho and in Artificial Saline of Araruama, RJ, Brazil. **Advances in Microbiology**. 3 (6A), 47-54.
- Feng, Y.; Neri, U.; Gosselin, S.; Louyakis, A. S.; Papke, R. T.; Gophna, U. & Gogarten, J. P. 2021. The evolutionary origins of extreme halophilic archaeal lineages. **Genome Biology and evolution**, 13(8), 166-183.
- Gaci, N.; Borrel, G.; Tottey, W.; O'Toole, P. W.; & Brugère, J. F. 2014. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. **World Journal of Gastroenterology**. 20(43), 16062–16078.
- Gasol, J. M., Casamayor, E. O., Joint, I., Garde, K., Gustavson, K., Benlloch, S., & Pedrós-Alió, C. 2004. Control of heterotrophic prokaryotic abundance and growth rate in hypersaline planktonic environments. **Aquatic Microbial Ecology**, 34(2), 193-206.
- Gemmell, R. T.; McGenity, T. J.; & Grant, W. D. 1998. Use of molecular techniques to investigate possible long-term dormancy of halobacteria in ancient halite deposits. **Ancient Biomol**, 2, 125-133.

- Giani, M., Garbayo, I., Vilchez, C. & Martínez-Espinosa, R. M. 2019. Haloarchaeal carotenoids: healthy novel compounds from extreme environments. **Marine drugs**, 17(9), 524- 537.
- Gibtan, A.; Park, K.; Woo, M.; Shin, J. K.; Lee, D. W.; Sohn, J. H. & Lee, H. S. 2017. Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. **Frontiers in microbiology**, 8, 799- 810.
- Grant, W. D.; Gemmell, R. T. & McGenity, T. J. 1998. Halobacteria: the evidence for longevity. **Extremophiles**, 2, 279-287.
- Gruber, C.; Legat, A.; Pfaffenhuemer, M.; Radax, C.; Weidler, G.; Busse, H. J.; & Stan-Lotter, H. 2004. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. **Extremophiles**, 8(6), 431-439.
- Hallsworth, J. E.; Yakimov, M.; M., Golyshin, P. N.; Gillion, J. L.; D'Auria, G.; de Lima Alves, F.; & McGenity, T. J. 2007. Limits of life in MgCl₂-containing environments: chaotropy defines the window. **Environmental Microbiology**, 9(3), 801-813.
- Hamm, J. N.; Erdmann, S.; Eloë-Fadrosh, E. A.; Angeloni, A.; Zhong, L.; Brownlee, C.; & Cavicchioli, R. 2019. Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, 116(29), 14661-14670.
- Hampp, N. A.; Neebe e M.; Seitz, A. 2000. Printing inks containing the photochromic protein bacteriorhodopsin. In: **Optical Security and Counterfeit Deterrence Techniques III**. 3973, 118-125.
- Han, D. & Cui, H. L. 2014. *Halobacterium rubrum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. **Archives of Microbiology**, 196, 847-851.
- Harding, T., & Simpson, A. G. 2018. Recent advances in halophilic protozoa research. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 65(4), 556-570.

- Henney, J. E.; Taylor, C. L.; Boon, C. S. & Institute of Medicine (US) Committee on Strategies to Reduce Sodium Intake. 2010. Preservation and physical property roles of sodium in foods. **In Strategies to reduce sodium intake in the United States.**
- Henriet, O.; Fourmentin, J.; Delincé, B. & Mahillon, J. 2014. Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts. **International journal of food microbiology**, 191, 36-44.
- Herbst, D.B. 2001. Gradients of salinity stress, environmental stability and water chemistry as a templet for defining habitat types and physiological strategies in inland salt waters. **Saline Lakes. Developments in Hydrobiology**. 162, 209–219.
- Hoffmann, T.; Von Blohn, C.; Stanek, A.; Moses, S.; Barzantny, H.; & Bremer, E. 2012. Synthesis, release, and recapture of compatible solute proline by osmotically stressed *Bacillus subtilis* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(16), 5753-5762.
- Hutton, T. 2002. Sodium technological functions of salt in the manufacturing of food and drink products. **British Food Journal**, 104 (2), 126-152.
- Imhoff, J. F., & Süling, J. 1996. The phylogenetic relationship among Ectothiorhodospiraceae: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. **Archives of Microbiology**, 165, 106-113.
- Javor, B. J. 2012. *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. **Springer Science & Business Media**, 1, 176-292.
- Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; & Oren, A. 2013. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 106, 99-103.
- Juez, G.; Rodriguez-Valera, F.; Ventosa, A.; & Kushner, D. J. 1986. *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec, nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, 8(1-2), 75-79.

- Kajale, S.; Deshpande, N.; Lodha, T.; Shouche, Y.; & Sharma, A. 2022. *Natronococcus pandeyae* sp. nov., a novel haloarchaeon from Sambhar Salt Lake. **Current Microbiology**, 79(2), 51-59.
- Kaptein, E.; Sreeramoju, D.; Kaptein, J.; & Kaptein, M. 2016. A systematic literature search and review of sodium concentrations of body fluids. **Clinical Nephrology**, 86(4), 203-228.
- Khelaifia, S. & Drancourt, M. 2012. Susceptibility of archaea to antimicrobial agents: applications to clinical microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**, 18(9), 841-848.
- Kim, J. Y.; Whon, T. W.; Lim, M. Y.; Kim, Y. B.; Kim, N.; Kwon, M. S. & Nam, Y. D. 2020. The human gut archaeome: identification of diverse haloarchaea in Korean subjects. **Microbiome**, 8, 1-17.
- Kim, K. K., Lee, K. C., & Lee, J. S. 2011. *Halogramma salarium* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from sea salt. **Systematic and applied microbiology**, 34(8), 576-580.
- Kim, K. K., Lee, K. C., & Lee, J. S. (2011). *Halogramma salarium* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from sea salt. *Systematic and applied microbiology*, 34(8), 576-580.
- Kis-Papo, T., & Oren, A. 2000. Halocins: are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds?. **Extremophiles**, 4 (1), 35-41.
- Krawczyk, K. T.; Loch, C. & Kowalewicz-Kulbat, M. 2022. Halophilic Archaea *Halorhabdus Rudnickae* and *Natrinema Salaciae* Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. **Frontiers in Immunology**, 13, 1-9.
- Kumar, V., & Tiwari, S. K. 2019. Halocin diversity among Halophilic Archaea and their applications. **Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 1. Microbial Diversity in Normal & Extreme Environments**, 1, 497-532.
- Kushner, D. J. & Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. **Halophilic Bacteria**, 1, 109-138.

- Lee, H. S. 2013. Diversity of halophilic archaea in fermented foods and human intestines and their application. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(12), 1645-1653.
- Li Y.T.; Tian Y.; Tian H.; Tu T.; Gou G-Y.; Wang Q.; Qiao Y-C.; Yang Y.; Ren, T.L. 2018. A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices. **Sensors**. 18(5), 1-21.
- Lin, J.; Li, X. R.; Zhao, L. Y.; Li, G. P.; Shen, H. Y.; Li, Y. T.; & Ren, T. L. 2023. Review on bacteriorhodopsin-based self-powered bio-photoelectric sensors. **Materials Science in Semiconductor Processing**, 162, 1-6.
- Loyola, I. P.; Sousa, M. F. D.; Jardim, T. V.; Mendes, M. M.; Barroso, W. K. S.; Sousa, A. L. L.; & Jardim, P. 2022. Comparação entre os efeitos da ingestão de sal do Himalaia e de sal comum sobre os valores de sódio urinário e pressão arterial em indivíduos hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 118, 875-882.
- Luk, A. W.; Williams, T. J.; Erdmann, S.; Papke, R. T.; & Cavicchioli, R. 2014. Viruses of haloarchaea. **Life**, 4(4), 681-715.
- Ma, Y.; Galinski, E. A.; Grant, W. D.; Oren, A. & Ventosa, A. 2010. Halophiles 2010: life in saline environments. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(21), 6971-6981.
- Madigan, M. T., & Orent, A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Microbiology**, 2(3), 265-269.
- Man, C. M. D. Technological functions of salt in food products. 2007. **Reducing salt in foods**, 157-173.
- Mani, K., Taib, N., Hugoni, M., Bronner, G., Bragança, J. M., & Debroas, D. 2020. Transient dynamics of archaea and bacteria in sediments and brine across a salinity gradient in a solar saltern of Goa, India. **Frontiers in Microbiology**, 11, 1-19.
- Martínez, G. M.; Pire, C. & Martínez-Espinosa, R. M. 2022. Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). **Current Research in Microbial Sciences**, 3, 1-13.

- Martínez-Espinosa, R. M., Alonso, M. G., Cabrera, L. S., Martínez, G., & Galiana, C. P. 2022. Industrial applications of enzymes from haloarchaea. In *Extremozymes and their Industrial Applications*, Academic Press, 289-320.
- McGenity, T. J., & Sorokin, D. Y. 2010. Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Editorial: Berlin: Springer, 665-680.
- McGenity, T. J.; Gemmell, R. T.; Grant, W. D. & Stan-Lotter, H. 2000. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits: Minireview. **Environmental Microbiology**, 2(3), 243-250.
- Mesbah N. M. 2022. Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 10,1-16.
- Minegishi, H., Yamauchi, Y., Echigo, A., Shimane, Y., Kamekura, M., Itoh, T. & Usami, R. 2013. *Halarchaeum nitratreducens* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial sea salt. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 63(11), 4202-4206.
- Minegishi, H., Yamauchi, Y., Echigo, A., Shimane, Y., Kamekura, M., Itoh, T. & Usami, R. 2013. *Halarchaeum nitratreducens* sp. nov., a moderately acidophilic haloarchaeon isolated from commercial sea salt. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63, 4202-4206.
- Mohebbi, F. 2010. The brine shrimp *Artemia* and hypersaline environments microalgal composition: a mutual interaction. **International Journal of Aquatic Science**, 1(1), 19-27.
- Montalvo-Rodríguez, R. & Maupin-Furlow, J. A. 2020. Insights through genetics of halophilic microorganisms and their viruses. **Genes**, 11(4), 388.
- Moopantakath, J., Imchen, M., Anju, V. T., Busi, S., Dyavaiah, M., Martínez-Espinosa, R. M., & Kumavath, R. 2023. Bioactive molecules from haloarchaea: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. **Frontiers in Microbiology**, 14, 1-14.

- Mormile, M. R., Biesen, M. A., Gutierrez, M. C., Ventosa, A., Pavlovich, J. B., Onstott, T. C., & Fredrickson, J. K. 2003. Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions. **Environmental Microbiology**, 5(11), 1094-1102.
- Najjari, A.; Mejri, H.; Jabbari, M.; Sghaier, H.; Cherif, A. & Ouzari, H. I. 2020. Halocins, Bacteriocin-Like Antimicrobials Produced by the Archaeal Domain: Occurrence and Phylogenetic Diversity in Halobacteriales. **IntechOpen EBooks**, 1, 83-94.
- Nam, Y. D.; Chang, H. W.; Kim, K. H.; Roh, S. W.; Kim, M. S.; Jung, M. J. & Bae, J. W. 2008. Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. **The Journal of Microbiology**, 46, 491-501.
- Narasingarao, P.; Podell, S.; Ugalde, J. A.; Brochier-Armanet, C.; Emerson, J. B.; Brocks, J. J.; & Allen, E. E. 2012. De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities. **The ISME Journal**, 6(1), 81-93.
- Nkamga, V. D.; Henrissat, B. & Drancourt, M. 2017. Archaea: Essential inhabitants of the human digestive microbiota. **Human Microbiome Journal**, 3, 1-8.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Visessanguan, W., Kudo, T., & Itoh, T. 2007. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(10), 2199-2203.
- O'Connor, E., & Shand, R. F. 2002. Halocins and sulfobiocins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28(1), 23-31.
- Oliveira, T. R. **Estudo da riqueza de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado**. 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular — Universidade de Brasília, Brasília.
- Ollivier, B.; Caumette, P.; Garcia, J. L. & Mah, R. A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. **Microbiological Reviews**, 58(1), 27-38.

- Ollivier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Magot, M., Patel, B. K., Prensier, G., & Garcia, J. L. 1998. *Methanocalculus halotolerans* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-producing well. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48(3), 821-828.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63(2), 334-348.
- Oren, A. & Rodríguez-Valera, F. 2001. The contribution of halophilic *Bacteria* to the red coloration of saltern crystallizer ponds. **FEMS Microbiology Ecology**, 36(2-3), 123-130.
- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28, 56-63.
- Oren, A. 2002. Unexpected diversity of heterotrophic prokaryotes living at the highest salt concentrations. **Exo-Astrobiology**, 518, 201-204.
- Oren, A., Rodríguez-Valera, F., Antón, J., Benlloch, S., Rosselló-Mora, R., Amann, R. & Russell, N. J. 2004. Red, extremely halophilic, but not archaeal: the physiology and ecology of *Salinibacter ruber*, a bacterium isolated from saltern crystallizer ponds. **Halophilic microorganisms**, 5, 63-76.
- Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. **Saline Systems**, 1, 1-14.
- Oren, A. 2006. Halophilic microorganisms and their environments. **Springer Science & Business Media**, 5, 23-57.
- Oren, A. 2006. **The Order Haloanaerobiales**. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. **Springer**, New York, NY. Capítulo 9, p. 809– 822.
- Oren, A. 2006. **Life at High Salt Concentrations**. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. **Springer**, New York. Volume 2, Capítulo 1.9, p. 263- 282.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, 4, 1-13.

- Oren, A. 2009. Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. **Aquatic Microbial Ecology**, 56(2-3), 193-204.
- Oren, A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. **Environmental Technology**, 31(8-9), 825-834.
- Oren, A. 2013. Life at high salt and low oxygen: how do the Halobacteriaceae cope with low oxygen concentrations in their environment? **Polyextremophiles: Life Under Multiple Forms of Stress**, 1, 531-548. **Springer**.
- Oren, A. 2013. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. **Frontiers in Microbiology**, 4, 1-6.
- Oren, A. 2014. Halophilic archaea on Earth and in space: growth and survival under extreme conditions. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, 372(2030), 1-12.
- Oren, A. 2015. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. **Biodiversity and Conservation**, 24, 781-798.
- Oren, A. 2015. Genus *Natronococcus*. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 17, 1-9. **Rainey and W.B. Whitman**.
- Oren, A. 2015. Genus *Halanaerobiaceae*. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 17, 1-5. **Rainey and W.B. Whitman**.
- Oren, A. 2015. Halophilic microorganisms and adaptation to life at high salt concentrations – evolutionary aspects . In: Bakermans, Corien (Org.). **Microbial Evolution under Extreme Conditions**. 1. ed. Berlin/Boston: De Gruyter, 2015, v. 1, p. 97–105.
- Oxley, A. P.; Lanfranconi, M. P.; Würdemann, D., Ott; S.; Schreiber, S.; McGenity, J. & Nogales, B. 2010. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. **Environmental Microbiology**, 12(9), 2398-2410.
- Pašić, L., Rodriguez-Mueller, B., Martin-Cuadrado, A. B., Mira, A., Rohwer, F., & Rodriguez-Valera, F. 2009. Metagenomic islands of hyperhalophiles: the case of *Salinibacter ruber*. **BMC Genomics**, 10, 1-11.

- Pedrós-Alió, C. 2005. Diversity of Microbial Communities: The Case of Solar Salterns. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, 1 ed. Dordrecht, Springer, 2005, v. 9, p. 71–90.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J. I., MacLean, M. H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J. M., & Guixa-Boixereu, N. 2000. The microbial food web along salinity gradients. **FEMS Microbiology Ecology**, 32(2), 143-155.
- Prangishvili, D.; Holz, I.; Stieger, E.; Nickell, S.; Kristjansson, J. K.; & Zillig, W. 2000. Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. **Journal of Bacteriology**, 182(10), 2985-2988.
- Purdy, K. J.; Cresswell-Maynard, T. D.; Nedwell, D. B.; McGenity, T. J.; Grant, W. D.; Timmis, K. N. & Embley, T. M. 2004. Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. **Environmental Microbiology**, 6(6), 591-595.
- Purohit, M. K.; Raval, H. & Singh, S. P. 2014. Haloalkaliphilic bacteria: molecular diversity and biotechnological applications. **Geomicrobiology and Biogeochemistry**, 39, 61-79.
- Rampelotto, P. H. 2013. Extremophiles and extreme environments. **Life**, 3(3), 482-485.
- Roberts, M. F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline Systems**, 1, 1-30.
- Rodrigo-Baños, M.; Garbayo, I.; Vilchez, C.; Bonete, M. J. & Martínez-Espinosa, R. M. 2015. Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. **Marine Drugs**, 13(9), 5508-5532.
- Rodrigues, C. M.; Bio, A.; Amat, F.; & Vieira, N. 2011. Artisanal salt production in Aveiro/Portugal-an ecofriendly process. **Saline Systems**, 7, 1-14.
- Rodriguez-Valera, F.; Juez, G.; & Kushner, D. J. 1982. Halocins: salt-dependent bacteriocins produced by extremely halophilic rods. **Canadian Journal of Microbiology**, 28(1), 151-154.

- Rodriguez-Valera, F.; Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. **Microbiology**, 119(2), 535-538.
- Roh, S. W.; Nam, Y. D.; Chang, H. W.; Sung, Y.; Kim, K. H.; Oh, H. M.; & Bae, J. W. 2007. *Halalkalicoccus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(10), 2296-2298.
- Rozenberg, A.; Inoue, K.; Kandori, H. & B ej a, O. 2021. Microbial rhodopsins: the last two decades. **Annual Review of Microbiology**, 75, 427-447.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A. 1980. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. **Microbiology**, 119(2), 535-538.
- Saeedi, P., Moosaabadi, J. M., Sebtahmadi, S. S., Mehrabadi, J. F., Behmanesh, M., & Mekhilef, S. 2012. Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. **Bioengineered**, 3(6), 326-328.
- Saldanha, D. S., Silva, A. R., Azevedo, I. B., & da Silva Costa, D. F. 2017. Distribui o geográfica das salinas mecanizadas e artesanais na zona estuarina do rio Apod  Mossoró (RN). **Os Desafios da Geografia Física na Fronteira do Conhecimento**, 1, 3027-3031.
- Salma, M., & Mehnaz Samina, M. K. A. 2020. Osmoadaptation in halophilic bacteria and archaea. **Research Journal of Biotechnology**, 15 (5), 154-161.
- Santos, F.; Yarza, P.; Parro, V.; Meseguer, I.; Rosselló-M ra, R.; & Antón, J. 2012. Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(6), 1635-1643.
- Satari, L.; Guill n, A.; Latorre-Pérez, A.; & Porcar, M. 2021. Beyond archaea: the table salt bacteriome. **Frontiers in Microbiology**, 12, 3157-3169.
- Schnnegurt, Mark A. Media and Conditions for the Growth of Halophilic and Halotolerant Bacteria and Archaea. *In: Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Dordrecht: Springer, 2012, v. 1, p. 35–58.

- Shimoshige, H., Yamada, T., Minegishi, H., Echigo, A., Shimane, Y., Kamekura, M., ... & Usami, R. 2013. *Halobaculum magnesiophilum* sp. nov., a magnesium-dependent haloarchaeon isolated from commercial salt. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 63(3), 861-866.
- Shimane, Y., Hatada, Y., Minegishi, H., Mizuki, T., Echigo, A., Miyazaki, M. & Horikoshi, K. 2010. *Natronoarchaeum mannanyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 60(11), 2529-2534.
- Shimane, Y., Hatada, Y., Minegishi, H., Echigo, A., Nagaoka, S., Miyazaki, M., ... & Horikoshi, K. 2011. *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 61(9), 2266-2270.
- Seck, E. H.; Dufour, J. C.; Raoult, D. & Lagier, J. C. 2018. Halophilic & halotolerant prokaryotes in humans. **Future Microbiology**, 13(07), 799-812.
- Seck, E. H.; Senghor, B.; Merhej, V.; Bachar, D.; Cadoret, F.; Robert, C. & Raoult, D. 2019. Salt in stools is associated with obesity, gut halophilic microbiota and *Akkermansia muciniphila* depletion in humans. **International journal of Obesity**, 43(4), 862-871.
- Sekar, A., & Kim, K. 2020. Halophilic Bacteria in the food industry. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**, 4, 2061-2070.
- Shand, R. F. & Leyva, K. J. 2007. Peptide and protein antibiotics from the domain *Archaea*: halocins and sulfolobocins. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**, 93-109.
- Siddiqui, K. S.; Williams, T. J.; Wilkins, D.; Yau, S.; Allen, M. A.; Brown, M. V.; & Cavicchioli, R. 2013. Psychrophiles. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, 41, 87-115.
- Siglioccolo, A.; Paiardini, A.; Piscitelli, M. & Pascarella, S. 2011. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. **BMC structural biology**, 11(1), 1-12.

- Sime-Ngando, T.; Lucas, S.; Robin, A.; Tucker, K. P.; Colombet, J.; Bettarel, Y. & Prangishvili, D. 2011. Diversity of virus–host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. **Environmental Microbiology**, 13(8), 1956-1972.
- Singh, P.; Singh, S.; Jaggi, N.; Kim, K. H.; & Devi, P. 2021. Recent advances in bacteriorhodopsin-based energy harvesters and sensing devices. **Nano Energy**, 79, 1-47.
- Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K., & Marchut-Mikołajczyk, O. 2022. Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi—Current Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(8), 1-18.
- Song, Y. & Gunner, M. R. 2014. Halorhodopsin pumps Cl⁻ and bacteriorhodopsin pumps protons by a common mechanism that uses conserved electrostatic interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, 111(46), 16377-16382.
- Sorokin, D. Y.; Merkel, A. Y.; Abbas, B.; Makarova, K. S.; Rijpstra, W. I. C.; Koenen, M. & Van Loosdrecht, M. C. 2018. *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and “*Candidatus*” *Methanohalarchaeum thermophilum*’, extremely halo (natrono) philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia* classis nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68(7), 1-10.
- Stevenson, A.; Burkhardt, J.; Cockell, C. S.; Cray, J. A.; Dijksterhuis, J.; Fox-Powell, M. & Hallsworth, J. E. 2015. Multiplication of microbes below 0.690 water activity: implications for terrestrial and extraterrestrial life. **Environmental Microbiology**, 17(2), 257-277.
- Sui, L.; Liu, L.; & Deng, Y. 2014. Characterization of halophilic C50 carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. **Chinese journal of Oceanology and Limnology**, 32(6), 1280-1287.
- Sørensen, K. B.; Canfield, D. E.; Teske, A. P.; & Oren, A. 2005. Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(11), 7352-7365.

- Tamang, J. P.; Cotter, P. D.; Endo, A.; Han, N. S.; Kort, R.; Liu, S. & Hutkins, R. 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 19(1), 184-217.
- Thauer, R. K.; Kaster, A. K.; Seedorf, H.; Buckel, W.; & Hedderich, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, 6(8), 579-591.
- Torreblanca, M.; Rodriguez-Valera, F.; Juez, G.; Ventosa, A.; Kamekura, M. e Kates, M. 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, 8(1-2), 89-99.
- Usami, R., Fukushima, T., Mizuki, T., Inoue, A., Yoshida, Y., & Horikoshi, K. 2003. Organic solvent tolerance of halophilic archaea. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 67(8), 1809-1812.
- Ventosa, A. 2006. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. **In Symposia-society for general microbiology**, 66, 223- 254.
- Ventosa, A.; Nieto, J. J. & Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62(2), 504-544.
- Viver, T.; Cifuentes, A.; Díaz, S.; Rodríguez-Valdecantos, G.; González, B., Antón, J. & Rosselló-Móra, R. 2015. Diversity of extremely halophilic cultivable prokaryotes in Mediterranean, Atlantic and Pacific solar salterns: evidence that unexplored sites constitute sources of cultivable novelty. **Systematic and Applied Microbiology**, 38(4), 266-275.
- Wais, A. C. & Daniels, L. L. 1985. Populations of bacteriophage infecting *Halobacterium* in a transient brine pool. **FEMS Microbiology Ecology**, 1(6), 323-326.
- Welsh, D. T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. **FEMS Microbiology Reviews**, 24(3), 263-290.
- Wong, H. L.; Ahmed-Cox, A. & Burns, B. P. 2016. Molecular ecology of hypersaline microbial mats: current insights and new directions. **Microorganisms**, 4(1), 1-15.

Wu, M., Lin, F. & Song, Y. 2022. Engineered Bacteriorhodopsin Film with Oriented Patterns for the Improvement of the Photoelectric Response. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(24), 16079- 16091.

Yakimov, M. M.; La Cono, V.; Spada, G. L.; Bortoluzzi, G.; Messina, E.; Smedile, F. & Giuliano, L. 2015. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater–brine interface is active below the chaotropicity limit of life as revealed by recovery of mRNA. **Environmental Microbiology**, 17(2), 364-382.

Yang, Y., Levick, D. T., & Just, C. K. 2007. Halophilic, thermophilic, and psychrophilic archaea: Cellular and molecular adaptations and potential applications. **Journal of Young Investigators**, 17, 1-12.

Zhilina, T. N., & Zavarzin, G. A. 1987. *Methanohalobium evestigatus* n. gen., n. sp.- An extremely halophilic methane-forming archebacterium. **In Akademiia Nauk SSSR, Doklady**, 293 (2), 464-468.

Zhilina, T. N.; Merkel, A. Y. *Methanohalobium*. 2015. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 17, 1-6.