

Haloarqueas (microorganismos extremófilos) como factorías celulares para la producción de bioplásticos y pigmentos naturales

Rosa María Martínez Espinosa

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante

rosa.martinez@ua.es

Resumen

Algunos microorganismos extremófilos, denominados haloarqueas, que habitan medios como las salinas costeras de las que se obtiene sal común, producen unos polímeros biodegradables denominados polihidroxicarboxilatos como compuestos de reserva, además de pigmentos carotenoides. Los pigmentos, principalmente bacteriorrubrina (BR), protegen a las células de la radiación solar y dan color rojo-rosa a las salinas, particularmente en verano. Los microorganismos producen estos compuestos de forma significativa bajo determinadas condiciones nutricionales. Para preparar los medios de cultivo, utilizamos residuos de otras industrias como las desaladoras (salmuera,) o industrias de caramelos (residuos de glucosa y almidón). Así, se ha diseñado un proceso de economía circular que podría paliar el problema ambiental que sufre el Mar Mediterráneo por vertidos de salmueras de plantas desaladoras y de tratamiento de aguas, al tiempo que ofrece una alternativa respetuosa con el medio ambiente para producir bioplásticos y pigmentos naturales muy demandados por diversos sectores industriales (cosmética, nutracéutica, alimentación).

1. Introducción

1.1. Dominio Archaea

En los años 70 (s. XX), diversos estudios basados en el análisis de las secuencias de RNA ribosómico mostraban que prácticamente todos los seres vivos descritos hasta ese momento podían ser agrupados en reinos primarios y que las arqueobacterias podrían construir un grupo genuino de microorganismos procariotas diferente a las bacterias, tanto desde un punto de vista fisiológico y molecular, como desde un punto de vista evolutivo (Woese y Fox, 1977; Woese *et al.*, 1978; Woese y Gupta, 1981). A comienzos de la década de los 90 (s. XX), Carl Woese y sus colaboradores propusieron un nivel superior (taxon) para la clasificación de los seres vivos, denominado "Dominio", de manera que se establecen tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya (Woese *et al.*, 1990; Winker y Woese, 1991).

Así, se postula que los organismos pertenecientes al dominio Eukarya están relacionados (o incluso descienden directamente) de aquellos microorganismos que pertenecen al dominio Archaea (Woese *et al.*, 1990; Forterre, 2015) (Figura 1). Aunque la clasificación de seres vivos en dominios sigue vigente y totalmente aceptada por la comunidad científica y académica, algunos estudios demuestran que las posibles

relaciones filogenéticas entre arqueas y bacterias Gram positivas son mucho más estrechas de lo que se pensaba, dejando claro que las bacterias Gram negativas son filogenéticamente diferentes. Estos estudios están basados principalmente en la comparación de la morfología de las células y de las secuencias conservadas de proteínas (Gupta, 1998a; Gupta, 1998b).

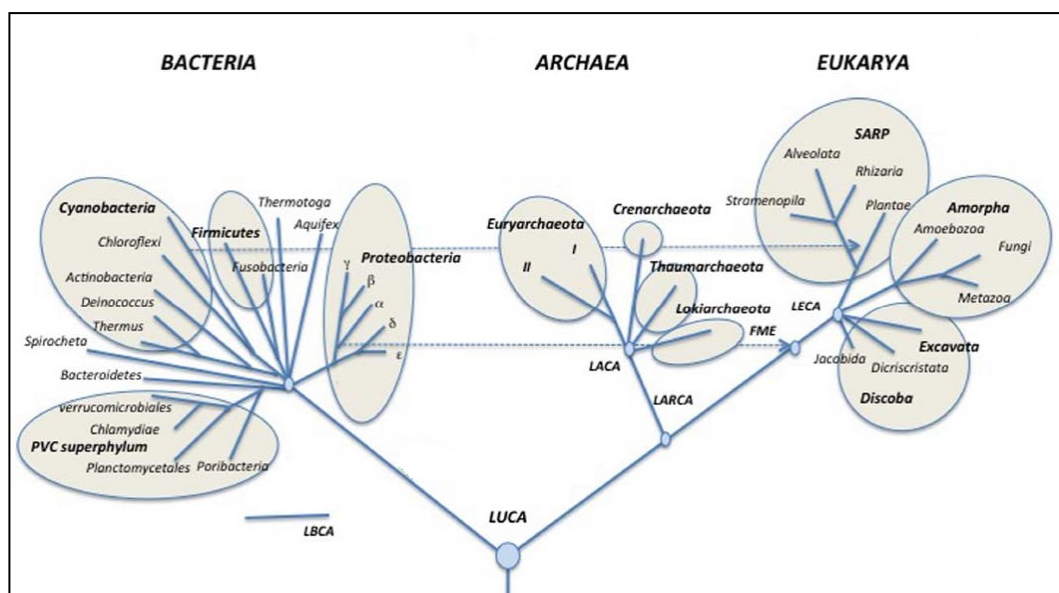


Figura 1: Árbol filogenético universal simplificado. Adaptado de Forterre, 2015.

El dominio Archaea está constituido por microorganismos *procariontas* (es decir, el material genético no está aislado en un núcleo en el interior de la célula) que se caracterizan por ser *extremófilos* (de extremo y la palabra griega φιλία=afecto, amor, es decir "amante de -condiciones- extremas"). Estos microorganismos presentan adaptaciones metabólicas que les permiten vivir en medios muy hostiles para la mayor parte de seres vivos tales como volcanes, fumarolas oceánicas, fosas oceánicas, salinas costeras y de interior o fuentes termales ácidas, por citar algunos ejemplos.

Todos estos ecosistemas están caracterizados por presentar factores fisicoquímico/ambientales extremos tales como temperatura elevada (incluso superior a 100 grados centígrados) o varios grados centígrados bajo cero (interior de los glaciares, por ejemplo), valores de pH extremos (extremadamente ácido o bien muy básico pudiendo ser superior a 10), estrés iónico debido a elevada concentración de sal, elevada radiación UV por exceso de exposición solar, elevada o muy baja presión atmosférica etc.

Estos microorganismos constituyen las poblaciones predominantes en ambientes extremos y por ello, juegan un papel muy importante en la dinámica y ecología de dichos ecosistemas, así como en los ciclos biogeoquímicos, balance de nutrientes y de gases atmosféricos emitidos y fijados. Además, recientes investigaciones demuestran que son más abundantes de lo que inicialmente se preveía y algunas especies más moderadas o con mayor plasticidad para adaptarse a cambios, habitan también ecosistemas que *a priori* no son considerados "extremos" para el desarrollo de la vida (Adam *et al.*, 2017; Eme y Doolittle, 2015).

En función de las condiciones óptimas de crecimiento en las que viven estos microorganismos en sus ecosistemas naturales, se establece la siguiente clasificación de microorganismos extremófilos (Tabla 1):

Tabla 1: Clasificación general de los microorganismos extremófilos (Martínez-Espinosa, 2020).

Nombre	Factor	Límites
Acidófilo	pH	≥ 3
Alcalófilo	pH	≥ 9
Halófilo	Elevada concentración de sal	1-4 M
Hipertermófilo y Termófilo	High temperatures	Hipertermófilo: temperaturas superiores a 80 °C (176 °F) Termófilo: entre 45-122 °C (113-252 °F)
Piezófilo (también denominados Barófilos)	High pressures	~ 1,100 bar
Psicrófilo (también denominados Criófilos)	Low temperatures	≤ -15 °C (5 °F)
Radioresistentes	UV radiation, cosmic rays, X-rays	1,500-6,000 Gy
Xerófilos	Desiccating conditions	$\leq 50\%$ de humedad relativa

Por otro lado, teniendo en cuenta las particularidades de su metabolismo y su capacidad para sobrevivir en condiciones tan extremas y cambiantes, estos microorganismos están centrando la atención de investigadores de todo el mundo por dos cuestiones relevantes:

- i) se están empleando como modelo de estudio del origen de la vida o de la vida en entornos como la Luna o Marte, lo que dio origen a disciplinas como la Astrobiología y a la Exobiología, hacia la segunda mitad del siglo pasado (Rummel, 2014; Moissl-Eichinger *et al.*, 2016).
- ii) son fuente de moléculas de gran interés para procesos biotecnológicos e industriales. En ese sentido, destacan las enzimas de microorganismos extremófilos, catalizadores biológicos capaces de acelerar la velocidad de las reacciones varios órdenes de magnitud para conseguir así procesos industriales que operan en condiciones extremas (sobre todo altas temperaturas y pHs ácidos) más eficientes en términos de coste y tiempo (Singh y Singh 2017).

1.2. Haloarqueas

En líneas generales, cualquier ser vivo que requiere elevadas concentraciones para vivir, recibe el nombre de “*halófilo*” (amante de la sal). Dentro del grupo de microorganismos que pertenecen al dominio Archaea, la arqueas que se caracterizan por presentar altos requerimientos de sal para vivir reciben el nombre de haloarqueas. Las concentraciones óptimas para su crecimiento oscilan entorno a 1-4 M, o en otras palabras, unos 116 gr/L de sal en el caso de una concentración de 2M, lo que supone una concentración de sal tres veces superior al agua de mar. Desde un punto de vista taxonómico (ciencia que se ocupa de clasificar los seres vivos), las haloarqueas se agrupan básicamente en dos grandes familias: *Halobacteriaceae* y *Haloferacaceae* (Gupta *et al.*, 2015), y entre las adaptaciones moleculares y fisiológicas que han desarrollado para vivir en presencia de altas concentraciones de sal destacan las siguientes: acumulación intracelular de elevadas concentraciones de cloruro potásico (KCl), alto contenido de residuos de aminoácidos ácidos en sus proteínas, síntesis de determinados moléculas denominadas solutos compatibles (modulan la presión osmótica de las células debido a la elevada concentración de sal en el exterior celular) y alto contenido en las bases nitrogenadas guanina (G) y citosina (C) en la composición química del material genético (ácido desoxirribonucleico o ADN) (Andrei *et al.*, 2012; Oren, 2013).

Estos microorganismos constituyen parte de las poblaciones microbianas en ambientes naturales salinos como lagos, lagunas y estanques salados de superficie, depósitos salinos subsuperficiales, domos salinos submarinos o marismas, siendo las comunicades principales cuando las concentraciones de sal en el suelo o en cuerpos de agua aumentan por evaporación del agua (Oren, 2002; de la Haba *et al.*, 2011; Andrei *et al.*, 2012). Ejemplos bien caracterizados de estos ecosistemas son: el Mar Muerto (Israel-Palestina y Jordania), el Lago Magadi (Kenia) o el Gran Lago Salado (EE. UU.). Otros ambientes hipersalinos creados artificialmente como las balsas de precipitación usadas para obtener sal común (NaCl en particular), normalmente cerca del mar, también son ecosistemas óptimos para el desarrollo de poblaciones de haloarqueas (DasSarma *et al.*, 2019). Ejemplos de estos ecosistemas pueden ser encontrados en la península Ibérica, tanto en el interior como en la costa, siendo buenos ejemplos de ellos salinas costeras y de interior del litoral Mediterráneo en el sureste de España (provincias de Alicante y Valencia, Murcia, por citar algunos ejemplos). (Figura 2).

El posible papel de las arqueas en general, y de las haloarqueas en particular, en los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza ha sido escasamente estudiado hasta la fecha en comparación con bacterias, hongos u organismos eucariotas. Así, aunque la producción y consumo del gas metano por parte de arqueas ha sido ampliamente descrito, sólo existían hasta comienzos del siglo XXI unos pocos estudios sobre los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, el hierro, el carbono y el azufre en arqueas, siendo la mayoría de ellos sobre asimilación de nitrato, nitrito y amonio, o bien sobre reducción anaeróbica de nitrato a nitrito en el caso de las haloarqueas (Martínez-Espinosa, 2020).



Figura 2. Fotografías de salinas artificiales para la obtención de sal (NaCl). A. Salero Viejo y Salinas de Penalva en el término municipio del Villena (Alicante, España): salinas de interior en las que las balsas se llenan con agua salina subterránea bombeada a la superficie. B. Salinas de Santa Pola (Alicante, España): salinas costeras de las que junto con C: Salinas de Torrevieja (Alicante, España), también costeras, se extrae la mayor parte del NaCl para consumo humano de Europa. D. Salineras de Maras (Cusco, Perú): salinas a 3.380 metros de altura sobre el nivel del mar. Fotografías libres de derechos obtenidas en búsquedas a través de Google.

Teniendo en cuenta que: i) las áreas salinas e hipersalinas están creciendo en tamaño y prevalencia en el suroeste europeo (Torregrosa-Crespo *et al.* 2019) debido a los procesos de desertificación actuales causados por el cambio climático y la intensiva explotación de los recursos hídricos (Martínez-Espinosa *et al.*, 2011; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2013; Maestre *et al.*, 2016); ii) que las concentraciones de nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) en estos ecosistemas está creciendo anualmente debido al uso de fertilizantes en la agricultura y al vertido descontrolado de aguas residuales urbanas e industriales (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2018); y, iii) considerando la baja solubilidad de oxígeno en suelos y aguas salinas e hipersalinas, se puede concluir que los microorganismos extremófilos, y en particular las haloarqueas, podrían estar jugando un papel relevante en los ciclos biogeoquímicos naturales.

En este sentido, diversas investigaciones recientes han puesto de manifiesto que las haloarqueas son los microorganismos responsables de las principales reacciones de dichos ciclos en medios hipersalinos. En paralelo, se ha descrito con cierto detalle la capacidad que tienen ciertas haloarqueas para crecer y eliminar compuestos tóxicos de las salmueras tales como nitratos, nitritos, percloratos, cloratos, petróleo, compuestos aromáticos etc., lo cual hace de las haloarqueas unos microorganismos de gran interés para el desarrollo de procesos de biorremediación y descontaminación de salmueras y aguas residuales urbanas o industriales con una salinidad media/alta (Shrivastava *et al.*, 2022).

2. Haloarqueas como fuentes naturales para la producción de compuestos de alto valor añadido

Diversas investigaciones realizadas empleando haloarqueas como modelo de estudio han demostrado que producen biomoléculas de gran interés biotecnológico como hidratos de carbono, enzimas, antibióticos, polímeros de naturaleza plástica biodegradables y pigmentos carotenoides (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2017).

De entre estas moléculas, los carotenoides y los plásticos biodegradables tienen considerable valor añadido en determinados sectores industriales (agroalimentación, cosmética y farmacéutica, entre otros) y son muchas las iniciativas actuales a nivel nacional e internacional que abogan por la sustitución de pigmentos y plásticos de síntesis química por análogos de origen natural más bioasimilables y totalmente biodegradables. En las secciones siguientes se ofrece detalle del tipo de pigmentos carotenoides y bioplásticos que son producidos por haloarqueas y que en estos momentos se encuentran en fase de estudio a escala de laboratorio y piloto con el objetivo de determinar la viabilidad del uso de haloarqueas como factorías celulares a gran escala para la síntesis de estos compuestos.

2.1. Carotenoides en haloarqueas: bacteriorruberrina

Los carotenoides son pigmentos naturales que desde un punto de vista químico se consideran compuestos isoprenoides (ya que la molécula precursora que se requiere para su síntesis es el *isopreno*). Estos pigmentos son fabricados por plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Actualmente se han descrito más de setecientos compuestos carotenoides. En función de su composición y estructura química, los carotenoides pueden clasificarse en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos son carotenoides no oxigenados (no tienen oxígeno en su composición) y las xantófilas son derivados oxigenados de los carotenos. Estos pigmentos son los responsables de los colores rojo, naranja, rosa y amarillo que en la naturaleza muestran la mayor parte de las flores, frutos, etc.

La mayor parte de las especies de haloarqueas caracterizadas hasta la fecha presentan una coloración que puede variar entre el rosa claro y el rojo intenso y que resulta de la síntesis de carotenoides (como el β -caroteno, el licopeno y la bacteriorruberrina), y de ciertas proteínas de membranas implicadas en los procesos que controlan la bioenergética de las células (bacteriorrodopsinas, por ejemplo) (Lanyi, 2004; Calegari-Santos *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2019). La bacteriorruberrina y sus derivados son con diferencia, los carotenoides mayoritarios en la mayor parte de las haloarqueas que han sido caracterizadas hasta la fecha (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015) (Figura 3).

Estudios bioinformáticos recientes empleando las secuencias de los genomas (secuencia de genes de un organismo) de haloarqueas disponibles en las bases de datos han permitido dilucidar las rutas de síntesis de los carotenoides (*carotenogénesis*) en haloarqueas. Así, se ha identificado que la carotenogénesis en haloarqueas cuenta con reacciones similares o incluso idénticas a las descritas en plantas, hongos y levaduras, pero otras reacciones son totalmente novedosas (Giani *et al.*, 2020), siendo la bacteriorruberrina el pigmento mayoritario producido por

haloarqueas (Figura 3C). La bacteriorruberrina se considera un carotenoide raro ya que contiene 50 átomos de carbono en su estructura, en lugar de 40 como ocurre en la mayor parte de pigmentos carotenoides de la naturaleza (Giani y Martínez-Espinosa, 2020). Este avance en el conocimiento, junto con estudios de caracterización de dichos pigmentos, han permitido plantear el uso de haloarqueas como fuentes naturales para la producción biotecnológicas de pigmentos. En cuanto a la bacteriorruberrina producida por haloarqueas, recientemente se ha descrito su papel como protector antioxidante en células de la haloarquea *Haloferax mediterranei* utilizando stress oxidativo provocado por adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), comúnmente conocido como “agua oxigenada” (Giani y Martínez-Espinosa, 2020). Este resultado puso en evidencia la gran actividad antioxidante de la bacteriorruberrina de las haloarqueas, lo que ha permitido el planteamiento de investigaciones actualmente en curso y financiadas por convocatorias de investigación del plan nacional (MINECO 2018), el plan autonómico de la Comunidad Valenciana (Convocatoria Prometeo) y convocatorias europeas (H2020 y H2027), en las que se está cuantificando el potencial antioxidante, antitumoral e inmunomodulador de la bacteriorruberrina en líneas celulares humanas.

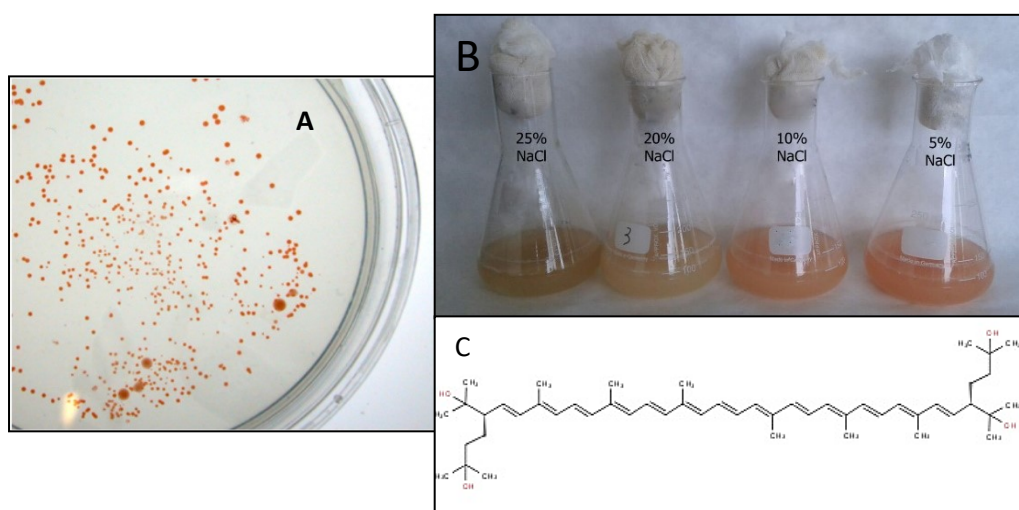


Figura 3. Producción de carotenoides por parte de las haloarqueas. Panel A. colonias de *Haloferax volcanii* crecidas en medio complejo sólido. Panel B: Cultivos de *Haloferax mediterranei* en presencia de concentraciones de sal total que varían entre 5 y 25 % (p/v). Panel C. Estructura química de la bacteriorruberrina, carotenoide mayoritario en las haloarqueas.

2.2. Haloarqueas como factorías celulares para la producción de bioplásticos

El segundo tipo de compuestos objeto de estudio en materia de biotecnología de haloarqueas, son plásticos biodegradables del tipo poli- β -hidroxialcanoatos (PHAs), como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) y el poli-hidroxivalerato (PHV). Este tipo de compuestos son sintetizados por diverso tipo de microorganismos, por tanto, no son exclusivos de haloarqueas.

Desde un punto de vista químico, la mayor parte de estos bioplásticos son poliésteres alifáticos constituidos por unidades (monómeros) como las que aparecen

en la figura 4. Diferentes variables en el proceso de unión de los monómeros (proceso que recibe el nombre de polimerización) determinan finalmente la masa molecular, la longitud y las ramificaciones de los polímeros, dando lugar así, a una familia de compuestos con diversidad de propiedades en términos de rigidez, resistencia térmica, cristalinidad, etc. (Shah *et al.*, 2008; Farah *et al.*, 2016). Estos compuestos son totalmente biodegradables y por sus propiedades fisicoquímicas, son sustitutos perfectos respetuosos con el medio ambiente de los plásticos fabricados a partir de derivados del petróleo (que no son biodegradables) (Muhammadi *et al.*, 2015; Rameshkumar *et al.*, 2020).

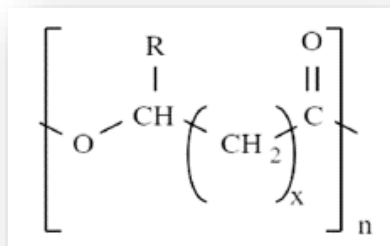


Figura 4. Estructura química de los polihidroxicanoatos (PHAs).

Tanto las reacciones químicas de síntesis de los monómeros, como el proceso posterior de unión de monómeros para formar las largas cadenas que constituyen estos compuestos, tienen lugar en el interior de las células cuando están sujetas a determinadas condiciones nutricionales como exceso de fuente de carbono, de manera que estos bioplásticos en realidad son una forma de almacenamiento de fuente de carbono para las células y la usan cuando detectan escasez de nutrientes (Winnacker, 2019).

Diversos estudios han descrito la producción de estos polímeros por parte de haloarqueas cuando éstas son crecidas en exceso de fuente de carbono y limitación de fósforo (Simó-Cabrera *et al.*, 2021) (Figura 5).

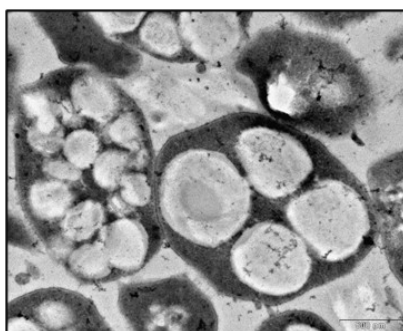


Figura 5. Fotografía a de microscopía electrónica de células de la haloarquea *Haloferax mediterranei* en las que se pueden observar los gránulos de PHB de distinto tamaño en el interior de las células. Esta haloarquea fue aislada por primera vez de muestras de agua de las salinas de Santa Pola (Alicante, España) y es el microorganismo en el que se describió por primera vez el sistema CRISPR-Cas.

Estos compuestos suponen una alternativa al plástico de síntesis química mucho más respetuosa con el medio ambiente, ya que son biodegradables. Sin embargo, su producción a media y gran escala sigue siendo problemática actualmente debido a tres factores fundamentales:

i) la cantidad de PHAs producida por gramo de células es baja si se compara con la producción que sería deseable para su explotación comercial,

ii) la composición del medio de cultivo (agua de sales con una concentración total de sales entorno al 20 % y exceso de fuente de carbono) hace que éste sea relativamente caro y los tiempos de incubación suelen ser largos en comparación con otros microorganismos productores de estos biopolímeros,

iii) el procesamiento de la biomasa (procesamiento downstream) para el aislamiento de los biopolímeros plásticos requiere el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, lo que encarece la producción y genera una gran cantidad de residuos.

Cualquier avance técnico que minimice el impacto negativo de cualquiera de estos tres factores, permitiría abordar el uso de haloarqueas como fuente natural para la producción de PHAs a escala industrial. Así, desde hace varios años, en el grupo de investigación “Bioquímica Aplicada” de la Universidad de Alicante (España) ([https://cvnet.cpd.ua.es/curriculum-breve/grp/es/bioquimica-aplicada-applied-biochemistry-\(appbiochem\)/659](https://cvnet.cpd.ua.es/curriculum-breve/grp/es/bioquimica-aplicada-applied-biochemistry-(appbiochem)/659)), se trabaja en una línea de investigación que plantea el uso de la biomasa obtenida durante los estudios de tratamiento de salmueras y aguas residuales como materia prima para la obtención de estos compuestos (Figura 6). Determinadas salmueras obtenidas durante los procesos de desalación de agua de mar o bien como residuos de determinadas actividades industriales, tienen una carga de compuestos orgánicos e inorgánicos ricos en carbono y nitrógeno, aspecto que permite el crecimiento óptimo de las haloarqueas al tiempo que se favorece la inducción de la síntesis tanto de los pigmentos, como de los bioplásticos, sin necesidad de suplementar los medios con fuentes de carbono adicionales. En paralelo, los estudios se hacen tanto con las cepas silvestres de las haloarqueas, como con cepas modificadas genéticamente para optimizar la producción de los bioplásticos en unos casos, y los pigmentos (bacteriorrubrina en particular) en otros.

Además, en esta estrategia, se plantea el uso de DESs (Deep eutetic solvents) sistemas de dos componentes químicos en fase líquida que además de otras aplicaciones, han demostrado su efectividad para la extracción de compuestos de diversa índole y con distintas propiedades químico-físicas. Resultados preliminares han mostrado que estos DESs se pueden emplear como sustitutos de los disolventes orgánicos para el aislamiento de los polímeros plásticos y los carotenoides de las células. Esta aproximación supone alternativa respetuosa con el medio ambiente al uso de los disolventes orgánicos como acetona o éter, disolventes habitualmente utilizados a escala industrial en el procesado de la biomasa con el consecuente impacto negativo en términos de contaminación (Zuo *et al.*, 2019).

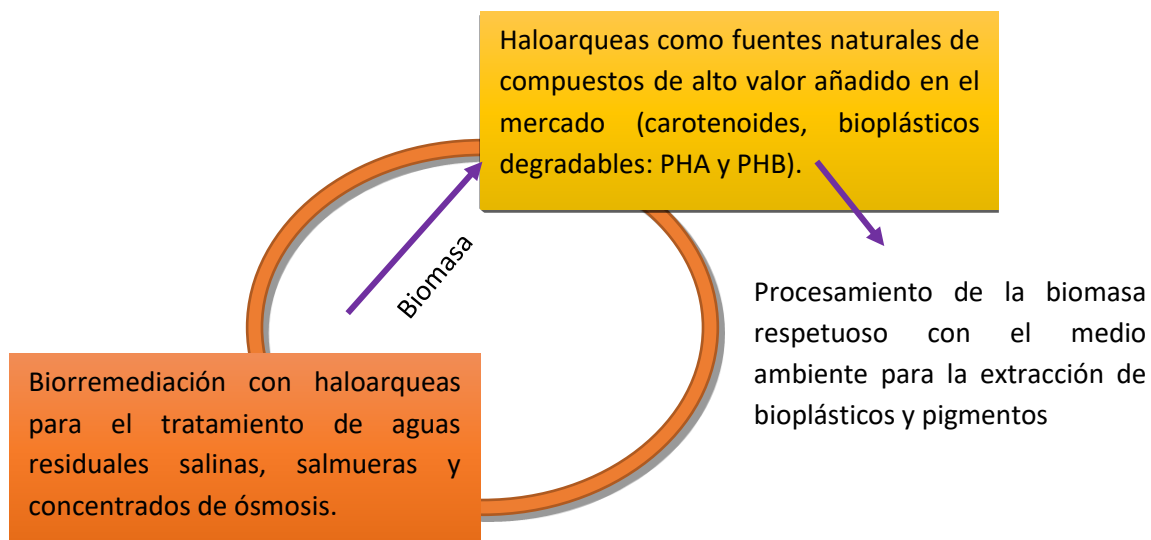


Figura 6. Marco conceptual del proyecto de investigación resumido en este artículo.

Referencias bibliográficas:

- Adam PS, Borrel G, Brochier-Armanet C, Gribaldo S. (2017) The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *ISME J.* 11(11): 2407-2425. doi: 10.1038/ismej.2017.122.
- Andrei AŞ, Banciu HL, Oren A. (2012) Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett.* 330(1): 1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x
- Calegari-Santos R, Diogo RA, Fontana JD, Bonfim TM. (2016) Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions. *Curr Microbiol.* 72(5): 641-51. doi: 10.1007/s00284-015-0974-8.
- DasSarma P, Capes MD, DasSarma S. (2019) Comparative genomics of *Halobacterium* strains from diverse locations. In: *Microbial diversity in the genomic era*; Das S, Dash HR (eds). London: Elsevier, pp. 285-322.
- de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Márquez MC, Ventosa A. (2011) Taxonomy of halophiles. In: *Extremophile Handbook*; Horikoshi K. (ed). Tokyo, Japan, pp. 256-283.
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Gallardo A, Quero JL, Ochoa V, García-Gómez M, Escolar C, García-Palacios P, Berdugo M, Valencia E, Gozalo B, Noumi Z, Derak M, Wallenstein MD. (2013) Aridity modulates N availability in arid and semiarid Mediterranean grasslands. *PLoS One.* 8(4): e59807. doi: 10.1371/journal.pone.0059807.
- Eme L, Doolittle WF. (2015) Archaea. *Curr Biol.* 25(19): R851-5. doi: 10.1016/j.cub.2015.05.025.
- Farah S, Anderson DG, Langer R (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications— A comprehensive review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107, 367–392.
- Forster P. (2015) The universal tree of life: an update. *Front Microbiol.* 6: 717. doi: 10.3389/fmicb.2015.00717.
- Giani M, Martínez-Espinosa RM (2020). Carotenoids as a Protection Mechanism against Oxidative Stress in *Haloferax mediterranei*. *Antioxidants (Basel).* 9(11):1060. doi: 10.3390/antiox9111060.

Giani M, Miralles-Robledillo JM, Peiró G, Pire C, Martínez-Espinosa RM (2020). Deciphering Pathways for Carotenogenesis in Haloarchaea. *Molecules*. 25(5):1197. doi: 10.3390/molecules25051197.

Gupta RS, Naushad S, Baker S. (2015) Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 65(Pt 3): 1050-1069. doi: 10.1099/ijso.0.070136-0.

Gupta RS. (1998a) Life's third domain (Archaea): an established fact or an endangered paradigm? *Theor Popul Biol*. 54(2): 91-104.

Gupta RS. (1998b) What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol Microbiol*. 29(3): 695-707.

Lanyi JK. (2004) Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol*. 66: 665-688.

Maestre FT, Eldridge DJ, Soliveres S, Kéfi S, Delgado-Baquerizo M, Bowker MA, García-Palacios P, Gaitán J, Gallardo A, Lázaro R, Berdugo M. (2016) Structure and functioning of dryland ecosystems in a changing world. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 47: 215-237. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-121415-032311.

Martínez-Espinosa RM, Cole JA, Richardson DJ, Watmough NJ (2011) Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochem Soc Trans* 39: 175-178.

Martínez-Espinosa RM (2020). Microorganisms and Their Metabolic Capabilities in the Context of the Biogeochemical Nitrogen Cycle at Extreme Environments. *Int J Mol Sci*. 21(12):4228. doi: 10.3390/ijms21124228.

Moissl-Eichinger C, Cockell C, Rettberg P. (2016) Venturing into new realms? Microorganisms in space. *FEMS Microbiol Rev*. 40(5):722-37. doi: 10.1093/femsre/fuw015.

Muhammadi S, Afzal M, Hameed S. (2015) Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem. Lett. Rev*. 8, 56-77.

Oren A. (2013) Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol*. 4: 315. doi: 10.3389/fmicb.2013.00315.

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63.

RameshKumar S, Shaiju P, O'Connor KE, Babu R. (2020) Bio-based and biodegradable polymers-State-of-the-art, challenges and emerging trends. *Curr Opin. Green Sustain. Chem*. 21, 75-81.

Rodrigo-Baños M, Garbayo I, Vílchez C, Bonete MJ, Martínez-Espinosa RM. (2015) Carotenoids from Haloarchaea and their potential in Biotechnology. *Mar Drugs* 13 (9): 5508-5532.

Rummel JD (2014). Carl Woese, Dick Young, and the roots of astrobiology. *RNA Biol*. 11(3):207-9. doi: 10.4161/rna.27702.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv*. 26, 246-265.

Kochhar N, I K K, Shrivastava S, Ghosh A, Rawat VS, Sodhi KK, Kumar M (2022) Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Curr Res Microb Sci*. ;3:100134. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100134.

Simó-Cabrera L, García-Chumillas S, Hagagy N, Saddiq A, Tag H, Selim S, AbdElgawad H, Arribas Agüero A, Monzó Sánchez F, Cánovas V, Pire C, Martínez-

Espinosa RM. (2021) Haloarchaea as Cell Factories to Produce Bioplastics. *Mar Drugs*. 19(3):159. doi: 10.3390/md19030159.

Singh A, Singh AK. (2017) Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. *Biotechnol Lett*. 39(12):1793-1800. doi: 10.1007/s10529-017-2434-y.

Torregrosa-Crespo J, Pire Galiana C, Bergaust L, Martínez-Espinosa RM. (2018) Denitrifying haloarchaea: sources and sinks of nitrogenous gases. *FEMS Microbiol Lett* 365 (3): 1-6.

Torregrosa-Crespo J, Pire Galiana C, Martínez-Espinosa RM, Bergaust, L. (2019) Denitrifying haloarchaea within the genus *Haloferax* display divergent respiratory phenotypes, with implications for their release of nitrogenous gases. *Environ Microbiol*. 21(1):427-436. doi: 10.1111/1462-2920.14474.

Torregrosa-Crespo J, Pire Galiana C, Martínez-Espinosa RM. (2017) Biocompounds from Haloarchaea and Their Uses in Biotechnology. In “New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications”, pp 63-82 (2017). <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69944>. Editor: Haitham Sghaier, Afef Najjari, Kais Ghedira. Editorial: Intech. I.S.B.N. 978-953-51-3570-8

Verma DK, Baral I, Kumar A, Prasad SE, Thakur KG. (2019) Discovery of bacteriorhodopsins in Haloarchaeal species isolated from Indian solar salterns: deciphering the role of the N-terminal residues in protein folding and functional expression. *Microb Biotechnol*. 12(3): 434-446. doi: 10.1111/1751-7915.13359.

Winker S, Woese CR. (1991) A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst Appl Microbiol*. 14(4): 305-310.

Winnacker M (2019) Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 121, 1900101.

Woese CR, Fox GE. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(11): 5088-5090.

Woese CR, Gupta R. (1981) Are archaebacteria merely derived 'prokaryotes'? *Nature*. 289(5793): 95-96.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc Natl Acad Sc USA* 87, 4576-79

Woese CR, Magrum LJ, Fox GE. (1978) Archaeobacteria. *J Mol Evol*. 11(3): 245-251

Zuo M, Zeng X, Sun Y, Tang X, Lin L. (2020) Processing of biomass in deep eutectic solvents. In *Deep eutectic solvents: Synthesis, properties and applications*; Ramón DJ, Guillena G (eds) Weinheim: Wiley-VCH, pp. 235-255.