

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Vanise Pereira de Medeiros

**COMUNIDADE MICROBIANA DE UM TAPETE HIPERSALINO DE PUNA  
ATACAMA COMO MODELO ASTROBIOLÓGICO**

Porto Alegre

2020



Vanise Pereira de Medeiros

**COMUNIDADE MICROBIANA DE UM TAPETE HIPERSALINO DE PUNA  
ATACAMA COMO MODELO ASTROBIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon.

Porto Alegre

2020

“Asumimos que la vida es una consecuencia natural de las leyes físicas que actúan en ambientes propicios, y esta secuencia de procesos físicos – como sucedió en la Tierra – puede ocurrir en otros lugares (Principio de Mediocridad)”

Guillermo A. Lemarchand



## AGRADECIMENTOS

A pós-graduação requer dedicação e é um período marcado por inúmeros desafios, aprendizados, autodeterminação, alegrias, tristezas, dores e descobertas. Durante esta caminhada, embora as motivações sejam internas e pessoais, associo esta conquista a pessoas que passaram na minha vida e contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste estudo.

Especialmente, a minha família que contribuiu em todos os processos da minha vida para esta conquista. Dedico ao meu pai, Geraldo (*in memoriam*) com todo meu amor e gratidão. Agradeço minha mãe, Elena, minhas irmãs Valéria e Viviane e meu sobrinho Lucas pelo profundo apoio e compreensão durante esses anos. Ao meu namorado, Erik, pelos seus ensinamentos, dedicação e compreensão na minha ausência. Obrigada por ser meu porto seguro.

Gostaria de agradecer aos meus professores de mestrado que compartilharam seus conhecimentos. Em especial, a Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon, que abraçou a mim e à pesquisa entendendo que a motivação está naquilo que amamos. Agradeço a oportunidade, seu apoio, ensinamentos e as palavras de carinho. Ademais, agradeço a orientação e contribuições para que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente que estiveram presentes nos momentos bons e ruins. Agradeço a ajuda nas realizações das disciplinas e muitas vezes como um ombro amigo. Em especial Fernanda Araújo pela amizade e por me fazer rir em momentos tristes. Agradeço à Mariane Lobato, Thais Livramento, Amanda Domingues por me receber no laboratório para uma conversa e um café quando tudo parecia difícil.

Aos meus colegas do laboratório 222C que reúne um grupo unido e dedicado. Agradeço todo auxílio, ensinamentos, paciência e compreensão. Em especial à Tiela que esteve do meu lado desde a graduação, obrigada pelos seus ensinamentos, apoio e contribuições. Agradeço à Letícia e Priscila pela dedicação e por escutarem minhas inquietações. À Gabriela Breyer pela paciência de me ensinar e pela companhia em nossa viagem para congresso internacional. Ao Alberto que neste último momento me mostrou que os momentos difíceis são passageiros. Agradeço à Luana Dornelles que iniciou como minha estagiária, porém quem mais ensinou foi ela. Agradeço seu apoio,

amizade e contribuições neste trabalho. Ao Ícaro pela colaboração e paciência com as minhas inúmeras perguntas e à Michele por estar sempre pronta a nos ajudar. À toda equipe do laboratório desejo todo sucesso em suas carreiras.

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Rodrigues, pelo seu acolhimento, ensinamentos e contribuições. Da mesma forma, agradeço toda equipe do laboratório de Astrobiologia da USP. Meu crescimento profissional foi realizado a partir das experiências que tive ao lado de vocês. Agradeço a Dra. Amanda Bendia, por sempre dedicar seu tempo a me ajudar. Obrigada por me inspirar todos os dias.

Agradeço a Dra. Maria Eugenia Farias que aceitou fazer parte neste trabalho. Agradeço a oportunidade e ensinamentos. Agradeço à equipe do Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas (LIMLA-PROIMI) pelo acolhimento.

Agradecimento em especial a minha amiga e profissional que me inspira, Thays Bentes. Nossa amizade começou através do nosso amor à ciência. Obrigada pelos ensinamentos e pela companhia nas madrugadas no laboratório da USP.

Agradecimentos igualmente especiais ao Prof. Dr. Cicero Escobar, pela sua paciência e dedicação ao ser o primeiro a me ensinar sobre a ciência astrobiologia. Obrigada pelo incentivo a ingressar na área.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

# COMUNIDADE MICROBIANA DE UM TAPETE HIPERSALINO DE PUNA ATACAMA COMO MODELO ASTROBIOLÓGICO<sup>1</sup>

Autor: Vanise Pereira de Medeiros

Orientador(a): Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Ana Paula Guedes Frazzon

## RESUMO

O estudo dos tapetes microbianos modernos desperta grande interesse em investigações astrobiológicas, pois as informações geradas podem fornecer novos elementos para o entendimento sobre a origem, desenvolvimento e limites da adaptação da vida na Terra, além de oferecer inéditos parâmetros às investigações em ambientes extraterrestres. Com vistas a ampliar os conhecimentos dentro da astrobiologia, objetivou-se estudar a comunidade microbiana presente no tapete hipersalino da laguna Ojos de Campo, situada na Puna Atacama, Argentina, com o propósito de avaliar a composição taxonômica e a tolerância às condições de estresse osmótico. Para tanto, foram realizadas as seguintes análises: (1) composição taxonômica e predição funcional da comunidade microbiana do tapete hipersalino, mediante sequenciamento de alto rendimento do gene *16S rRNA*; (2) análises das bactérias cultiváveis por meio do emprego de cultura marinha em três temperaturas diferentes (15, 30 e 45 °C), sob condições aeróbias e anaeróbias e; (3) análise qualitativa da tolerância de isolados aos sais de perclorato de magnésio [ $Mg(ClO_4)_2$ ] e análise quantitativa de tolerância da cepa OC 9.7 aos sais de cloreto de sódio (NaCl), sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e  $Mg(ClO_4)_2$ . O resultado da composição microbiana demonstrou que os filos majoritários no tapete são: Proteobactérias (44,4 %), Bacteroidetes (8,9 %), Firmicutes (3,8 %), Verrucomicrobia (3,3 %) e Cianobactérias (2,9%). As famílias de maior abundância dos respectivos filos, a incluir Oscillatoriaceae (Cianobactéria), constituíram bactérias capazes de metabolizar o enxofre. A predição metabólica identificou uma comunidade microbiana envolvida no metabolismo do metano, nitrogênio e enxofre. No total, 33 bactérias foram isoladas e identificadas aos gêneros de *Bacillus*, *Halomonas* e *Shewanella*. Destas, 54 % apresentaram tolerância à concentração de 0,5 M de  $Mg(ClO_4)_2$ . A cepa OC 9.7, identificada como *Halomonas boliviensis*, obteve crescimento em até 1,0 M de  $Mg(ClO_4)_2$  e constitui resultado inédito. Ademais, mostrou-se tolerante em 25 % de NaCl e 2,0 M de  $MgSO_4$ . Os resultados mostram que a comunidade microbiana expõe uma possível organização das primeiras formas de vida na Terra. Da mesma forma, organismos que vivem neste ambiente extremo, com tolerância a altas concentrações de sais, podem ser usados em pesquisas astrobiológicas.

Palavras-chave: Tapete Microbiano, Puna Atacama, Marte, Perclorato, *Halomonas*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (89 p.) fevereiro, 2020.

# MICROBIAL COMMUNITY OF A PUNA ATACAMA HYPERSALINE MAT AS ASTROBIOLOGICAL MODEL<sup>2</sup>

Author: Vanise Pereira de Medeiros

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

## ABSTRACT

The study of modern microbial mats arouses great interest in astrobiological investigations, since the information generated can provide new elements for understanding the origin, development and limits of the adaptation of life on Earth and, enable unprecedented parameters to investigations of extraterrestrial environments. In order to broaden the within astrobiology, the aim of this investigation was to study the microbial community present in the hypersaline mat of the Ojos de Campo lagoon, located in Puna Atacama, Argentina, with the purpose to evaluate the taxonomic composition and tolerance to osmotic stress conditions. For this purpose following analyzes were performed: (1) the taxonomic composition and functional prediction of the microbial community of the hypersaline mat, through high-throughput sequencing of the *16S rRNA* gene; (2) analyzes of cultivable bacteria using marine culture at three different temperatures (15, 30 and 45 °C) under aerobic and anaerobic conditions and; (3) qualitative analysis of the tolerance of isolates to the magnesium perchlorate salts  $[Mg(ClO_4)_2]$  and quantitative analysis of the tolerance of the OC 9.7 strain to the sodium chloride (NaCl), magnesium sulphate ( $MgSO_4$ ) and  $Mg(ClO_4)_2$ . The result of the microbial composition showed that the majority phyla on the mat were: Proteobacteria (44.4%), Bacteroidetes (8.9 %), Firmicutes (3.8 %), Verrucomicrobia (3.3 %) and Cyanobacteria (2.9 %). The most abundant families of the respective phyla, includes (Cyanobacteria), constituting of the bacteria capable of metabolizing sulfur. The metabolic prediction identified a microbial community involved in the metabolism of methane, nitrogen and sulfur. In total, 33 bacteria were isolated and identified to the genera of *Bacillus*, *Halomonas* and *Shewanella*. Of these, 54 % showed tolerance to 0.5  $Mg(ClO_4)_2$  concentration. The OC 9.7 strain, identified as *Halomonas boliviensis*, grown to 1.0 M  $Mg(ClO_4)_2$  and is an unprecedented result. In addition, it was tolerant to 25 % of NaCl and 2.0 M of  $MgSO_4$ . The results show that the microbial community exposes a possible organization of the first life forms on Earth. Similarly, organisms living in this extreme environment with tolerance to high concentrations of salts, might be used in research astrobiology.

Key Words: Microbial mats, Puna Atacama, Mars, Perchlorate, *Halomonas*

---

<sup>2</sup> Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (89 p.) february, 2020.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 Ciência Astrobiologia.....	19
3.2 Ambientes Extremos e sua Habitabilidade .....	20
3.3 Lagunas Hipersalinas de Elevadas Altitudes.....	21
3.4 Tapetes Microbianos de Lagunas Hipersalinas.....	23
3.5 Microbioma em Ambientes Extremos .....	25
3.6 Extremófilos.....	26
3.7 Halófilos e Halotolerantes.....	28
3.8 <i>Halomonas sp.</i> .....	30
3.9 Ambientes da Terra e Marte – Passado e Presente.....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 Coletas de Amostras .....	35
4.2 Análise da Comunidade Bacteriana Presente no tapete Microbiano.....	36
4.2.1 Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA Total.....	36
4.2.2 Caracterização Taxonômica e Predição Metabólica Via Bioinformática.....	37
4.3 Isolamento dos Microrganismos Halófilos .....	38
4.3.1 Identificação dos Isolados por MALDI-TOF.....	38
4.3.2 Identificação Genotípica dos Isolados Halófilos por Métodos Moleculares .....	39
4.3.3 Identificação das Espécies Isoladas por Métodos Bioquímicos .....	40
4.4 Análise de tolerância a sais caotrópicos.....	41
4.4.1 Análise Qualitativa de Tolerância ao Perclorato de Magnésio .....	41
4.4.2 Análise Quantitativa de Tolerância aos Sais de Cloreto de Sódio, Sulfato e Perclorato de Magnésio .....	41
4.5 Análises Estatísticas .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>

5.1 Classificação Taxonômica da Comunidade Bacteriana .....	43
5.2 Previsão Funcional da Comunidade Microbiana .....	45
5.3 Identificação de Isolados Halófilos no Tapete Microbiano.....	46
5.4 Tolerância dos Isolados a Altas Concentrações de Sal .....	48
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
6.1 Composição Taxonômica de Tapete Microbiano .....	51
6.2 Predição Metabólica .....	54
6.3 Identificação dos Isolados .....	55
6.4 Tolerância a Sais.....	57
6.5 Implicações na Astrobiologia Bacteriana.....	59
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>84</b>
9.1 Apêndice 1 .....	84
9.2 Apêndice 2 .....	87
9.3 Apêndice 3 .....	91
9.4 Apêndice 4 .....	92
9.5 Apêndice 5 .....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relações entre Organismos Extremófilos e seus Ambientes .....	27
Tabela 2 – Comparação dos Resultados de Sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i> entre as similaridades do MALDI-TOF .....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização geográfica dos lagos andinos de altitude .....	22
Figura 2 – Visão geral da estrutura taxonômica e ecológica de tapetes microbianos .....	24
Figura 3 – Curvas ilustrativas dos padrões das diferentes categorias dos halófilos .	29
Figura 4 – Sedimentos em um antigo lago na cratera Gale em Marte .....	34
Figura 5 – Mapa de localização da Laguna Ojos de Campo .....	35
Figura 6 – Gráfico dos táxons mais abundantes até o nível de classe no tapete microbiano deste estudo .....	43
Figura 7 – Gráfico de radar demonstrando as famílias mais abundantes .....	45
Figura 8 – Categorias KEGG previstas por PICRUSt .....	46
Figura 9 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança .....	48
Figura 10 – As curvas de crescimento da cepa OC-9.7 .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
<i>16S rRNA</i>	<i>16s RNA ribossomal</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette transporters</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pairs</i>
Cl	Cloro
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CFB	Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EPS	Exopolissacarídeo
ESA	<i>European Space Agency</i>
g	Gramas
h	Horas
HAAL	<i>High Altitude Andean Lakes</i>
K	Potássio
kGy	Quilo Gray
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome</i>
m	Metros
M	Mol/ Litro
MALDI-TOF	Espectrometria de massa associada à ionização/dessorção de matriz assistida por laser
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Perclorato de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio

min	Minutos
MISS	<i>Microbially induced sedimentary structure</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mpa	Mega Pascal
NaCl	Cloreto de sódio
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NSTI	<i>Nearest Sequence Taxon Index</i>
ng	Nanograma
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
OCA	Ojos de Campo
OD	Densidade óptica
KO	<i>Orthology</i>
OTUS	<i>operational taxonomic unit</i>
p/v	Peso/Volume
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PICRUST	<i>Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States</i>
Qiime	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rpm	Rotações por minuto
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
Sox	Óxidos de enxofre
TRAP	<i>Tripartite ATP-independent periplasmic transporters</i>
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

Tapetes microbianos ocorrem frequentemente em ambientes extremos da Terra, resultantes das estratégias defensivas de sobrevivência da comunidade, a partir de um arranjo estrutural em micronichos laminados (Bolhuis et al., 2014). Além disso, essas organizações microbianas são consideradas as formas de vida mais antiga já documentadas. De acordo com evidências fósseis, os primeiros organismos terrestres aglomeraram-se em comunidades complexas, o que resultou na formação de tapetes microbianos, provavelmente no início do período arqueano, há quase 3,5 bilhões de anos (Noffke et al., 2013). Os tapetes microbianos hipersalinos modernos são sistemas modelos ecológicos ideais para pesquisas astrobiológicas, pois fornecem importantes compreensões da vida microbiana em eras passadas. Especificamente, disponibilizam informações relevantes quanto aos limites fisiológicos do desenvolvimento da vida na Terra e em outros planetas, como Marte.

Tapetes microbianos hipersalinos são encontrados em lagos na região desértica de Puna Atacama a até 6000 metros de altitude. Esta região é caracterizada como um dos lugares mais extremos da Terra porque registra os níveis mais altos de radiação solar (Albarracín et al., 2015). Os lagos hipersalinos presentes nesta extensão estão inseridos em um ambiente árido com precipitação episódica e sazonal, acarretando a presença de alta salinidade associada a depósitos de cloretos, sulfatos e percloratos (Parro et al., 2011; Smith et al., 2014). Embora este ambiente extremo seja constituído por uma gama de características desafiadoras ao desenvolvimento metabólico dos organismos, a grande maioria dos nichos hipersalinos da região possui microbiodiversidade com capacidade adaptativa ao estresse determinado pelo ambiente hostil (Albarracín; Gärtner; Farias, 2016).

Ambientes hipersalinos terrestres representam condições semelhantes às da formação inicial de Marte, a partir da descoberta da presença de sais caotrópicos na sua superfície, o que infere a possibilidade de antigas formações de salmouras líquidas neste planeta (Martínez e Renno, 2013). Ainda que a existência de água líquida seja um indício importante para compreender a potencialidade de vida em Marte, a presença de altas salinidades influencia a força iônica de solução, com probabilidade de atuar como barreira na habitabilidade (Fox-Powell et al., 2016). Isto porque salmouras de alta caotropicidade podem perturbar atividades celulares e causar deformações em moléculas biológicas (Cray et al., 2013).

Os processos pós-deposicionais e as assinaturas fósseis em ambientes extremofílicos registram uma biodiversidade complexa e ainda pouco conhecida (Petroff et al., 2010). Portanto, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estudar a composição taxômica da comunidade bacteriana presente em tapete hipersalino visando identificar a estrutura e dinâmica dessa população e assim contribuir para o conhecimento dos primeiros arranjos de vida na Terra. A tolerância a sais caotrópicos de uma comunidade de bactérias cultiváveis deste microecossistema também foi avaliada, com o intuito de melhor compreender os limites para o desenvolvimento da vida na Terra e em outros planetas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Postulou-se, enquanto objetivo geral, avaliar a composição taxonômica e a possibilidade de tolerância metabólica às condições de estresse osmótico da comunidade microbiana presente no tapete hipersalino da laguna Ojos de Campo, situada no salar de Antafolla, Argentina.

### 2.2 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral, especificaram-se três procedimentos, conforme discriminado abaixo.

- (I) Identificar a composição microbiana em uma amostra de tapete hipersalino a partir da análise de sequenciamento de última geração, assim como suas predições funcionais;
- (II) Isolar e identificar microrganismos halófilos presentes neste tapete hipersalino;
- (III) Avaliar a tolerância osmótica dos microrganismos halófilos frente a diferentes concentrações de sais de perclorato de magnésio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Ciência Astrobiologia

Para compreender a vida como um fenômeno universal, foi necessário unir distintas áreas da ciência em uma só, denominada de astrobiologia. Essa nova ciência direciona o estudo da formação e adaptação da vida em um contexto cósmico (Cockell, 2015). O campo de pesquisa é a resultante da confluência de áreas de diferentes ciências, como a astronomia, biologia, geologia e suas variantes – astrofísica, biofísica, bioquímica, bioinformática, microbiologia, biogeografia, mineralogia, planetologia, paleobiologia, entre outras. Suas áreas de investigação incluem conceitos fundamentais sobre a vida e, seus ambientes na Terra, as quais possibilitam reconhecer possíveis biosferas extraterrestres (Cockell et al., 2018).

O objetivo da astrobiologia é buscar em conjunto com a astronomia exoplanetas, planetas e satélites potencialmente habitáveis (Kopparapu, 2020). No campo da geologia, o estudo da estrutura e da dinâmica planetária fornece um importante material sobre como esses elementos contribuem para o desenvolvimento e manutenção da vida. Para tanto, deve-se entender cada era geológica como um ambiente que influenciou o desenvolvimento da vida de determinada forma (Cavalazzi e Barbieri, 2016). Da mesma forma, o registro fóssil fornecido pelo estudo da paleobiologia elucidada empiricamente como as formas de vida tiveram resultados ecológicos e evolutivos ao longo do tempo (Knoll, 2015). Além disso, as investigações teóricas e experimentais sobre a origem e evolução da vida, os processos que podem afetar o seu desenvolvimento, assim como os limites de adaptação em ambientes extremos da Terra são linhas do âmbito das ciências biológicas (Staley, 2003).

Sendo uma ciência emergente, a astrobiologia impulsiona reflexões a respeito de sua consistência e relevância enquanto ciência. Dessa forma, podemos observar premissas que abarquem sua factibilidade. Primeiramente, constata-se que até o momento nenhum dos milhares de dados coletados por todos os instrumentos que buscam detectar sinais de vida fora da Terra encontrou provas concretas de sua existência. Até o presente momento, a vida no planeta Terra é a única amostra de que a astrobiologia dispõe para afirmar que a vida é possível fora dele (Plaxco e Gross 2011). Sob um primeiro olhar, a astrobiologia parece carecer de um objeto, pois estuda

algo que sequer foi encontrado: vida extraterrestre. Porém, há que se entender que essa ciência estuda o evento 'vida' no Universo incluindo a Terra. Por isso o termo 'exobiologia' tem perdido terreno para 'astrobiologia' (Rampelotto, 2010).

Cautelosa o suficiente, essa ciência vem tentando contemplar a verificabilidade de seu objeto de estudo a partir de conhecimentos apresentados por outras ciências. Ou seja, sua metodologia inclui eventos anteriores de uma narrativa histórica com o objetivo de descobrir os fatores causais que contribuíram para a ocorrência de eventos posteriores, sendo possível testá-las repetidas vezes e, portanto, falseá-las (Mayr, 1997). Esse procedimento estipula a aceitação parcimoniosa das observações relevantes e, com menor número de pressupostos *ad hoc*, para explicar os dados. Sendo uma ciência totalmente factível, as investigações primárias têm se munido da caracterização da vida em ambientes extremos no planeta Terra, utilizada como modelo de uma possível vida extraterrestre (Galante et al., 2016).

### 3.2 Ambientes Extremos e sua Habitabilidade

Ambientes extremos são caracterizados pela variação de temperatura e pressão, alto nível de salinidade, exposição de radiação, valores altos e baixos de pH, entre outras condições extremas. A sobrevivência nesses ambientes depende da capacidade dos organismos de se estabelecerem, sendo que a possibilidade de conservação da vida no seu interior é decorrência das características taxonômicas dos indivíduos que conseguem exercer as condições de adaptação (Grant e Long, 1989). Segundo Brock (1986), embora seja difícil estabelecer uma caracterização única de critério para esse ambiente, de forma geral sua ambiência apresenta um padrão físico-químico desafiador para o desenvolvimento das células e, conseqüentemente, às suas macromoléculas.

Atualmente, o enfoque dos estudos que avaliam ambientes extremos busca identificar microrganismos presentes em ambientes extremos. Exemplos são o isolamento de microrganismos que sobrevivem às temperaturas elevadas no *Yellowstone National Park* (Meyer-Dombard et al., 2005) e os microrganismos que sobrevivem a temperaturas negativas no lago subglacial Vostok, na Antártica (Bulat, 2016). Em outros ambientes mais extremos do planeta, como as profundezas dos oceanos, cujas pressões podem alcançar até 300 vezes acima da registrada na atmosfera (nível do mar), já foram encontrados organismos que prosperam ante a falta

de luz e escassez de nutrientes (Galante et al., 2016). Lagos hipersalinos e de alta altitude, do inglês *High Altitude Andean Lakes* (HAAL), localizados no norte da Argentina e no deserto do Atacama no Chile, são caracterizados por alto índice de radiação e por imposição de estresse osmótico aos organismos presentes em seu ambiente (Albarracín et al., 2015). Por esse motivo, tais regiões são fundamentais à compreensão da capacidade dos organismos em adaptarem-se ao HAAL e ao ambiente extremo.

Interessantemente, ainda que um ambiente extremo seja constituído por uma gama de características desafiadoras ao desenvolvimento metabólico dos organismos, ele também pode ser considerado como importante laboratório natural de pesquisa. Consequentemente, o conhecimento acerca desses ambientes tem capacidade para: (i) fornecer novos parâmetros à compreensão dos limites e condições para o desenvolvimento de organismos, visto que esses ambientes, em tese, podem impedir o metabolismo celular; (ii) propor novos *insights* dos papéis fisiológicos, assim como a dinâmica dos membros dentro da comunidade; (iii) tornar mais compreensível as adaptações evolutivas e as versatilidades de organismos em condições ambientais extremas; e por fim, no campo de pesquisa da astrobiologia, (iv) revelar novas hipóteses sobre a possibilidade de vida em ambientes fora da Terra.

### 3.3 Lagunas Hipersalinas de Elevadas Altitudes

Na região central da Cordilheira dos Andes, encontram-se ambientes pouco explorados com condições climáticas e físico-químicas severas (Albarracín et al., 2015). Dispondo de lagunas hipersalinas em altitudes de até 6000 metros, estes ambientes compreendem as HAAL, cujos ecossistemas se estendem desde o deserto do Atacama, passando pelo platô Altiplano-Puna, até a parte mais alta dos Andes (Figura 1) (Albarracín; Gärtner; Farias, 2016; Ordoñez et al., 2018). Situadas em locais de difícil acesso, essas lagunas contêm pouca influência de atividade antrópica (Dib et al., 2009). Além disso, tais ambientes são caracterizados por geomorfologias bastante primitivas (Mlewski et al., 2018). Segundo a *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), esses ambientes são potencialmente análogos ao ambiente do início da formação de Marte e da Terra primitiva, dando suporte às estratégias de investigações e métodos de detecção de vida marciana e elucidações sobre a origem da vida terrestre (Cabrol et al., 2009).

A grande altitude dessa região e suas características de aridez e semiaridez configuram condições climáticas e meteorológicas rigorosas. As precipitações são episódicas e sazonais, ocorrendo em 70 % dos casos durante o verão austral (Garreaud; Vuille; Clement, 2003). As lagunas hipersalinas presentes nessa extensão são bacias hidrográficas do tipo endorréica, cuja taxa de evaporação excede a taxa de alimentação, aumentando a quantidade de minerais vulcânicos e produzindo altas concentrações de arsênico e sais dissolvidos (Albarracín et al., 2015). Ciclos de inundação, evaporação e dessecação completos são observados nessas lagunas. A atividade de água extremamente baixa é um dos maiores desafios à prospecção da vida em ambientes hipersalinos (Stevenson et al., 2015). A partir disso, sugerem-se questões importantes sobre os mecanismos de sobrevivências dos microrganismos que vivem nessas condições extremas.

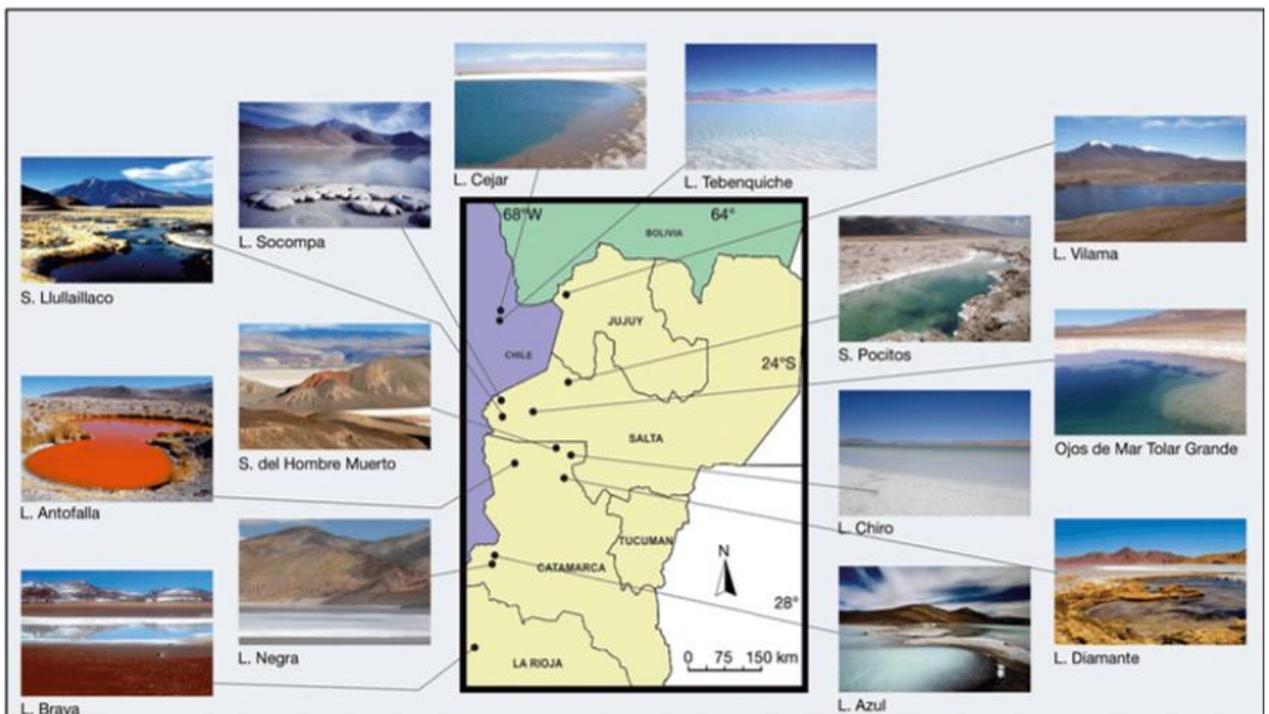


Figura 1: Localização geográfica dos lagos andinos de altitude na Puna Atacama e Deserto do Atacama. Fonte: Maldonado et al., 2018.

Ecosistemas hipersalinos são considerados ambientes estéreis ou quase estéreis (González, 2010). Entretanto, conforme Albarracín e colaboradores (2015), a grande maioria dos nichos do HAAL possui uma biodiversidade com capacidade adaptativa ao estresse determinado pelo ambiente. Os autores informam que

amostras de diferentes lagunas indicaram a presença de microrganismos extremófilos, advindos de águas superficiais. Estes microrganismos estavam associados em plantônicos, bentônicos e em tapetes microbianos, formando estruturas cooperativas. Estes resultados reforçam a ideia de que a presença de uma diversificada microbiota altamente dependente desses microecossistemas aumenta as estratégias à busca por vida fora da Terra em ambientes extremos (Albarracín et al., 2015).

### 3.4 Tapetes Microbianos de Lagunas Hipersalinas

Tapetes microbianos são ecossistemas geobiológicos resultantes da interação de comunidades complexas dos microrganismos com o ambiente. Formados a partir de biofilmes organo-sedimentares em forma laminar, se organizam em estratos com características distintas, criando condições ideais para o estabelecimento de simbioses e comunicação entre os grupos de microrganismos. Constituídos basicamente por bactérias e arqueias, essas relações de consórcio aumentam a sobrevivência da comunidade em ambientes com fatores abióticos extremos (Bolhuis et al., 2014).

As estratificações verticais dos tapetes microbianos surgem a partir dos gradientes físico-químicos, realizados e mantidos pela atividade microbiana, proporcionando microambientes distintos para diferentes grupos funcionais de microrganismos (Rozanov et al., 2017). A camada superior possui organismos fototróficos, geralmente constituídos de cianobactérias, bactérias verdes não sulfurosas, e por bactérias redutoras de sulfato (González, 2010). Nesta camada, elas absorvem a luz solar, separando a água como fonte de elétron e fixando CO<sub>2</sub>. Esses organismos sintetizam a produção primária de matéria orgânica e dos componentes estruturais como os polímeros extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS), que ligam as células e proporcionam estabilidade ao tapete microbiano (Bolhuis et al., 2014; Nishida et al., 2018). O circuito microbiano continua na camada subsequente, na qual os organismos fototróficos e aeróbios facultativos, ao esgotarem as reservas do oxigênio, degradam o carbono produzido na primeira camada sob condições anóxicas, por fermentação. Os produtos da fermentação são oxidados por bactérias redutoras de sulfato, produzindo sulfeto, que é oxidado, portanto, por bactérias oxidantes de enxofre (Figura 2) (Stal e Moezelaar, 1997).

Cada vez mais evidências sugerem que a formação de biofilmes beneficia os microrganismos em habitats de múltiplos estresses (Harrison et al., 2005). Tais benefícios incluem a capacidade de reter enzimas extracelulares, resistir à dissecação, obter mais nutrientes, limitar o contato com compostos tóxicos e aumentar a resistência aos antibióticos (Lapaglia e Hartzell 1997; Koerdt et al., 2010). Em um ambiente com frequência maior de perturbações físico-químicas, haverá aumento da complexidade das interações entre os microecossistemas. Portanto, tal dinâmica entre as camadas de um tapete microbiano é o resultado dos impactos causados pelas condições ambientais extremas (Wong; Ahmed-cox; Burns, 2016).



Figura 2: Visão geral da estrutura taxonômica e ecológica de tapetes microbianos. CIA: Cianobactérias; BV: Bactérias verdes sulfurosas; BRS: Bactérias redutoras de sulfato e BPS: Bactérias púrpuras sulfurosas. Fonte: imagem adaptada do arquivo pessoal Dra. Maria Eugenia Farias

### 3.5 Microbioma em Ambientes Extremos

Microrganismos são encontrados em vários ambientes da Terra (Razanov et al., 2017). Eles são os habitantes mais antigos e abundantes do planeta Terra e, devido à sua variabilidade genética, são adaptados em quase todos os nichos ambientais, inclusive em ambientes extremos (Hemme et al., 2010; Lewin; Wentzel; Valla, 2013). No entanto, microrganismos que vivem em ambientes extremos são ainda pouco compreendidos devido à dificuldade de cultivo em laboratório (Tazi et al., 2014). De outro modo, conforme Pulschen et al. (2017) descrevem, são microrganismos que ainda não foram passíveis de cultivo, pois todos os microrganismos são capazes de crescimento em condições ideais às suas necessidades. Ainda assim, o isolamento de microrganismos em laboratório não representa uma comunidade microbiana ambiental, tendo em vista que alguns são dependentes de um meio de cultivo heterogêneo e com interação de demais organismos (Rondon et al., 2000; Andreote et al., 2012). A limitação do acesso à diversidade genômica de organismos não-cultiváveis foi resolvida a partir do desenvolvimento de técnicas independentes de cultivo baseadas em análises de ácidos nucleicos (RNA e DNA) diretamente de amostras ambientais (Handelsman, 2004).

O termo microbioma foi cunhado em 2001 por Lederberg (2001) referindo-se apenas às comunidades microbianas comensalistas, simbióticas e patogênicas que habitam o corpo humano. Atualmente, esta definição abrange aspectos genéticos do conjunto de microrganismos que ocupam um hospedeiro ou um nicho ambiental (Boon et al., 2014). Esta contração referente ao genoma microbiano reflete a era genômica e dá margem aos atuais termos com sufixos '*omics*'. Dentro das metodologias de análise, cita-se o surgimento da metagenômica, que objetivo é capaz de descrever a diversidade microbiana de um ambiente. O objetivo é de contemplar em uma mesma análise as informações taxonômicas e funcionais a partir dos dados gerados do microbioma (Simon e Daniel, 2011). Duas alternativas são realizadas com esse objetivo. A primeira tem as análises baseadas em um gene alvo, que através da similaridade de regiões conservadas (ex. gene *16S rRNA*) com sequências depositadas em bancos de dados públicos torna-se capaz de avaliar a filogenia de um microbioma (Fuks et al., 2018; Zarkasi et al., 2018). A segunda contempla todos os

genes em conjunto, sendo a mais desafiadora informação biológica, devido ao tamanho e complexidade da amostra (Harrington et al., 2007).

Microbiomas em ambientes extremos representam um cenário importante na prospecção de análises metagenômicas com o intuito de explorar e identificar novas linhagens dos domínios Bactéria e Archea (Hedlund et al., 2014; Poli et al., 2017). O ponto de vista antropocêntrico sobre a filogenia da vida tem sido alterado ao longo dos anos, promovendo um consenso de que o mundo microbiano é muito mais diversificado do que se imaginava. A atenção dada aos estudos metagenômicos de ambientes expostos a agentes estressores é justificado não somente pela dificuldade de cultivo em laboratório, mas também pela capacidade intrínseca de sobrevivência dos habitantes e dos mecanismos únicos para tanto (Quatrini e Johnson, 2018; Christmas; Anesio; Sánchez-Baracaldo, 2018).

O primeiro estudo de clonagem de DNA extraído e purificado diretamente de amostras ambientais foi realizado em comunidades microbianas marinhas (Schmidt; Delong; Pace, 1991). A partir daí, foram elucidados vários microbiomas pertencentes a habitats exóticos, incluindo fontes hidrotermais do fundo do mar, *permafrost* e lagos subglaciais na Antártica, ambientes desérticos e frios (Reysenbach, 2002; Vikram et al., 2016; Mackelprang et al., 2017). Embora ainda falte desvendar a diversidade genética e estrutura populacional de grande parte dos ecossistemas terrestres, as aplicações metagenômicas evidenciam, de forma irrevogável, que microrganismos não cultiváveis são os maiores representantes dos organismos da Terra (Handelsman, 2004).

### 3.6 Extremófilos

Extremófilos são organismos adaptados a ambientes extremos. Diferentemente da maioria das espécies, esses organismos não somente toleram tais ambientes, como também somente conseguem se desenvolver e, portanto, sobreviver, sob condições extremadas (Cavicchioli, 2002; Rampelotto, 2010). Eles são definidos conforme as circunstâncias físico-químicas a que estão submetidos no seu ambiente, como temperatura, radiação e pressão. Ao mesmo tempo, são caracterizados de acordo com as condições geoquímicas, ou seja, estado de dessecação, salinidade e pH (Tabela 1). A atual classificação sistemática artificial utilizada para diferenciá-los ainda não reflete as múltiplas ações aos fatores ambientais, já que esses organismos

muitas vezes unem diversas características de vários grupos de extremos, os poliextremófilos (Pikuta et al., 2007). A sobrevivência desses microrganismos depende dos mecanismos de respostas ao estresse ambiental, e incluem geralmente modificações da permeabilidade da membrana plasmática, enrijecimento da parede celular, produção de EPS e a síntese de solutos compatíveis (Hallsworth, 2018). Ocorre também a formação de extensa rede de metabólicos secundários com atividade competitiva e de virulência contra outros microrganismos (Sengupta; Chattopadhyay; Grossart, 2013). Ambientes hostis resultam em um enriquecimento genético e fisiológico heterogêneo e adverso entre as espécies, aumentando a geração de diversidade a fim de garantir a sobrevivência da população (Aertsen et al., 2004).

**Tabela 1** – Relação entre organismos extremófilos e seus ambientes.

Tipo	Sobrevivência	Ecossistema (exemplos)	Espécie
Termófilos	50-80 °C	Gêiseres	<i>Synechococcus lividus</i>
Hipertermófilos	Acima de 80 °C	Hidrotermais	<i>Pyrodictium occultum</i>
Psicrófilos	Abaixo de 15 °C	Lagos antárticos - Vostok	<i>Psychrobacter fulvigenes</i>
Acidófilos	< 5.0 pH	Intestino humano	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Alcalófilos	> 8.5 pH	Lagos Alta montanha - Antofagasta	<i>Bacillus halodurans</i>
Halófilos	2,5–5,2 M NaCl	Lagos hipersalinos	<i>Halobacterium salinarum</i>
Radiófilos	> 15 kGy	Chernobyl	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Xerófilos	Alta dessecação	Rochas vulcânicas	<i>Chamaesiphon sp.</i>
Piezófilo	Pressões ≥ 40 Mpa	Fundo oceano	<i>Shewanella pealeana</i>

Fonte: Adaptado conforme estudos de Horikoshi et al., 2011.

Temperaturas extremamente elevadas ou extremamente baixas são fatores limitantes para o desenvolvimento de certos organismos. Por exemplo, temperaturas acima de 100 °C resultam em desnaturação enzimática, inativando sua atividade catalítica. Já em ambientes com temperaturas baixas (< -18 °C), ocorre o rompimento de membranas celulares, o que é letal (Rothschild e Mancinelli, 2001). Entretanto, organismos termófilos e psicrófilos possuem adaptações em suas proteínas e estrutura celular como resultado da evolução durante milhões de anos, e podem sobreviver a tais fatores. A capacidade de osmorregulação de microrganismos que vivem em ambientes hipersalinos é por decorrente da síntese de protetores osmóticos. Ou seja, o meio intracelular é adaptado às concentrações de sais no citoplasma, sendo pouco dependentes da água como solvente (Cavicchioli, 2002; Rampelotto, 2010).

### 3.7 Halófilos e Halotolerantes

Organismos extremófilos ou extremotolerantes que conseguem se desenvolver em ambientes com alta salinidade são denominados halófilos (do latim 'amantes do sal') (Vaidya; Dev; Sourirajan, 2018). Pertencentes aos três domínios filogenéticos – Bacteria, Archea e Eucarya –, tais microrganismos são distinguidos em categorias de acordo com a concentração mínima de sal, a salinidade ótima e o limite máximo de tolerância para o seu crescimento (Oren, 2008). Embora seja necessário um conjunto de propriedades físico-químicas do ambiente para o crescimento desses organismos, as definições mais comumente utilizadas são perfiladas a partir da concentração de cloreto de sódio (NaCl) presente no seu nicho ambiental. Sendo assim, os halófilos são categorizados em: halófilos extremos (crescimento em meios contendo entre 15 a 30 % ou entre 2,5 a 5,2 M de NaCl); halófilos moderados (crescimento em meio contendo entre 3 a 15 % ou entre 0,5 a 2,5 M de NaCl) e; halófilos leves (crescimento em meios contendo entre 1 % a 3 % entre 0,2 a 0,5 M de NaCl) (Oren, 2008; Roohi et al., 2014) (Figura 3). Ademais, organismos que não apresentam dependência, porém possuem distintos graus de tolerância ao sal são denominados halotolerantes (Andrei; Banciu; Oren, 2012).

Os principais desafios de sobrevivência enfrentados por organismos que habitam ambientes com condições de extrema salinidade estão relacionados à

desidratação e ao estresse osmótico, podendo influenciar nas funções vitais das células, como as atividades enzimática e proteica, assim como a taxa de crescimento e densidade populacional (Weinisch et al., 2018). Como forma de regular o cenário de perturbações no equilíbrio osmótico interno das células, microrganismos halofílicos empregam duas importantes estratégias adaptativas: (i) a primeira é mais observada em microrganismos halófilos extremos, no qual ocorre um maior acúmulo de íons  $K^+$  /  $Cl^-$  para manter o equilíbrio osmótico interno em resposta a condições hipersalinas do ambiente externo; (ii) a segunda é encontrada em microrganismos halófilos moderados e halotolerantes, os quais sintetizam solutos compatíveis, como aminas e álcoois, de forma acumulativa no interior da célula, permitindo o equilíbrio osmótico (Oren et al., 2005; Oren, 2013; Gunde-cimerman; Plemenitaš; Oren, 2018). A sofisticação dessas adaptações está relacionada ao grau de concentração de salinidade no exterior celular, sendo, portanto, organismos preparados evolutivamente, exibindo mecanismos ideais para ambientes em constantes mudanças.

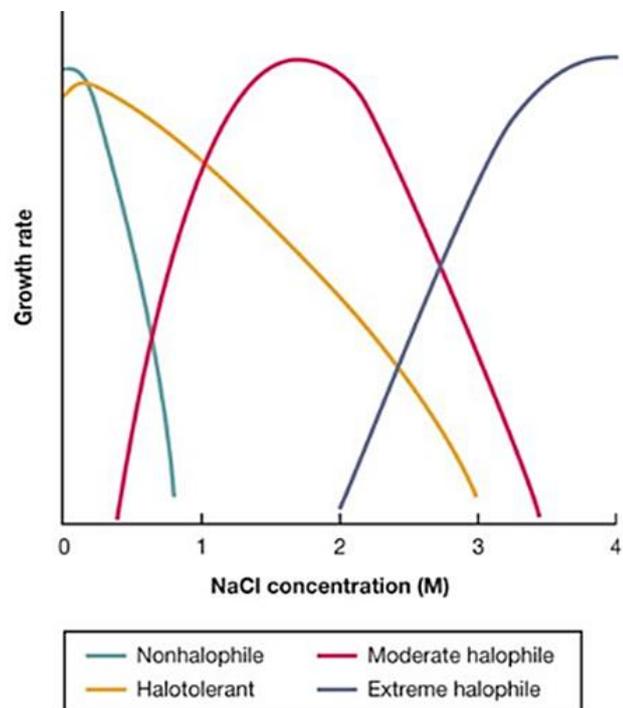


Figura 3: Curvas ilustrativas dos padrões das diferentes categorias dos halófilos demonstrando os efeitos do cloreto de sódio no crescimento bacteriano. Fonte: Willey et al., 2013.

Organismos halofílicos estão presentes em todos os domínios da árvore da vida, sendo a diversidade de espécies mais abundante pertence ao domínio Bacteria (50,1 %), seguido de Eukarya (27,9 %) e Archaea (21,9 %) (Loukas; Kappas; Abatzopoulos, 2018). Dentro do domínio das bactérias, os microrganismos halófilos estão presentes nos filos Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Spirochaetes e Bacteroidetes (Oren, 2008). Grupos que contém apenas halófilos e se relacionam filogeneticamente estão presentes na ordem Halobacteriales, a família Halobacteriaceae (Euryarchaeota) e bactérias da ordem Halanaerobiales (Firmicutes).

A família Halomonadaceae (Gammaproteobacteria) são quase exclusivamente halofílicos. Os estudos da diversidade filogenética dentro das Halobacteriaceae e Halomonadaceae aumentaram muito nos últimos anos. O aumento exponencial da caracterização e descrição taxonômica de novas espécies desses grupos se deve às extensivas amostragens em lagunas e ambientes hipersalinos ao redor do mundo (Oren, 2008). Segundo os últimos dados da *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, a família Halomonadaceae contém 12 gêneros e totaliza 123 espécies (Arahal; Oren; Ventosa, 2017).

### 3.8 *Halomonas* sp.

O gênero *Halomonas*, inserido na família Halomonadaceae, são bactérias gram-negativas em forma de bastonete de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$ . Normalmente crescem na presença de oxigênio, mas algumas espécies são consideradas anaeróbias facultativas, e todas as espécies são quimiorganotróficas (Vreeland, 2015). São bactérias que possuem adaptação aos diferentes regimes de pressão de salinidade, consideradas halófilas leves e moderadas, com preferência de crescimento entre 3 a 15 % de NaCl (Kim; Lee; Stevens, 2013). A primeira espécie isolada dessa família altamente versátil foi a *Halomonas enlogata* em 1980, e o gênero foi estabelecido em 1988 (Oren, 2008). No último levantamento bibliográfico, dentro do gênero já existem 90 espécies descritas (Arahal; Oren; Ventosa, 2017). Os ambientes em que as espécies foram originalmente encontradas são em minas de sal, fontes hidrotermais, lagunares hipersalinos da Antártica e ambientes marinhos (Kim; Lee; Stevens, 2013).

A osmoadação desse gênero requer a captação de potássio e a síntese de solutos orgânicos compatíveis que permitem a regulação osmótica em ambientes salinos (Kindzierski et al., 2017). Foi demonstrado que a espécie *H. elongata* aumenta seu nível citoplasmático de K<sup>+</sup> em salinidades mais baixas. Quando inseridos em salinidades altas, o soluto citoplasmático predominante é a ectoína (Kraegeloh et al., 2002). A diferença de estratégia confirma que o potássio serve como um osmólito transitório até a substituição por outro composto compatível, permitindo à célula restaurar seu volume celular e pressão do turgor (Welsh e Herbert, 1993). Outra vantagem importante desse gênero é não apenas sintetizar novamente os solutos compatíveis, mas também resgatá-los no ambiente através de proteínas de membrana de transporte, o qual teria um custo bioenergético menor na osmorregulação celular (Oren, 1999). A captação de solutos osmóticos orgânicos, como a ectoína e a hidroxietoína, é mediada pelo sistema de transporte periplasmático independente de ATP tripartido (TRAP), chamados TeaABC, uma família de transportadores ABC que são ativados pelo estresse osmótico (Grammann et al., 2002, Kuhlmann et al., 2002).

Devido a seus mecanismos específicos de adaptação à solução salina, bactérias do gênero *Halomonas* têm sido empregadas como modelos em pesquisas astrobiológicas. Pesquisas relativas à tolerância de sais caotrópicos em membros do gênero *Halomonas* vem sendo elucidadas devido à natureza hostil desses sais, como por exemplo as análises de crescimento com perclorato de sódio em *Halomonas salifodinae* (Matsubara et al., 2017) e *H. enlogata* (Oren et al., 2013) e sulfato de magnésio em *Halomonas variabilis* (Crisler et al., 2012). Solutos caotrópicos têm a propriedade de desestabilizar as interações eletrostáticas nas macromoléculas biológicas, isto é, elas podem desestruturar bicamadas lipídicas, proteínas e outras macromoléculas (Ball e Hallsworth, 2015). Acredita-se que solutos orgânicos compatíveis produzidos pelos microrganismos acabam agindo como agentes kosmotrópicos, como forma de estabilizar o controle do turgor e proteger estruturas macromoleculares (Bhaganna et al., 2010).

### 3.9 Ambientes da Terra e Marte - Passado e Presente

O período Arqueano (3,9-2,5 bilhões de anos) da Terra era composto por luminosidade mais tênue, cerca de 70 % da intensidade da luz atual, oníveis de

oxigênio eram baixos e ambiente da superfície essencialmente anóxico (Sleep 2010). A presença de sulfeto e sulfato sedimentar emitidos pela atividade vulcânica indica influência atmosférica por um ciclo global de enxofre (Montinaro e Strauss, 2016). Os processos biológicos iniciais na Terra já estavam presentes durante esse período, os quais eram formados por estruturas tróficas bentônicas em agregações de biofilmes e tapetes microbianos (Krumbein et al., 2003). Essas estruturas deixaram um registro fóssil através da acumulação de precipitados minerais carbonáticos e aprisionamento de sedimentos devido ao crescimento e atividade metabólica de microrganismos (Noffke, 2013).

As assembleias fósseis mais antigas identificadas na Terra são formadas por rochas sedimentares laminadas, denominadas de estromatólitos e, por *microbially induced sedimentary structure* (MISS) que dominaram as formas de vida por mais de dois bilhões de anos (Noffke et al., 2001; Schopf, 2006). Atualmente, é possível observar essas estruturas em alguns poucos ambientes terrestres, como por exemplo em Pilbara, na Austrália, com rochas de 3,4 bilhões de anos, assim como na Groelândia, datando 3,7 bilhões de anos, sendo este último ainda controverso (Van Kranendonk et al., 2008; Nutman et al., 2016). As conformações no registro fóssil dessas estruturas são importantes para compreender como as primeiras formas de vida terrestres se configuraram. Além disso, incorporam novas compreensões para buscas futuras em Marte (McMahon et al., 2018).

O conhecimento das características ambientais que dominaram o início da era geológica em Marte (4,5 a 3,5 bilhões de anos atrás) ainda são limitadas. Reconstruções paleotopográficas, mineralogia aquosa e formas fluviais indicam um passado quente e úmido, diferente dos dias atuais (seco e frio) (Craddock e Howard, 2002). O controle climático na atmosfera inicial marciana está ligado ao efeito estufa exercido por gases sulfurosos, isto é, o SO<sub>2</sub> poderia ter aquecido Marte e inibido a condensação de CO<sub>2</sub>, impedindo seu resfriamento (Halevy et al., 2007; Franz et al., 2019). Além disso, os gases do efeito estufa poderiam servir como um escudo contra radiação ultravioleta, e uma abundância de minerais de enxofre serviria como energia para uma possível biosfera marciana (Franz et al., 2019). Tendo em vista que a história geológica e climática inicial da Terra e as condições hipotéticas de Marte apresentam semelhanças, a origem da vida em Marte poderia ter ocorrido da mesma forma que na Terra (Schulze-Makuch et al., 2005).

De qualquer modo, determinar a existência de água líquida na superfície marciana é fundamental para compreender a potencialidade de vida, passada ou presente, em Marte. As recentes descobertas de água em forma de gelo e de sais de clorato e perclorato, nas regiões polares de Marte, bem como em suas latitudes médias, compõem importantes evidências à produção de água salina líquida (Fischer, 2016). Estes sais podem diminuir o ponto de congelamento da água em até  $-193,15$  °C, subtraindo a taxa de evaporação e, podendo ser higroscópico, ou seja, com capacidade para absorver facilmente a umidade atmosférica (Ojha et al., 2015). Sob essas condições, possíveis inundações episódicas em Marte podem ter sido registradas através das linhas de encosta recorrentes a partir de um derretimento efêmero causado na presença de sais caotrópicos, embora fluxos secos e empoeirados possam explicar o escurecimento sazonal dessas linhas (Abotalib et al., 2019; Stillman et al., 2020).

As primeiras análises químicas do solo marciano foram observadas pela sonda *Phoenix Mars Lander* em 2007, as quais revelaram um solo levemente alcalino com a presença de sais de perclorato (Cull et al., 2010) e sulfato (Kounaves et al., 2010). Clorato de magnésio e perclorato de magnésio e cálcio foram detectados em sedimentos do paleolago da cratera Gale pelo *Mars Science Laboratory* (MSL) (Figura 4) (Glavin et al., 2013; Sutter et al., 2017). Dados espectrais do *Mars Reconnaissance Orbiter* identificaram evidências da presença de perclorato de magnésio, clorato de magnésio e perclorato de sódio em zonas de linhas de encostas recorrentes na superfície de Marte (Ojha et al., 2015). A combinação de sais caotrópicos, implicando em salmouras líquidas no ambiente antigo de Marte, é amplamente aceito pela comunidade científica (Vaniman et al., 2004; Gendrin et al., 2005; Martínez e Renno, 2013; Karunatillake et al., 2014), e pode estar presente nos dias de hoje (Ojha et al., 2015). Avaliações dos sinais de radar emitidos pela espaçonave *Mars Express* da *European Space Agency* (ESA), indicaram a presença de água líquida subglacial, possivelmente salina, estável e sob profundidade relativamente rasa (cerca de 1,5 km) (Orosei et al., 2018).



Figura 4: Sedimentos em um antigo lago na cratera Gale em Marte. Fonte: <http://jpl.nasa.gov>.

Nosso conhecimento da extensão da biosfera terrestre em ambientes salinos extremos está condicionado a uma ampla população de microrganismos halófilos (Oren, 2008). As características extremas do planeta Marte – aridez, baixas temperaturas e fortes radiações solares – impossibilitam a sobrevivência de muitos organismos terrestres. Porém, seu ambiente pode ser mais favorável a alguns microrganismos extremófilos halófilos que vivem em condições quase marcianas na Terra. Dados sobre a sobrevivência de halófilos em ambientes análogos à Marte e à Terra primitiva podem fornecer um grande avanço sobre o nosso entendimento do surgimento e evolução da vida.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4. 1. Coleta de Amostra

Uma amostra de tapete microbiano foi coletada durante o inverno austral em julho de 2016. A amostragem foi realizada na Laguna Ojos de Campo (OCA), localizada a 3350 m do nível do mar (coordenadas:  $25^{\circ} 39' 48.96''\text{S}$   $67^{\circ} 42' 53.91''\text{W}$ ), no salar de Antofalla, no departamento de *Antofagasta de la Sierra*, situado no noroeste da província Argentina de Catamarca (Figura 5).

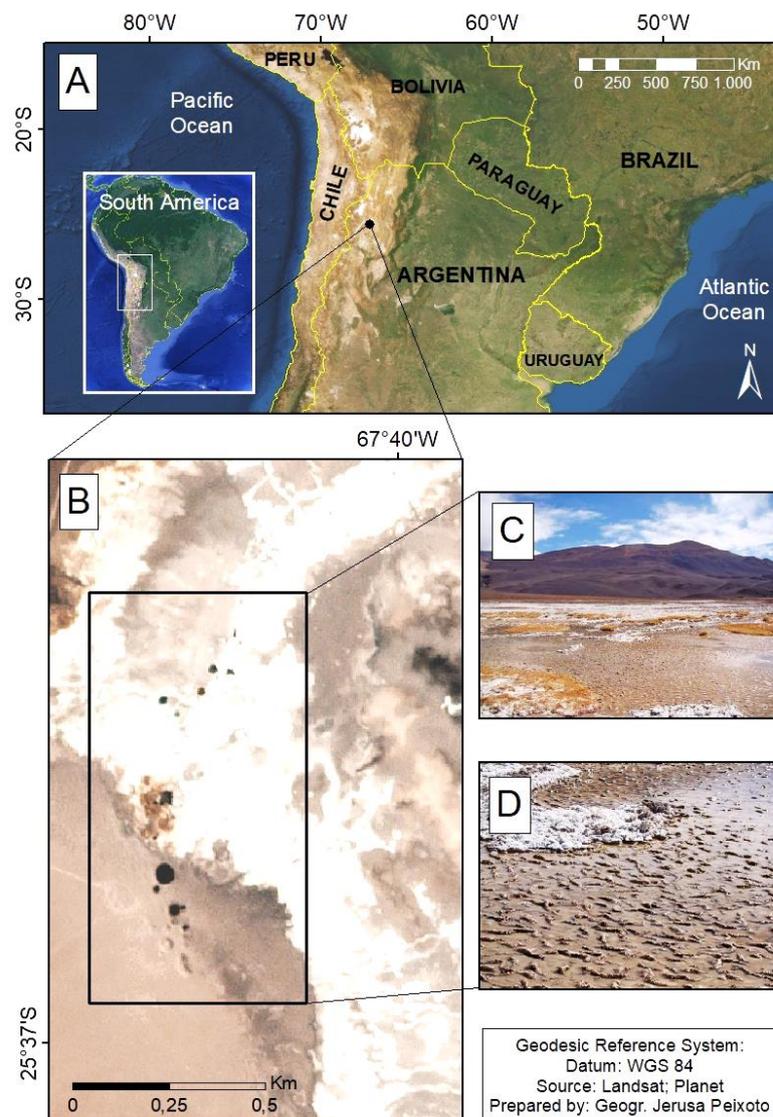


Figura 5 - Mapa de localização da Laguna Ojos de Campo. A) mapa da América do Sul, centralizando no noroeste da Argentina e o salar de Antofalla B) Lagunas do complexo Ojos de Campo. C) imagens da laguna no momento da amostragem e D) tapete microbiano em formato de rugas.

A Laguna OCA é considerada hipersalínica e possui pH 8,5 (Albarracín et al., 2015). A amostra de tapete microbiano possuía dimensões de 5 cm x 2 cm e profundidade de 1 cm. Após a coleta, a amostra foi armazenada em tubo de 50 mL tipo *falcon* e mantida sob refrigeração. A coleta foi realizada em conjunto com a Dr<sup>a</sup>. Maria Eugenia Farias, do *Laboratorio de Investigaciones Microbiologicas de Lagunas Andinas* (LIMLA-PROIMI).

## 4.2 Análise da Comunidade Bacteriana Presente no Tapete Microbiano

### 4.2.1 Extração, Amplificação e Sequenciamento do DNA Total

Para a extração de DNA total, foi realizado uma mistura retirando três partes em distintos pontos da amostra, com profundidade de até 1 cm (Rascovan, 2016). A mistura foi transferida para tubo estéril e o DNA foi extraído através do *Powersoil DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc.), de acordo com as indicações do fabricante. Devido à amostra de um tapete microbiano conter biomassa maior que o solo, o protocolo obteve modificações conforme orientação do fabricante, com diminuição da quantidade amostral (150 mg). A concentração do DNA total da amostra foi verificada usando um fluorômetro Qubit® 2.0 (*Life Technologies Corporation*, Califórnia, USA).

A amplificação da região *16S rRNA* foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em termociclador (*Thermo Fischer Scientific*, Watham, MA, EUA), utilizando oligonucleotídeos iniciadores 515F (5'- GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3 ') e 806R (5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3'). Estes oligonucleotídeos iniciadores são empregados pois abrangem uma grande diversidade para arqueias e bactérias (Bates et al., 2011).

A reação de PCR foi realizada com *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os reagentes utilizados na PCR foram obtidos a partir do *High Fidelity PCR buffer*, utilizando, portanto, 2U de *Taq DNA* polimerase, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM de dNTP mix, 25 µg de *Ultrapure BSA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,1 µM de cada primer, aproximadamente 30ng de DNA e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. As condições do PCR foram 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por

45 segundos e 68 °C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 68 °C por 10 minutos.

O produto resultante da PCR foi sequenciado na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Bagé, RS, Brasil) em equipamento *Ion Torrent* (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). O DNA foi purificado usando *Agencount AMPure Beads* (Beckman Coulter). A construção da biblioteca foi realizada como descrito no *Ion Plus fragment Library* a partir de uma quantidade inicial de 100 ng de produto de PCR. As sequências foram conduzidas no *Ion Personal Genome Machine* (PGM) *System* (Thermo Fischer) usando *chip Ion 316*, conforme instruções do fabricante. A sequência foi submetida no banco de dados *European Nucleotide Archive* com o número de acesso PRJEB35778.

#### 4.2.2 Caracterização Taxonômica e Predição Metabólica Via Bioinformática

As sequências cruas (*raw reads*) obtidas após o sequenciamento do *Ion Torrent* foram submetidas a um processo de controle de qualidade utilizando a ferramenta *Trimmomatic* (Bolger et al., 2014). Foram removidos os 5 bp iniciais e terminais no sentido 5' 3'. Uma janela deslizante de tamanho de 16 pb foi aplicada, restringindo a um comprimento mínimo de 100 pb e removendo as de baixa qualidade, com pontuação mínima de 20 na taxa de *phred*. Utilizando a ferramenta UPARSE, foram removidos os *reads* duplicados e respectivos *singletons* (Edgar, 2013). Após a etapa de pré-processamento, as *reads* restantes foram agrupados e classificados em OTUS com 97 % de similaridade. As atribuições taxonômicas foram empregadas com o banco de dados de referência RDP na plataforma Qiime 1.9 (Maidak et al., 2000; Caporaso, et al., 2010).

A classificação de predição metabólica da comunidade microbiana identificada na amostra de tapete microbiano coletada neste estudo foi realizada por meio do programa PICRUST (v2.0) (Douglas et al., 2019). Conforme protocolo sugerido pelo programa, as OTUs foram fechadas com referência ao banco de dados RDP com identidade de 97 %. A tabela de OTU resultante foi conduzida para análise da predição metabólica referenciada a partir do banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome* (KEGG) Orthology (KO) (Kanehisa et al., 2014), utilizando o comando "*predict\_metagenomes.py*" no PICRUST. Os valores da provável predição metabólica

foram estimados usando o *Nearest Sequence Taxon Index* (NSTI) (Langille et al., 2013).

#### 4.3 Isolamento dos Microrganismos Halófilos

Para isolamento de microrganismos halófilos, 1,0 g do sedimento coletado foi pesado em balança de alta precisão e inoculado em 9,0 mL de solução salina a 0,85 %. Uma alíquota de 0,1 mL da diluição foi inoculada em duplicata em meio de cultura desidratado *Marine Broth* 2216 BD Difco™ contendo 1,5% de ágar. A técnica utilizada para isolamento foi de espalhamento em superfície (*spread plate*). A incubação ocorreu em três temperaturas diferentes: 15 °C ±1 °C, 37 °C ±1 °C e 45 °C ±1 °C, em condições aeróbias e anaeróbias, sendo essas incubadas em jarra e gerador de anaerobiose.

Trinta e três colônias que apresentaram características morfológicas distintas foram selecionadas e submetidas a novo isolamento em *Marine Broth*, com adição de 1,5 % de ágar. Após o crescimento das colônias, foram realizados testes de coloração de Gram e caracterização morfológica. Todos os isolados foram armazenados em microtubos a -20 °C em uma solução contendo 1,0 mL de meio para preservação (solução de 10 % de leite desnatado) junto a uma alíquota da cultura bacteriana isolada (Cody et al., 2008).

##### 4.3.1 Identificação dos isolados por MALDI-TOF

A identificação dos microrganismos halófilos presentes na amostra de tapete microbiano foi realizada por meio das análises do espectro de massa pela técnica MALDI-TOF (Singhal et al., 2015). Os isolados foram preparados em placas, contendo meio de cultura *Marine Broth* contendo 1,5% ágar. Em seguida, os isolados foram inoculados por esgotamento, com a finalidade de obter colônias puras. Para a preparação dos isolados, foi realizado o procedimento por extração, transferido uma colônia para um microtubo contendo 300 µL de água milli-Q, adicionado de 900 µL de etanol absoluto e brevemente centrifugado a uma velocidade de 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido, adicionado de 50 µL de ácido fórmico 70 % e homogeneizado para a adição de 50 µL de acetonitrila. Após uma nova centrifugação

em velocidade máxima de 13.000 rpm, foi adicionado 1 µL do sobrenadante no *spot* da placa de aço inoxidável para realização das análises (Matsuda et al., 2012; Rahi et al., 2016).

Os resultados foram estabelecidos a partir da correlação dos *scores* dos espectros obtidos com o banco de dados. A classificação é estabelecida em quatro diferentes níveis de segurança: identificação segura em nível de espécie (*score* 2.300-3.000), identificação segura em nível de gênero e provável espécie (*score* 2.000-2.299), provável identificação em nível de gênero (*score* 1.700-1.999) e nível de confiança insuficiente para identificação (*score* 0-1.699).

#### 4.3.2 Identificação Genotípica dos Isolados Halófilos por Métodos Moleculares

Para identificação genotípica dos isolados halófilos que não tiveram um *score* com nível de segurança na análise do MALDI-TOF, foi realizada a extração de DNA para identificação de espécie conforme o protocolo proposto por Donato (2007). As amostras foram cultivadas em 2,0 mL de caldo marinho com as temperaturas de acordo o seu crescimento inicial por 24 horas. Foi transferido 1,0 mL do caldo para um microtubo, centrifugando a 14.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e inserido 40 µL de solução de lise. Após homogeneização, os microtubos foram colocados em banho seco a 100 °C por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 950 µL de tampão TE, homogeneizados e armazenados a 4 °C.

O gene *16S rRNA* foi amplificado parcialmente (500 bp) pela reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R530 (5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3') (Gontang et al., 2007). As condições do termociclador utilizadas para esta reação consistiram em 35 ciclos de 94 °C por 5 minutos, 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e um passo de extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de amplificação foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram comparadas de acordo com as similaridades dentro do banco de dados do NCBI, usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método da máxima verossimilhança de 25

linhagens neste estudo, utilizando sequências do gene *16S rRNA*, empregando o programa MEGA7 (Hall, 2013).

#### 4.3.3 Identificação das Espécies Isoladas por Métodos Bioquímicos

Foram realizadas análises bioquímicas para distinção das cepas de *Halomonas boliviensis*, *H. variabilis* e *H. alkaliantartica* que obtiveram identidade semelhante nas análises genotípica do *16S rRNA*. Seguindo as descrições comparativas conforme proposto por Poli et al. (2007), as cepas foram submetidas às provas bioquímicas com o objetivo de diferenciar as espécies *Halomonas boliviensis*, *H. variabilis* e *H. alkaliantartica*, que apresentaram similaridade de identidade. Para tanto, executou-se os testes enzimáticos de produção de indol com o meio de cultura SIM e detecção por meio da adição do Reagente de Kovac após 24 horas de incubação. O teste da atividade da enzima uréase foi feito com o caldo ureia contendo vermelho de fenol. As cepas controle positivo para esses testes foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus saprophyticus*, respectivamente.

Para complementar a identificação, testes de fermentação de carboidratos foram realizados. O teste de lactose foi verificado a partir da inoculação dos isolados em Ágar MacConkey, e a metabolização dos açúcares sacarose e glicose foram avaliadas com meio de cultura contendo água peptona, cloreto de sódio, púrpura de bromocresol e 1 % da solução de cada açúcar. Para diferenciação dos isolados que obtiveram mesma identidade genotípica do *16S rRNA* para as espécies *Bacillus zhangzhouensis* e *B. australimaris*, foram realizados testes de esporulação (Liu et al., 2016). A técnica se baseou no aquecimento por 5 minutos das lâminas com suspensão bacteriana com corante verde malaquita para coloração dos endósporos e fucsina para coloração da célula vegetativa. A cepa controle utilizada nessa técnica foi *B. subtilis* ATCC 18659.

#### 4.4 Análise de Tolerância a Sais Caotrópicos

##### 4.4.1 Análise Qualitativa de Tolerância ao Perclorato de Magnésio

Para avaliar qualitativamente o crescimento dos isolados obtidos a partir da amostra coletada, os protocolos estabelecidos para testes de perclorato de magnésio foram formulados segundo as análises desenvolvidas por Oren et al. (2014). Primeiramente, foi testada a capacidade dos isolados de crescimento em caldo do meio de cultura *Marine Broth*, suplementado com perclorato de magnésio  $Mg(ClO_4)_2$ , nas concentrações de 0,25 M, 0,5 M e 1,0 M. Estas concentrações foram obtidas a partir da adição do sal em um frasco *erlenmeyer* contendo 150 mL de meio marinho e esterilizados por membrana de filtração. Os cálculos foram baseados em íons de perclorato, porque os testes foram realizados em solução aquosa (Wadsworth e Cockell, 2017). Para obtenção das concentrações supracitadas, foram adicionados sais de perclorato de magnésio nas quantidades de 4,18 g, 8,37 g e 16,47 g, respectivamente.

Para a realização dos ensaios, as culturas foram pré-inoculadas por 24 horas em estufa nas temperaturas (15 °C, 37 °C e 45 °C). Alíquotas de 50 µL das culturas bacterianas foram adicionadas em tubo estéril contendo 5,0 mL de meio de cultura controle e os meios suplementados para cada concentração. Todos os testes foram realizados em triplicata. A incubação foi realizada nas temperaturas de crescimento dos microrganismos isolados (15 °C, 37 °C e 45 °C). Os resultados foram avaliados qualitativamente a partir de observação de turbidez após 24 e 48 horas de incubação.

##### 4.4.2 Análise Quantitativa de Tolerância aos Sais de Cloreto de Sódio, Sulfato e Perclorato de Magnésio

Após a triagem de crescimento dos isolados, foi avaliada quantitativamente a cepa OC 9.7, que obteve crescimento na maior concentração de perclorato de magnésio. Portanto, perfil de crescimento foi determinado com este sal nas concentrações de 0,25 M, 0,5 M, 1,0 M e 1,2 M, avaliando a densidade óptica a partir das medidas de turbidez por espectroscopia em relação ao tempo. Da mesma forma,

foi avaliado o crescimento nas concentrações de 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M de  $MgSO_4$  e de 5 %, 15 % e 25 % de NaCl.

Nos ensaios, 50  $\mu$ L do inóculo bacteriano com 24 horas de crescimento foram adicionados em 5,0 mL do meio controle e contendo meios suplementados com os sais. Os testes foram realizados em triplicata, com controle negativo e branco. Os resultados foram expressos com a curva de crescimento de acordo com densidade óptica por absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda em 600 nm. As medições foram realizadas em 0, 6, 12, 18, 24 e 48 horas. As análises de sulfato de magnésio foram estabelecidas de acordo com Crisler et al. (2012).

#### 4.5 Análises Estatísticas

Todas as experiências foram realizadas em triplicata. Controles negativos e brancos foram executados em todos os casos. Os números apresentados nos resultados são as médias e as barras de erro representam o desvio padrão entre as triplicatas. As análises estatísticas para as curvas de crescimento foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) bidirecional, acompanhado do teste de comparações múltiplas de Dunnett, onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo. As análises foram realizadas no programa Graphpad Prism 7.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Classificações Taxonômicas da Comunidade Bacteriana

As sequências obtidas após o processamento dos dados resultaram em 36.791 sequências *16S rRNA*, das quais 31.720 (86,0 %) foram atribuídas às sequências bacterianas e 237 (0,6 %) às sequências arqueais. O restante das sequências, 13,4 %, foram consideradas 'não classificados' e 'não atribuídos'. No total foram atribuídos 135 OTUs. A composição da comunidade bacteriana incluiu cinco filos dominantes: Proteobactérias (44,4 %), Bacteroidetes (8,9 %), Firmicutes (3,8 %), Verrucomicrobia (3,3 %) e Cianobactérias (2,9 %), constituindo mais da metade da população total encontrada. Os filos menos abundantes correspondem às Acidobactérias e Actinobactérias com <3% da população total (Figura 6).

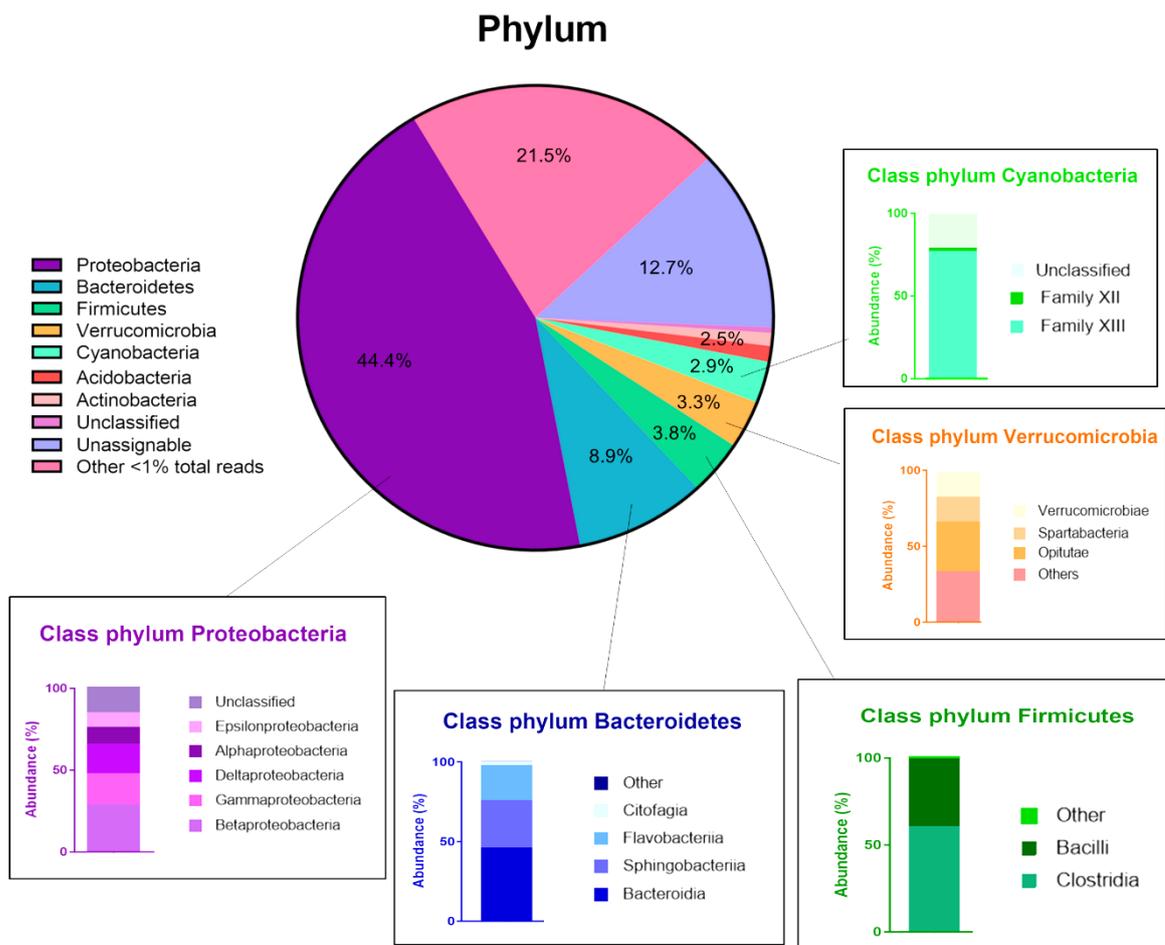


Figura 6: O gráfico representa os táxons mais abundantes até o nível de classe no tapete microbiano deste estudo. As figuras em segundo plano mostram as classes mais representativa em cada filo.

As unidades taxonômicas (OTUs) restantes tiveram abundância abaixo de 1 % e foram enquadradas na “biosfera rara” (Lynch e Neufeld, 2015). Neste grupo estão incluídos os filos Spirochaetes, Chloroflexi, Cloacimonetes, Deinococcus-Thermus, Planctomycetes e Nitrospirae. As proteobactérias foram representativas nas classes Betaproteobacteria (28 %), Gamaproteobacteria (19 %), Deltaproteobacteria (18%), Alphaproteobacteria (10 %) e Epiloproteobacteria (9 %), não classificadas, representando 16 % dentro do filo.

A família Comamonadaceae, representativa da classe Betaproteobacteria, foi dominante na população total. Outras famílias bacterianas destacaram-se como Campylobacteraceae, Moraxellaceae, Burkholderiales Incertae Sedis - dentro do filo Proteobacteria. No filo Bacteroidetes, as famílias mais abundantes foram Prevotellaceae, Chitinophagaceae, Bacteoidaceae e Flavobacteriaceae. Dentro do grupo firmicutes, a família mais abundante corresponde a Planococcaceae (Bacilli) e Tissierellaceae, classificada como Clostridiales Incertae Sedis Family XI no banco de dados do RDP. As sequências que foram relacionadas às famílias XII e XIII nas cianobactérias estão inseridas na família Microcoleaceae e Oscillatoriaceae, respectivamente (Figura 7). As divergências de nomenclatura nesta análise são referentes ao banco de dados RPD, que por sua vez segue a nomenclatura do Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, o qual se baseava em uma classificação por meio do código botânico (Ramos et al., 2017). A comunidade archaeal mostrou menos abundância e diversidade. Nas sequências atribuídas ao domínio archaeal, 60% foram designados Euryarchaeota e 40% Thaumarchaeota, constituídos pelas famílias Halobacteriaceae e Nitrososphaeraceae, respectivamente. Para uma ampla visualização dos resultados obtidos na análise da composição taxonômica, verificar o Apêndice 1.

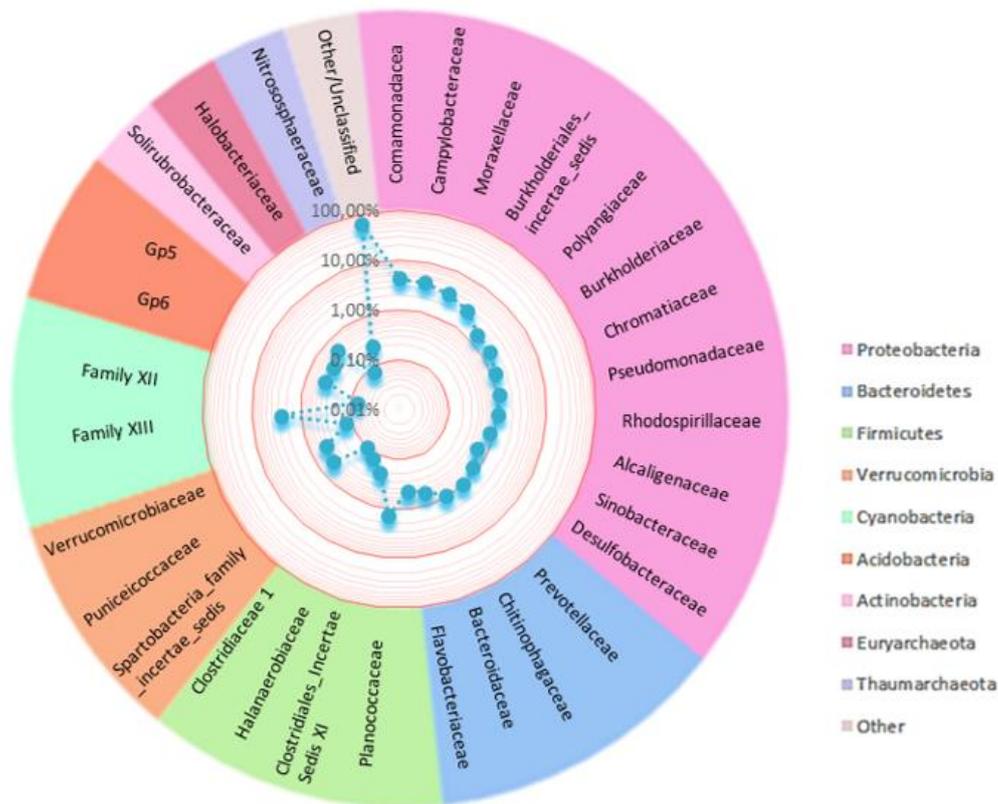


Figura 7: Gráfico de radar indicando as famílias mais abundantes dentro de cada filo. Foram configurados dentro da categoria 'outros', as famílias não classificadas e táxons raros, correspondendo a 65 % da comunidade presente no tapete microbiano.

## 5.2 Previsão funcional da comunidade microbiana

A análise foi feita através do *software* PICRUSt, com a composição funcional da comunidade microbiana a partir do *16S rRNA* (Figura 8). Os resultados do nível 2 do KEGG mostraram um alto número de sequências atribuídas a transporte da membrana (13,8 %). As classes funcionais de metabolismo de aminoácidos (10,2 %), biossíntese de metabólitos secundários (8,7 %), informações genéticas de replicação e reparo (7,7 %) e metabolismo energético (5,9 %) também demonstraram ser mais abundantes. O nível 3 do KEGG mostrou categorias funcionais de transportadores ABC, proteínas de reparo e recombinação de DNA, fosforilação oxidativo, metabolismo do enxofre e metano e montagem flagelar (Figura 8). Resultados detalhados do PICRUSt O KEGG nível 3 podem ser visualizados no Apêndice 2.

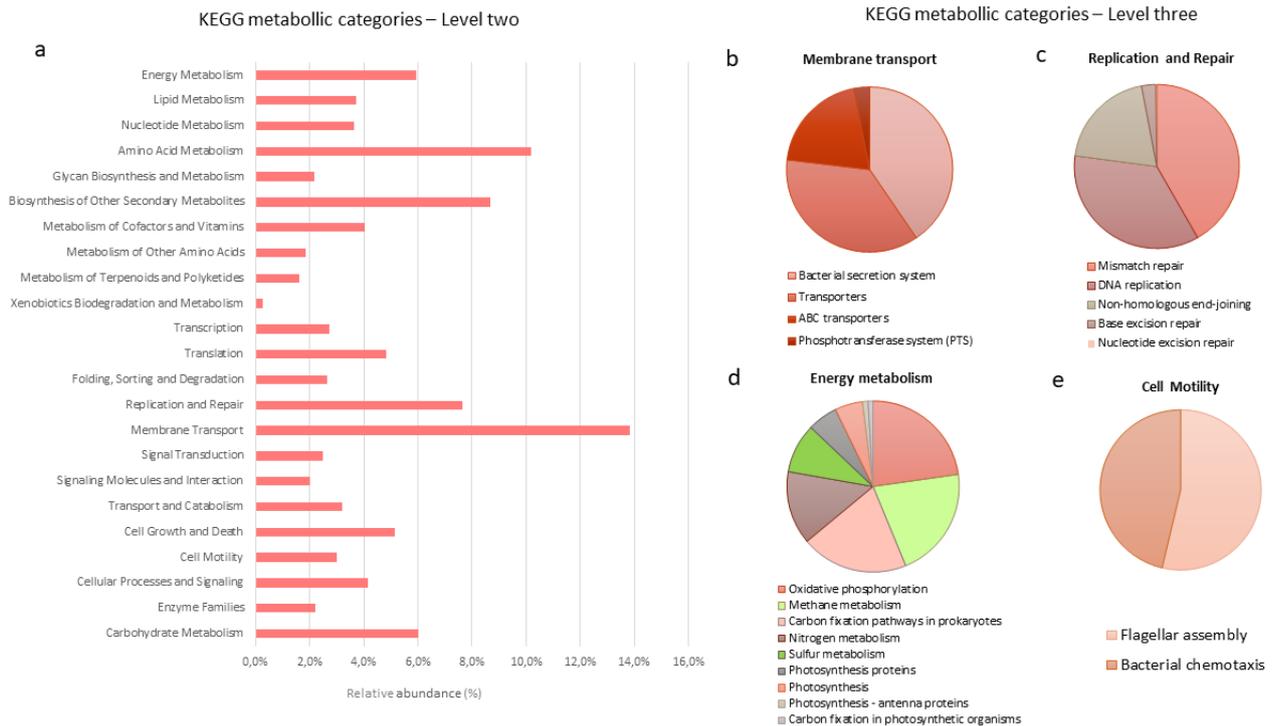


Figura 8: Categorias KEGG previstas por PICRUSt. a) Funções metabólicas previstas no nível 2 via KEGG, com barras representando a abundância relativa. b) Gráficos de pizza representando as funções previstas no nível 3 em quatro classes através da abundância absoluta.

### 5.3 Identificação de Isolados Halófilos Presentes no Tapete Microbiano

No total, 33 isolados foram obtidos do meio sólido marinho nas três temperaturas testadas (15, 37 e 45 °C). Não foi identificado crescimento em anaerobiose. Os isolados foram identificados usando dois métodos de identificação diferentes, e os resultados estão resumidos na Tabela II. Somente oito cepas isoladas puderam ser identificadas pelo MALDI-TOF MS. Além disso, o banco de dados apresentou *score* baixo e a identificação foi diferente entre as duas técnicas. As espécies identificadas foram *Shewanella frigidimarina* (n= 07) e *Bacillus astropheus* (n= 01), com *score* de identificação variando de 2.012 a 1.795 entre eles. A variação nas taxas de erros de identificação no nível de espécie é baixa entre os pontos de corte de  $\geq 2.000$  a  $\geq 1.700$  e pode variar de 0,8 % a 3,9 % (Li et al., 2017).

A identificação de isolados não identificados com segurança no banco de dados MALDI Biotyper foi submetida a métodos moleculares. Os resultados indicaram a presença de dois gêneros distintos: *Bacillus* (n= 22) e *Halomonas* (n= 03). Entre as espécies de *Bacillus*, foram verificadas similaridades de identidade entre as espécies

*Bacillus pumilus* e *Bacillus safensis* em dez cepas. Estas espécies estão intimamente relacionadas, não exibem diferenças nas seqüências do gene 16S *rRNA* e não existem distinções fenotípicas e bioquímicas conhecidas (Branquinho et al., 2014).

**Tabela 2** – Comparação dos resultados do sequenciamento do gene 16S *rRNA* entre as similaridades do MALDI-TOF.

Nº lab	Nº acesso GenBank	Espécies identificadas pelo sequenciamento	% de similaridade	Espécies identificadas pelo MALDI-TOF	Score MALDI-TOF
OC 1.0	MN808795	<i>Bacillus safensis/Bacillus pumilus</i>	92.08	<i>Bacillus</i> sp.	1670
OC 2.1	MN808796	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.58	<i>Bacillus</i> sp.	1472
OC 2.2	MN808797	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp.	1481
OC 3.1	MN808798	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp.	1307
OC 3.2	MN808799	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.78	Não identificado	-
OC 3.3	MN808800	<i>Bacillus swezeyi</i>	99.13	<i>Bacillus</i> sp.	1413
OC 3.4	MN808801	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp.	1585
OC 4.0	MN808802	<i>Bacillus haynesii</i>	97.87	<i>Staphylococcus</i> sp.	1333
OC 5.1	MN808803	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.57	<i>Bacillus</i> sp.	1460
OC 5.2	MN808804	<i>Bacillus haynesii</i>	97.87	<i>Bacillus</i> sp.	1320
OC 6.1	MN808805	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.58	<i>Bacillus</i> sp.	1322
OC 6.2	MN808806	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	98.51	Não identificado	-
OC 6.3	MN808807	<i>B. australamaris</i>	99.17	<i>Bacillus</i> sp	1412
OC 7.1	MN808808	<i>B.safensis/ B. pumilus</i>	99.36	<i>Bacillus</i> sp.	1673
OC 7.2	MN808809	<i>B. australamaris</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp	1252
OC 7.3	MN808810	<i>B. australamaris</i>	98.20	<i>Bacillus</i> sp	1406
OC 8.2	MN808811	<i>Bacillus vallismortis</i>	100.00	<i>Bacillus</i> sp	1533
OC 8.3	MN808812	<i>B. australamaris</i>	98.57	<i>Bacillus</i> sp	1493
OC 9.1	MN808813	<i>B. australamaris</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp	1493
OC 9.2	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp	1990
OC 9.3	MN808814	<i>B. australamaris</i>	100.00	<i>Bacillus</i> sp	1543
OC 9.5	-	-	-	<i>Shewanella frigidimarina</i>	1795
OC 9.6	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	2012
OC 9.7	MN808815	<i>Halomonas boliviensis</i>	95.02	<i>Halomonas</i> sp.	1088
OC 9.8	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	1852
OC 9.9	MN808816	<i>Halomonas boliviensis</i>	98.09	<i>Halomonas</i> sp.	1277
OC10.1	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	1926
OC 10.3	MN808817	<i>Halomonas</i> sp.	95.20	Não identificado	1487
OC 10.5	MN808818	<i>B. australamaris</i>	98.40	Não identificado	1390
OC 10.6	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	1869
OC 10.7	MN808819	<i>B. australamaris</i>	99.79	<i>Bacillus</i> sp	1233
OC 10.8	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	1825
OC 10.9	-	-	-	<i>S. frigidimarina</i>	1950

Diferentemente, oito linhagens apresentaram similaridade entre *Bacillzhangzhouensis* e *Bacillus australimaris*, que foram distinguidas pelo teste de esporulação. Um isolado apresentou identidade com *Halomonas* sp. Outros dois apresentaram similaridade de identidade com as espécies *Halomonas alkaliartica*,

*Halomonas variabilis* e *Halomonas boliviensis*. Foram distinguidos após os testes de indol, urease, lactose e sacarose e glicose. A árvore de máxima verossimilhança não enraizada demonstra relações entre os táxons (Figura 9).

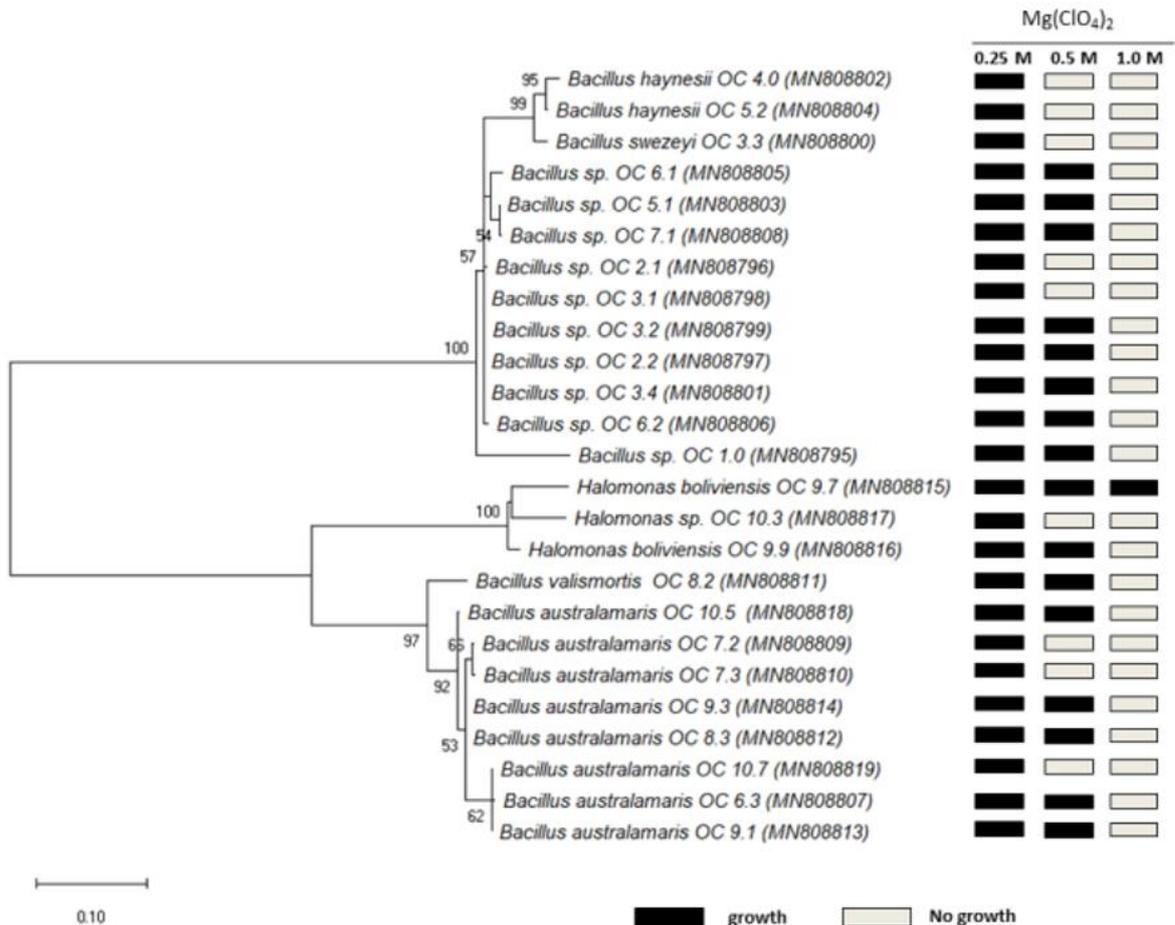


Figura 9: Árvore filogenética de máxima verossimilhança, mostrando relações de 25 cepas com base nas seqüências do gene 16S rRNA. Valores de *Bootstrap* (expressos como porcentagens de 1000 réplicas) superiores a 50 % são mostrados nos pontos de ramificação. Um diagrama mostrando o teste qualitativo de crescimento observado em cepas em meio marinho suplementado com Perclorato de magnésio.

#### 5.4 Tolerância dos Isolados a Altas Concentrações de Sal

A tolerância das cepas ao Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> foi estudada submetendo as culturas bacterianas ao meio de cultivo baseado em NaCl, aumentando as concentrações de Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> em 0,25, 0,5 e 1,0 M. No teste qualitativo, todas as 33 cepas testadas apresentaram crescimento de 0,25 M de Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Das 33 cepas, 18

correspondentes a cinco espécies (*B. safensis/pumilus*, *B. australamaris*, *B. valismortis*, *S. frigidimarina* e *H. boliviensis*) mostraram produção de biomassa visível por turbidez em 0,5 M de  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , resultado obtido na análise qualitativa após 24 horas de incubação (Figura 9). A cepa de *H. boliviensis* OC 9.7 foi a única capaz de crescer em 1,0 M de  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  após 15 horas de incubação na análise qualitativa (Figura 9).

Após esta triagem inicial, foram realizados testes quantitativos de densidade óptica (Figura 10). A determinação turbidimétrica para as curvas de crescimento foi realizado com a cepa OC-9.7 de *H. boliviensis*. Os resultados de tolerância celular para análise de crescimento a 5 % de NaCl mostraram baixa diferença na medição final em relação ao controle. As concentrações de 15 e 25 % de NaCl apresentaram crescimento celular lento, sendo obtidas diferenças de 19 e 9 % respectivamente em relação ao controle em 48 horas.

O teste de tolerância ao  $\text{MgSO}_4$  mostrou uma rápida variação de crescimento entre 24 e 48 horas quando submetido a 1,0 M, o que corresponde, igualmente, às medidas finais de controle e às menores concentrações de sal. A linhagem testada apresentou crescimento a 2,0 M após 48 horas de medição. Essa mesma cepa apresentou as maiores taxas de crescimento em perclorato de magnésio já registradas em estudos que exploram a tolerância de estresse osmótico. Tal crescimento foi observado na condição de 1,0 M  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , a partir de 18 horas de análise.

As taxas de crescimento na concentração 0,5 M foram maiores em  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  em comparação com o controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados detalhados da curva de crescimento constam nos Apêndices 3, 4 e 5.

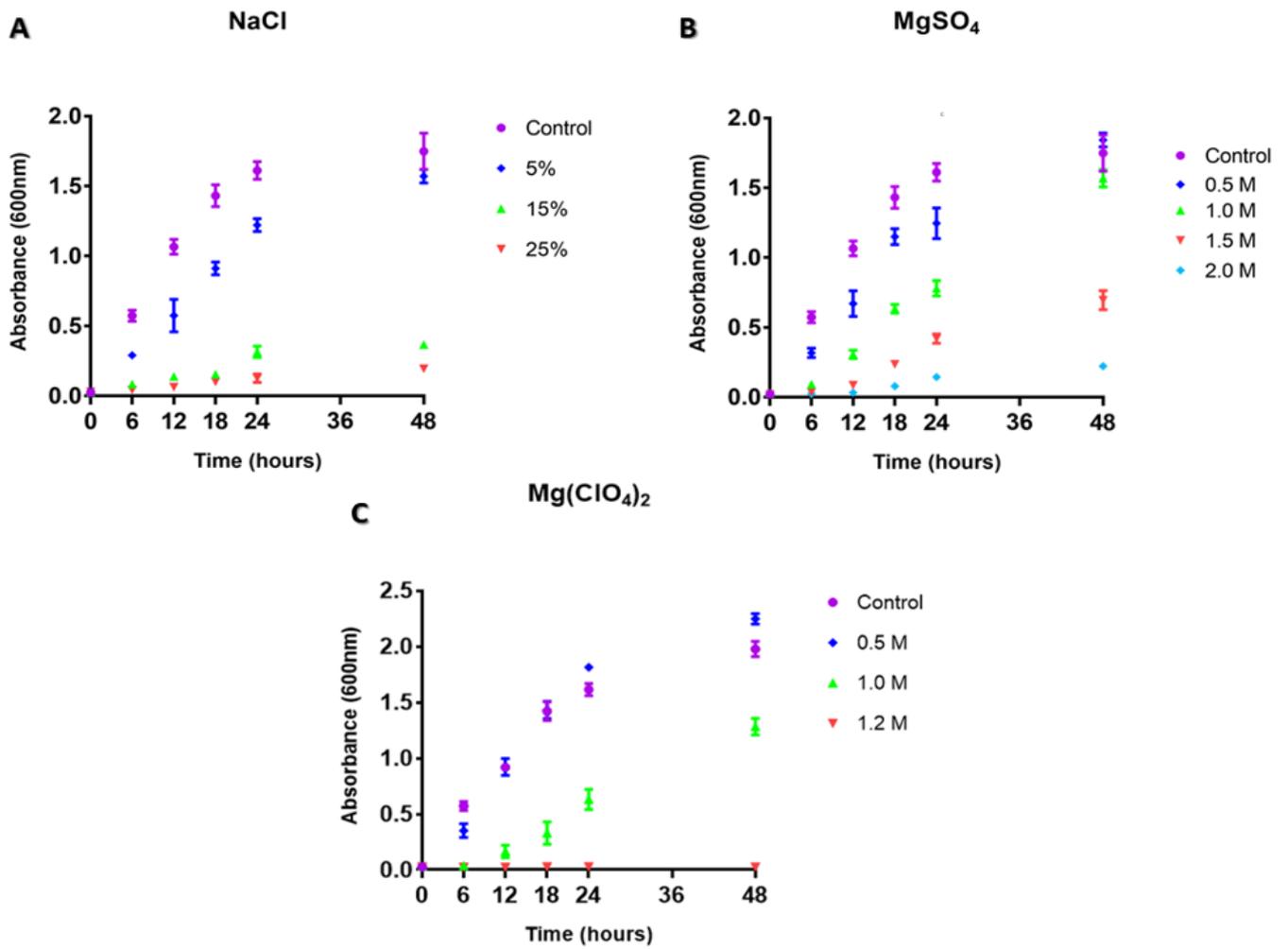


Figura 10 - As curvas de crescimento da cepa *Halomonas boliviensis* OC-9.7, medida por turbidez, é apresentada em unidades de OD. Os testes de tolerância aos sais foram realizados através do crescimento da cepa com meio de cultura em caldo marinho suplementado com meio de cultura com A) cloreto de sódio-NaCl, B) sulfato de magnésio-MgSO<sub>4</sub> e C) perclorato de magnésio-Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Composição Taxonômica do Tapete Microbiano

Em relação a filo e ordem, os resultados apresentaram padrões semelhantes a outros ambientes hipersalinos estudados (Bolhus et al., 2014; Mlewski et al., 2018) com dominância para Proteobacteria (44.4 %), Bacteroidetes (8.9 %), Firmicutes (3.8 %), Verrucomicrobia (3.3 %) e Cyanobacteria (2.9 %). Os filios Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes exibem uma abundância de espécies adaptadas a condições estressantes de alta salinidade (Benlloch et al., 2002; Oren, 2008; Boujelben, et al., 2012; Preisner et al., 2016). Proteobacteria constitui atualmente a maior e mais diversificada linhagem filogenética e, conseqüentemente, abrange uma extrema diversidade metabólica (Kerstens et al., 2006). Não obstante, a presença de Betaproteobactérias foi associada a condições oligosalinas em regiões áridas (Tang et al., 2012), o que corrobora os achados do presente trabalho. Associado ao filo Bacteroidetes, os grupos Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) foram as bactérias mais frequentes no lago athalassohalina do deserto de Atacama, porque os seus representantes conseguiram índices de adaptação proporcionais às altas taxas de salinidade presentes no lago (Demergasso et al., 2004). Membros das famílias Planococcaceae, Halobacteroidaceae e Ruminococcaceae (Firmicutes) também são habitantes comuns de ecossistemas salinos (Schneider et al., 2013; Teske et al., 2016; Schmitt et al., 2019). Desta forma, pode-se considerar que a salinidade possui papel decisivo na estruturação de uma comunidade, e, apesar do custo energético da adaptação ao alto teor de sal, ambientes hipersalinos constituem uma microbiodiversidade ativa (Oren, 1999; Lozupone e Knight, 2007). Na realidade, a persistência de diversas populações bacterianas e arqueas neste ambiente indica que a hipersalinidade não constitui um obstáculo isolado para o desenvolvimento de certos microrganismos e, sim, a habitabilidade neste nicho ambiental parece ser dependente de condições de salinidade caotrópica.

Em um tapete microbiano típico, as cianobactérias são consideradas as principais produtoras primárias em sua estrutura, pois desempenham um papel importante na fotossíntese (Prieto-Barajas et al., 2018). De fato, outros tapetes microbianos já identificados, como na Bacia de Cuatro Ciénegas, México (Bonilla-

Rossom, 2012), na fonte termal de Garga, Rússia (Rozanov, 2017) e na região desértica hipersalina de Rann de Kachchh, Índia (Patel et al., 2019) revelaram uma maior contribuição de organismos fototróficos. Quando comparado com outros estudos, a presença de cianobactérias foi de baixa abundância (2,9 %). Este fato pode estar associado à elevada altitude do ambiente e à hiperaridez do deserto de Atacama e Puna Atacama (Fernandez et al., 2016; Rasuk et al., 2016; Farias et al., 2017). A alta salinidade pode ser determinante para a abundância desse grupo, uma vez que, a partir de uma análise global da distribuição de microrganismos no planeta, as cianobactérias são menos frequentes em ambientes salinos (Canfora et al., 2014). Outros autores sugerem que a baixa presença do grupo de cianobactérias nesses ambientes pode estar associada à dificuldade de sobrevivência a altas taxas de radiação solar (Rasuk et al., 2016; Farias et al., 2017). Entretanto, somada à hipersalinidade, a baixa disponibilidade de oxigênio também é fator decisivo na proliferação de cianobactéria.

No estado anóxico (pobre em oxigênio) tende a prevalecer populações de bactérias fototróficas do enxofre e bactérias redutoras de sulfato, sendo muitas dessas espécies capazes de fornecer efeitos antagonistas, seja por lise de contato ou lise de aprisionamento de cianobactérias (Sigee et al., 1999; Bush et al., 2017; Osman et al., 2017). Ademais, o produto da redução dissimilatória do sulfato pode atingir altas concentrações de sulfeto dentro do microecossistema, o que é extremamente tóxico para a maioria dos microrganismos fototróficos oxigenados, devido à inibição de transporte de elétrons fotossintéticos (Gemerden, 1993; Oren, 2000; Martín-Clemente, 2019). Embora algumas poucas espécies de cianobactéria sejam capazes de fototrofia anoxigênica facultativa, sua baixa afinidade com o sulfeto as torna menos competitivas na presença de bactérias de enxofre verde e púrpura (Hamilton, 2018).

É possível, portanto, explicar a ocorrência da família XIII no grupo das cianobactérias (2,58 %), referente ao gênero *Oscillatoria* (gpXIII – RDP database). Estas possuem versatilidade metabólica, com capacidade de realizar fotossíntese anoxigênica e se desenvolverem via respiração com enxofre (Cohen et al., 1975; Elshahed et al., 2003). Cianobactérias representadas exclusivamente por *Oscillatoria* spp. também foram observadas no euxínico lago Tebenquiche, no salar de Atacama, Chile (Zúñiga et al., 1991). Sendo assim, enquanto o grupo de cianobactéria tenta migrar para nichos dentro do tapete microbiano que tenham menor incidência de radiação solar, produtos metabólicos de bactérias fotossintéticas anoxigênicas

impedem a invasão de cianobactérias. O resultado é frequentemente observado nos ambientes hiperáridos da região central dos Andes, nos quais as cianobactérias se estabilizam em uma fina camada (1 mm) dos tapetes microbianos (Farias et al., 2013).

Com base nos grupos taxonômicos majoritários encontrados neste estudo (Proteobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia e Cyanobacteria), é possível sugerir que a comunidade presente nesse tapete microbiano está atuando sob condições prevalentes de hipoxia ou anoxia. Dentro do grupo Proteobacteria, a família Comamonadaceae está presente em maior abundância, sendo que muitas espécies dessa família são desnitrificantes típicas em condições de baixo oxigênio (Spring et al., 2004). Também, é um táxon prevalente em águas sulfídricas e que muitas possuem o Sistema Sox para oxidação do tiosulfato, sendo um grupo com importante contribuição na ciclagem de nitrogênio e enxofre (Deja-Sikora et al., 2019). A família Campylobacteraceae relacionada a *Arcobacter* compõe espécies envolvidas na oxidação/redução de enxofre. Ademais, estas espécies foram atribuídas a genes de desnitrificação em camadas anaeróbicas em lagos euxínicos (Borin et al., 2009; Llorens-Marès et al., 2015). Moraxellaceae (*Acinetobacter* spp.), Pseudomonadaceae (*Pseudomonas* spp.) e Burkholderiaceae (*Burkholderia* spp.) são táxons conhecidos como metabolizadores de enxofre, os quais podem utilizar o sulfeto e o tiosulfato como fonte de elétrons anaerobicamente (Jung et al., 2005; Xia et al., 2015). As famílias listadas são grupos normalmente abundantes em camadas inferiores de um tapete microbiano onde a condição é anoxigênica (Finke et al., 2019). Outro grupo proeminente no tapete microbiano corresponde à família Chromatiaceae, o qual representa um dos principais grupos de bactérias púrpuras sulfuradas, que utiliza o sulfeto como receptor de elétrons em anoxia (Imhoff, 2014). Desulfobacteraceae, microorganismos estritamente anaeróbicos caracterizados como redutores de sulfato, também está presente no tapete microbiano (Kuever, 2014).

Outros perfis filogenéticos presentes na amostra reiteram as condições euxínicas do tapete microbiano, por exemplo, espécies da família Flavobacteriaceae, as quais correspondem a bactérias oxidantes de tiosulfato (Teske et al., 2000; Wright et al., 2013), e os grupos de Chitinophagaceae (Bacteroides), incluindo espécies de *Sediminibacterium* que têm a capacidade de produzir H<sub>2</sub>S, consistente com um ciclo ativo de enxofre (Qu e Yuan, 2008). O grupo dos Firmicutes (*Sporanaerobacter*) foram isolados em lodos anaeróbios no México e possuem a capacidade de redução de enxofre elementar (Hernandez-Eugenio et al., 2002). Da mesma forma, Verrucomicrobia

(*Puniceicoccus*) encontrados no tapete microbiano são caracterizados como espécies estritas ou facultativas anaeróbias (Choo et al., 2007). Os baixos níveis apresentados da família Halobacteriaceae (0,08 %), uma arqueia halófila que leva um estilo de vida aeróbio típico, reflete a natureza anóxica da amostra neste estudo (Baricz et al., 2015). Um microbioma com ciclo do enxofre ativo, no qual a reação Redox ocorre através da participação de microrganismos anaeróbicos, condiz com um ambiente com deficiência de oxigênio (Liebensteiner et al., 2014; Luo, 2018).

## 6.2 Predição Metabólica

Os resultados obtidos na predição metabólica a partir do sequenciamento do gene *16S rRNA* indicam que as classes funcionais estão intimamente ligadas às características estruturais de tapetes microbianos em ambientes extremos. A função metabólica presente na comunidade apresentou três classes principais no sistema do transporte de membrana. A primeira envolve o sistema de secreção geral, o qual direciona proteínas para o meio intracelular e extracelular (Green e Mecsas, 2016). Essa aptidão pode envolver a adesão em superfície, aglomeração celular, modulação na comunicação interespecie por *quórum sensing* e resposta ao estresse ambiental (Johnson et al., 2014; Chagnot et al., 2013; Tian et al., 2015). O segundo inclui um sistema de transporte ABC, o qual contribui para a adaptação bacteriana em ambientes de alta osmolaridade, assim como promove resposta ao estresse ao frio e calor (Chen e Beattie, 2007). Isto é, os sistemas de transportadores ABC contribuem na captação de solutos compatíveis, como ectoína e hidroxiectoína, que servem como estratégia à hiperosmolaridade celular (Jebbar et al., 2005). O terceiro, identificado como sistemas fosfotransferase (PTS), são sistemas de evolução tardia nos microrganismos e não são encontrados em extremófilos, o que explica a baixa abundância nos resultados (Konings et al., 2002).

Outras estratégias metabólicas são observadas por meio das capacidades funcionais preditivas dentro da comunidade. Tendo em vista que a estrutura do microecossistema presente em um tapete microbiano compreende múltiplos nichos ecológicos com condições físico-químicas distintas, a motilidade celular pode ser utilizada como tática de sobrevivência nos microrganismos (Montgomery et al., 2013). Ou seja, a capacidade de migração desempenhada por estruturas flagelares permite aos microrganismos a locomoção às condições ideais para seu metabolismo.

Quantidade expressiva das proteínas de quimiotaxia também foram encontradas em fontes hidrotermais sulfídricas do fundo do mar, sendo vista como estratégia de adaptação da comunidade aos gradientes químicos do ambiente (Xie et al., 2011).

Notavelmente, os resultados mostraram classes funcionais de reparo universal de DNA que são acentuadas após exposição a extremas temperaturas e radiação UV (Fukui, 2010; Kisker et al., 2013; White e Allers, 2018). Novos grupos de genes de resistência ao sal recuperados em ambiente hipersalino, na Espanha, foram relacionados às atividades de reparo ao DNA (Mirete et al., 2015). A presença de vias de reparo por excisão de base, reparo por excisão de nucleotídeo e reparo de incompatibilidade de DNA na predição metabólica, sugerem sistemas importantes para lidar com o ambiente extremo de alta radiação e salinidade na laguna Ojos de Campo.

O perfil preditivo do metabolismo energético dentro da comunidade releva uma maior abundância de fosforilação oxidativa em relação à fotossíntese. Isso configura que o fornecimento maior de energia está ocorrendo por doação de elétrons de compostos orgânicos ou inorgânicos, na presença ou ausência de oxigênio. Certos microrganismos anaeróbios têm a capacidade de se desenvolverem através da fosforilação oxidativa com o enxofre elementar como elétron terminal ao invés de O<sub>2</sub> (Klimmek et al., 2004). Além disso, as indicações baixas de funções relacionadas à fotossíntese, como proteínas da fotossíntese, proteínas de antenas (pigmentos fotossintéticos) e fixação de carbono em organismos fotossintéticos, correspondem a um cenário mais redutor do que fotossintetizante.

### 6.3 Identificação dos isolados halófilos

A identificação dos microrganismos a partir do método baseado em cultura demonstrou discordância em relação aos dados do sequenciamento de última geração. As famílias dos três gêneros identificados (*Bacillus*, *Halomonas* e *Shewanella*) não estão presentes dentro dos microrganismos majoritários na análise do sequenciamento, sugerindo que esses microrganismos possam estar inseridos na biosfera rara da comunidade. Esta divergência é consistente com estudos anteriores, como as análises de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis da região do Altiplano, no deserto do Atacama, Chile (Maza et al., 2019) e em locais de drenagem ácida de minas, no Canadá (Auld et al., 2013). A explicação para essa ocorrência está

ligada aos ruídos do sequenciamento que, por sua vez, descartam uma fração da assembleia microbiana de baixa abundância após análises de bioinformática (Kunin et al., 2010). Ao mesmo tempo, os microrganismos cultiváveis deste estudo poderiam estar amparados na hipótese de que organismos que possuem capacidade de dormência no ambiente e resiliência após períodos de distúrbio podem se tornar mais ativos sob condições laboratoriais (Lennon et al., 2011). Ainda que o tema da probabilidade de recuperação de táxons raros seja maior nos métodos tradicionais de cultura – algo que já está bem documentado (Lynch et al., 2015) –, o isolamento de células viáveis de amostras provenientes de ambientes extremos é de difícil cultivo laboratorial (Pulschen et al., 2017). Isso ocorre devido à necessidade de se estabelecer um meio de cultivo com componentes químicos específicos do seu ambiente natural (Kaeberlein et al., 2002).

A maioria dos isolados foram identificados no gênero *Bacillus* sp., devido à presença de esporos resistentes dentro desse grupo. Essas estruturas são bem conhecidas por sua resistência a condições inóspitas, como radiação UV, dessecação, pressão e salinidade (Chiang et al., 2019). Neste estudo, espécies isoladas identificadas como *B. pumilus* e *B. safensis* obtiveram similaridade superior a 98 % por meio da técnica de identificação genotípica do *16S rRNA*. Congruentemente, as análises pela técnica de MALDI-TOF resultaram em *score* não suficientes à sua identificação. De forma igual, essas espécies não apresentam distinções bioquímicas conhecidas (Wang, 2009). Portanto, estas cepas foram catalogadas como *Bacillus* sp neste estudo. A análise da sequência de DNA de genes marcadores com taxas evolutivas bastante baixas e estáveis é comumente usada para a identificação e classificação de espécies bacterianas (Tringe e Hugenholtz, 2008). A utilização das sequências do gene *16S rRNA* para classificação bacteriana é utilizada devido à conservação do tamanho do *operon* ribossômico (Rajendhran e Gunasekaran, 2011). No entanto, existem desvantagens associadas ao uso do gene *16S rRNA*, pois pode haver alta similaridade entre espécies do mesmo gênero (Goto et al., 2000). O gênero *Bacillus* é um exemplo claro de similaridade da sequência *16S rRNA*. Normalmente, são divididos em grupos baseados nas características fenotípicas e no alto nível de identidade genotípica (99% ou mais) (Kaya-Ongoto et al., 2019). De todo modo, ambas as espécies têm relevância nas pesquisas astrobiológicas. A cepa *B. pumilus* SAFR-032 foi levada para a Estação Espacial Internacional (ISS), onde após exposição a uma variedade de condições espaciais

exibiram esporos ainda viáveis (Vaishampayan et al., 2012). Cepas de *B. safensis* foram caracterizadas como resistentes a viagens espaciais e à irradiação UVC (254 nm) (Vaishampayan et al., 2012).

O emprego do MALDI-TOF na identificação de espécies ambientais, especialmente no caso das espécies residentes nos ambientes extremos, é limitado (Kopcakova et al., 2014). Entretanto, as cepas correspondentes a *S. frigidimarina* isoladas neste estudo apresentaram alto score nas análises de MALDI-TOF, permitindo sua identificação no banco de dados. Isto pode ser decorrente da utilização desta espécie como modelo em um estudo a partir da espectrometria de massa de desorção, com o intuito de padronizar a técnica em busca de bioassinaturas em Marte (Garcia-Descalzo et al., 2012). O gênero *Shewanella* possui a capacidade versátil de crescer sob ausência de oxigênio ou outros aceitadores de elétron, utilizando minerais férricos para a respiração anaeróbica (redução dissimilatória de Fe (III)). Portanto, se trata de um gênero com relevância em pesquisas focadas na habitabilidade em Marte (Martín-Cerezo et al., 2015).

Da mesma forma, o gênero *Halomonas* tem se mostrado promissor em recentes pesquisas astrobiológicas, o que é demonstrado pela sua propriedade de suportar tensões osmóticas e se desenvolver na presença de sais caotrópicos (Matsubara et al., 2017). A recuperação da espécie *H. boliviensis* neste estudo está de acordo com as características geográficas e físico-químicas do seu habitat natural. Esta espécie foi isolada e identificada pela primeira vez em amostra de solo em uma laguna hipersalínica localizada a 4300 m acima do nível do mar, na região sudoeste da Bolívia (Quillaguamán et al., 2004). Para confirmar a identificação dos isolados desta espécie, as provas bioquímicas realizadas foram suficientes para diferenciar espécies do gênero *Halomonas* que demonstraram similaridades no gene *16S rRNA*. A *H. boliviensis* é uma espécie moderadamente halófila, com desenvolvimento ideal a uma concentração de NaCl de 5 % (p / v) e tolerância até 25 % (p / v) de NaCl, além de crescer em pH 5 a 11 e temperaturas de 0 a 45 °C (Quillaguamán et al., 2004).

#### 6.4 Tolerância a Sais

Paralelamente, os isolados presentes no tapete microbiano deste estudo demonstraram tolerância às condições hipersalinas marcianas com base no crescimento com NaCl, MgSO<sub>4</sub> e Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Considerando que esses sais, segundo

Parro et al. (2011), são formados naturalmente na região do Deserto do Atacama, o presente estudo utilizou, como modelo astrobiológico, os microrganismos extremófilos presentes na laguna Ojos de Campo, que é caracterizada como ambiente hipersalino. Observações realizadas pela sonda *Phoenix Mars Lander* mostraram que sais de perclorato de magnésio  $Mg(ClO_4)_2$  estão em maior nível em relação a outras substâncias em solos marcianos (Hecht et al., 2009). Além disso, Marte possui elevadas concentrações de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Crisler et al., 2012). A partir dessas evidências, podem-se inferir modelos capazes de sugerir a presença de água líquida na superfície e/ou subsolo do planeta Marte (Ojha et al., 2015). Essa descoberta tem reacendido novos caminhos à pesquisa astrobiológica.

Tendo em vista que 54 % dos isolados são capazes de crescimento em concentração de 0.5 M de  $Mg(ClO_4)_2$ , é válido inferir que há expectativa das cepas serem organismos modelos para se desenvolverem no planeta Marte, embora sejam necessários repetidos e seguros testes com demais variáveis ambientais, como pressão, radiação e temperatura. Do mesmo modo, deve-se destacar o resultado da cepa OC 9.7 (*H. boliviensis*), que obteve crescimento tanto na concentração de 1.0 M de  $Mg(ClO_4)_2$ , quanto na concentração de 2.0 M de  $MgSO_4$ . Até o presente momento, não existem relatos de crescimento microbiano a altas concentrações de perclorato de magnésio. Segundo Crisler et al. (2012), bactérias dos gêneros *Halomonas* e *Bacillus* obtiveram tolerância em até 2.0 M de  $MgSO_4$ , porém, diferentemente da presente pesquisa, sem adição de cloreto de sódio no meio de cultivo. Existem poucos estudos que exploram a possibilidade de crescimento bacteriano na presença de perclorato. Algumas cepas halotolerantes apresentaram crescimento moderado em concentrações de 0.04 M de  $Mg(ClO_4)_2$  (Beblo-Vranesevic et al., 2017). Al Soudi et al. (2017) testaram a viabilidade de cepas de *Halomonas venusta* contra diversos sais, exibindo crescimento em até 0.25 M de  $Mg(ClO_4)_2$ . Esporos de *B. subtilis* germinam a uma concentração de 0.1 M de  $NaClO_4$ , e concentrações maiores resultaram em inativação do processo de germinação (Nagler e Moeller, 2015).

A cepa OC-9.7 *H. boliviensis* demonstrou tolerância a elevadas concentrações de sais de sulfato e perclorato de magnésio [1,0 M  $Mg(ClO_4)_2$ ], sendo capaz de suportar concentrações destes sais maiores que as encontradas em Marte (aproximadamente 0,1 M) (Wadsworth e Cockell, 2017). Nessas condições, essa cepa é considerada modelo compatível, encontrado na Terra, de extremófilo 'percloratorressistente', com capacidade de presença em lagos subglaciais no planeta

Marte ou em antigos paleolagos identificados na superfície marciana (Cabrol e Grin, 2002).

Estratégias de osmoadação no gênero *Halomonas* não são tão estudadas atualmente (Vaidya et al., 2018). A maioria das bactérias halofílicas armazena compostos orgânicos que ajudam na neutralização do estresse osmótico (Oren, 2008). Espécies bacterianas dentro da família Halomonadaceae sintetizam compostos de ectoína como principal soluto compatível, como é o caso da espécie *Halomonas enlogata* (Kindziersk et al., 2017). Foi observado que a espécie *H. boliviensis* sintetiza ectoína e hidroxietoína como osmólitos, os quais contribuem para manter a pressão do turgor e volume celular à medida que a concentração de NaCl aumenta no ambiente (Van-Thuoc et al., 2007). Entretanto, uma visão global da modelagem metabólica de osmorregulação parece ser mais complexa (Schwibbert et al., 2011). Para tanto, deve-se considerar cuidadosamente os processos múltiplos que podem ser codificados dentro do genoma. A proposta futura de continuação deste trabalho será sequenciar o genoma completo da cepa OC 9.7 *H. boliviensis* para caracterizar os genes envolvidos na tolerância aos sais, identificar a rede metabólica e compreender os mecanismos halotolerantes.

## 6.5 Implicações na Astrobiologia Bacteriana

O tapete microbiano moderno anoxigênico presente na Laguna Ojos de Campo representa analogia com ecossistemas que poderiam ter ocorrido em ambientes geológicos antigos. A modelagem atmosférica do ambiente arqueano e proterozóico inicial terrestre possuía pouco, ou nenhuma, quantidade de oxigênio livre, além de abundância de espécies reduzidas de enxofre e ferro (Knoll et al., 2016). Relatórios sobre as assinaturas dos isótopos de enxofre observados em rochas sedimentares de Marte, através de veículos de pouso ou naves espaciais, assim como análises dos meteoritos marcianos encontrados na Terra, indicam que o período Hesperiano (3.3–3.7 bilhões de anos) teria sido rico em enxofre (Franz et al., 2017). De fato, a cratera Gale parece representar um sistema lacustre fluvial predominado em depósitos salinos e minerais sulfatados, condizendo com clima dominado pelo ciclo químico do enxofre (Franz et al., 2014; Rapin et al., 2019).

Na Terra primitiva, acredita-se que o modelo respiratório microbiano dominante tenha sido a utilização do sulfeto e enxofre como doadores de elétrons na fixação

fototrófica do carbono, semelhantes aos processos microbianos anóxicos à base de enxofre dentro do microecossistema encontrado na Laguna Ojos de Campo. Microfósseis de estromatólitos preservados na Formação Strelley Pool, na Austrália Ocidental, com 3,45 bilhões de anos, documentam um metabolismo do enxofre presente no início da história da vida (Shen et al., 2009; Bontognali et al., 2012).

Estudos dos microfósseis de tapetes microbianos, como os estromatólitos e MISS arqueanas, revelam lacuna importante na estrutura taxonômica, especialmente na sua formação inicial (Noffke et al., 2013). Em um tapete microbiano típico, parece haver a necessidade da presença do grupo de cianobactérias, tanto como produtores primários, quanto por seu potencial para estruturar a matriz orgânica do tapete (Pereira et al., 2009). Entretanto, como observado neste estudo, condições euxínicas parecem limitar a presença desse grupo. Dessa forma, pode-se elucidar um papel proeminente e mais conservador dos microrganismos fotossintéticos anoxigênicos e redutores de sulfato na estruturação dos tapetes microbianos antigos. Estes grupos teriam ajudado a construir estromatólitos e MISS mesmo antes das cianobactérias se tornarem os principais produtores dominantes em ambientes pré-cambrianos (Garcia-Pichel et al., 2019). Além disso, a estrutura taxonômica da comunidade presente na amostra deste estudo confirma a hipótese de que o metabolismo prevalente em estromatólitos arcaicos deveria ser fotossintético estritamente anoxigênico (Bosak et al., 2009; Alen, 2016). Segundo Alen (2016), os tapetes microbianos do período Arqueano seriam compostos por bactérias fotossintéticas púrpuras sulfurosas e não-sulfurosas através de uma fotossíntese facultativa do Tipo I e II separadamente, como estratégia de crescimento.

Estima-se, portanto, que uma microbiota semelhante à encontrada neste estudo poderia ter habitado oceanos sulfídricos da Terra primitiva. Ademais, a biogeoquímica atuante dentro deste microecossistema poderia ilustrar a dinâmica ecológica e estrutural das primeiras formas de vida na Terra. Concomitantemente, uma possível microbiota marciana poderia ter residido em sedimentos de lagos antigos presentes em Marte, entre 3,8 e 3,1 bilhões de anos atrás (Hurowitz et al., 2017).

Atualmente, o contexto de habitabilidade em Marte é extremamente inóspito para a vida, com condições de extrema aridez, radiação solar e escassez de água líquida na superfície (Ramirez et al., 2018). Não obstante as condições de inabitabilidade verificadas, pesquisas recentes feitas pela NASA – que descobriu

evidências geomórficas de atividade fluvial (Goudge et al., 2016) –, e pela ESA – que apresentou indícios quanto a existência de lago subglacial localizado sob a calota de gelo na região sul de Marte (Orosei et al., 2018) –, permitem creditar à astrobiologia uma continuidade das suas investigações. Apesar das temperaturas demasiadas frias neste planeta, a formação hidrológica dos supracitados lagos está sustentada pela presença de sais caotrópicos (Orosei et al., 2018). Isto posto, conforme foi acentuado na presente investigação, a toxicidade exercida por esses sais não impede, a rigor, o desenvolvimento da vida, podendo atender à procura de vida halófila moderna marciana.

## 7. CONCLUSÃO

A composição da comunidade microbiana presente no tapete hipersalino da laguna Ojos de Campo apresentou perfis taxonômicos comumente associados à estrutura de tapetes microbianos da Puna Atacama e às especificidades físico-químicas do seu ambiente natural. Os filos mais abundantes dentro da comunidade estão associados ao metabolismo energético por redução do enxofre.

A predição metabólica identificou um núcleo microbiano envolvido em um cenário mais redutor do que fotossintetizante. Vias metabólicas de captação energética demonstraram maior abundância a fosforilação oxidativa em relação à fotossíntese. A presença de classes funcionais atribuídas a transportadores de membrana e vias de reparo do DNA sugerem mecanismos adaptativos específicos a condições extremas.

Bactérias moderadamente halófilas foram isoladas e identificadas, embora seu ambiente natural seja hipersalino. Em relação ao efeito da salinidade no desenvolvimento dos microrganismos cultivados, o presente estudo se distingue por consequência de dois dados obtidos: (i) 54% dos isolados são capazes de crescimento numa concentração de 0.5 M de  $Mg(ClO_4)_2$  e; (ii) o resultado da cepa CO-9.7, *H. boliviensis*, que obteve crescimento tanto na concentração de 1.0 M de  $Mg(ClO_4)_2$  quanto em 2.0 M de  $MgSO_4$ . Nas condições testadas, as cepas são consideradas modelo compatíveis encontrado na Terra, de extremófilos 'percloratorressistente' com capacidade de tolerar as condições hipersalinas em Marte.

Os resultados alcançados expandem o conhecimento da composição microbiana em ambientes extremos e destacam a complexidade estrutural de um tapete microbiano com prevalência de condições hipóxicas e ciclagem de enxofre. O ecossistema descrito sugere um modelo de organização de tapetes microbianos arqueanos, tendo em vista a incompletude do registro fóssil. Igualmente, bactérias presentes na Laguna Ojos de Campo se mostram modelos astrobiológicos ideais de sobrevivência em condições marcianas, o que poderá servir como novo parâmetro às pesquisas futuras.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abotalib AZ, Heggy E. 2019. A deep groundwater origin for recurring slope lineae on Mars. *Nat Geosci.* 12(4): 235-241.
- Aertsen A, Vanoirbeek K, De Spiegeleer P, Sermon J, Hauben K, Farewell A, Nyström T, Michiels C. 2004. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 70(5): 2660-2666.
- Al Soudi AF, Farhat O, Chen F, Clark BC, Schneegurt MA 2017. Bacterial growth tolerance to concentrations of chlorate and perchlorate salts relevant to Mars. *Int J Astrobiol.* 16(3): 229-235.
- Albarracín VH, Kurth D, Ordoñez OF, Belfiore C, Luccini E, Salum GM, Piacentini RD, Fariás ME 2015. High-up: A remote reservoir of microbial extremophiles in central Andean Wetlands. *Front Microbiol.* 6(1404): 1-16.
- Albarracín VH, Gärtner W, Fariás ME. 2016. Forged under the sun: life and art of extremophiles from Andean lakes. *Photochem Photobiol.* 92(1): 14-28.
- Allen JF. 2016. A proposal for formation of Archaeal stromatolites before the advent of oxygenic photosynthesis. *Front Microbiol.* 7(1784): 1-10.
- 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.
- Andreote FD, Jiménez DJ, Chaves D, Dias ACF, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Fasanella CC, Lopez MV, Baena S, Taketani RG, de Melo IS. 2012. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS One.* 7(6): 1-14.
- Arahal DR, Oren A, Ventosa A. 2017. International committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of halobacteria and subcommittee on the taxonomy of halomonadaceae. Minutes of the joint open meeting, 11 July 2017, Valencia, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67(10): 4279-4283.
- Auld RR, Myre M, Mykytczuk NCS, Leduc LG, Merritt TJS. 2013. Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. *J Microbiol Methods.* 93(2): 108-115.
- Ball P, Hallsworth JE. 2015. Water structure and chaotropy: Their uses, abuses and biological implications. *Phys Chem Chem Phys.* 17(13): 8297-8305.
- Baricz A, Cristea A, Muntean V, Teodosiu G, Andrei AŞ, Molnár I, Alexe M, Rakosy-Tican E, Banciu HL. 2015. Culturable diversity of aerobic halophilic archaea (Fam. Halobacteriaceae) from hypersaline, meromictic Transylvanian lakes. *Extremophiles.* 19(2): 525-537.

- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 5(5): 908–917.
- Beblo-Vranesevic K, Huber H & Rettberg P. 2017. High tolerance of *Hydrogenothermus marinus* to sodium perchlorate. *Front Microbiol.* 8(1369): 1-8.
- Benlloch S, López-López A, Casamayor EO, Øvreås L, Goddard V, Daae FL, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedrós-Alió C, Rodríguez-Valera F. 2002. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol.* 4(6): 349-360.
- Bhaganna P, Volkens RJM, Bell ANW, Kluge K., Timson D., McGrath JW, Ruijssenaars HJ, Hallsworth JE. 2010. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. *Microb Biotechnol.* 3(6): 701-16.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15): 2114-2120.
- Bolhuis H, Cretoiu MS, Stal LJ. 2014. Molecular ecology of microbial mats. *FEMS Microbiol Ecol.* 90(2): 335-350.
- Bonilla-Rosso G, Peimbert M, Alcaraz LD, Hernandez-Gonzalez I, Eguiarte L, Olmedo-Alvarez G, Souza, V. 2012. Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: Community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology.* 12(7): 659-673.
- Bontognali TRR, Sessions AL, Allwood AC, Fischer WW, Grotzinger JP, Summons RE e Eiler JM. 2012. Sulfur isotopes of organic matter preserved in 3.45-billion-year-old stromatolites reveal microbial metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(38): 15146-15151.
- Boon E, Meehan CJ, Whidden C, Wong DH-J, Langille MGI & Beiko RG. 2014. Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiol Rev.* 38(1): 90-118.
- Borin S, Brusetti L, Mapelli F, D'Auria G, Brusa T, Marzorati M, Rizzi A, Yakimov M, Marty D, Lange G, Van der Wielen P, Bolhuis H, McGenity TJ, Polymenakou PN, Malinverno E, Giuliano L, Corselli C, Daffonchio D. 2009. Sulfur cycling and methanogenesis primarily drive microbial colonization of the highly sulfidic Urania deep hypersaline basin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(23): 9151-9156.
- Bosak T, Liang B, Min SS, Petroff AP. 2009. Morphological record of oxygenic photosynthesis in conical stromatolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(27): 10939-10943.

- Boujelben I, Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Peña A, López C, Antón J, Maalej S. 2012. Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 101(4): 845-857.
- Branquinho R, Sousa C, Lopes J, Pintado ME, Peixe L V, Osório H. 2014. Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* using MALDI-TOF-MS. *PLoS One.* 9(10): 1-10.
- Brock, Thomas D. 1986. *Thermophiles, General, Molecular, And Applied Microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 19 p.
- Bulat SA. 2016. Microbiology of the subglacial Lake Vostok: First results of borehole-frozen lake water analysis and prospects for searching for lake inhabitants. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 374(2059): 1-6.
- Bush T, Diao M, Allen RJ, Sinnige R, Muyzer G, Huisman J. 2017. Oxic-Anoxic regime shifts mediated by feedbacks between biogeochemical processes and microbial community dynamics. *Nat Commun.* 8(1): 1-9.
- Cabrol NA & Grin EA. 2005. Ancient and recent lakes on mars. In: *Advances in Astrobiology and Biogeophysics.* Springer Verlag. 24 p.
- Cabrol NA, Grin EA, Chong G, Minkley E, Hock AE Yu Y, Bebout L, Fleming E , Häder DP, Demergasso C, Gibson J, Escudero E, Dorador C, Lim D Woosley C, Morris RL, Tambley C, Gaete V, Galvez ME, Smith E, Uskin-Peate I, Salazar C, Dawidowicz G, Majerowicz J. 2009. The High-Lakes Project. *J Geophys Res Biogeosciences.* 114(G2):1-20.
- Canfora L, Bacci G, Pinzari F, Lo Papa G, Dazzi C, Benedetti A. 2014. Salinity and Bacterial Diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PLoS One.* 9(9): 1-15.
- Caporaso, JG, Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, FD, Costello, EK, Fierer N, Gonzalez Peña A, Goodric JKh , Gordon JI, Huttley GU, Kelley ST, Cavaleiros D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh P, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 7(5): 335-336.
- Cavalazzi B, Barbieri R 2016. *Emergence and Evolution of Early Life in the Geological Environment.* Springer International Publishing: Cham. 10 p.
- Cavicchioli R. 2002. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology.* 2(3): 281-292.

- Chagnot C, Zorgani MA, Astruc T, Desvaux M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol.* 4(303): 1-26.
- Chen C, Beattie GA. 2007. Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine- $\beta$ -synthase domains are required for its osmoregulatory function. *J Bacteriol.* 189(19): 6901-6912.
- Chiang AJ, Malli Mohan GB, Singh NK, Vaishampayan PA, Kalkum M & Venkateswaran K. 2019. Alteration of proteomes in first-generation cultures of *Bacillus pumilus* spores exposed to outer space. *mSystems.* 4(4): 1-15.
- Choo YJ, Lee K, Song J, Cho JC. 2007. *Puniceicoccus vermicola* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium, and description of Puniceococcaceae fam. nov., Puniceococcales ord. nov., Opitutaceae fam. nov., Opitutales ord. nov. and Opitutae classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 (3): 532-537.
- Christmas NAM, Anesio AM & Sánchez-Baracaldo P. 2018. The future of genomics in polar and alpine cyanobacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 94(4): 1-9.
- Cockell C. 2015. *Astrobiology: understanding life in the universe.* Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 472 p.
- Cockell CS, Biller B, Bryce C, Cousins C, Direito S, Forgan D, Fox-Powell M, Harrison J, Landenmark H, Nixon S, Payler SJ, Rice K, Samuels T, Schwendner P, Stevens A, Nicholson N, Wadsworth J. 2018. The UK centre for astrobiology: a virtual astrobiology centre. accomplishments and lessons learned, 2011-2016. *Astrobiology.* 18(2): 224-243.
- Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, Nickerson CA, Schurr MJ. 2008. Skim milk enhances the preservation of thawed  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bacterial stocks. *J Microbiol Methods.* 75(1): 135-138.
- Cohen Y, Jørgensen BB, Padan E, Shilo M. 1975. Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature.* 257(5526): 489-492.
- Craddock RA, Howard AD. (2002). The case for rainfall on a warm, wet early Mars. *J Geophys Res.* 107(E11): 1-36.
- Cray JA, Russell JT, Timson DJ, Singhal RS, Hallsworth JE. 2013. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol.* 15(1): 287-296.
- Crisler JD, Newville TM, Chen F, Clark BC, Schneegurt MA. 2012. Bacterial growth at the high concentrations of magnesium sulfate found in martian soils. *Astrobiology.* 12(2): 98-106.

- Cull SC, Arvidson RE, Catalano JG, Ming DW, Morris RV, Mellon MT, Lemmon M. 2010. Concentrated perchlorate at the Mars Phoenix landing site: Evidence for thin film liquid water on Mars. *Geophys Res Lett.* 37(22): 1-6.
- Decho AW, Gutierrez T. 2017. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Front Microbiol.* 8(5): 1-28.
- Deja-Sikora E, Gołębiowski M, Kalwasińska A, Krawiec A, Kosobucki P, Walczak M. 2019. Comamonadaceae OTU as a remnant of an ancient microbial community in sulfidic waters. *Microb Ecol.* 78(1): 85-101.
- Demergasso C, Casamayor EO, Chong G, Galleguillos P, Escudero L, Pedrós-Alió C. 2004. Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol.* 48(1): 57-69.
- Dib J, Weiss A, Neumann A, Ordonez O, Estevez M, Farias M. 2009. Isolation of bacteria from remote high altitude andean lakes able to grow in the presence of antibiotics. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 4(1): 66-76.
- Donato, Silvia Tavares. 2007. Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à biologia molecular em identificações discrepantes. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza.
- Dorador C, Meneses D, Urtuvia V, Demergasso C, Vila I, Witzel KP, Imhoff JF. 2009. Diversity of Bacteroidetes in high-altitude saline evaporitic basins in northern Chile. *J Geophys Res Biogeosciences.* 114(G2): 1-11.
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI. 2019. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv:* 672295.
- Edgar RC. 2013. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 10(10): 996-998.
- Elshahed MS, Senko JM, Najjar FZ, Kenton SM, Roe BA, Dewers TA, Spear JR, Krumholz LR. 2003. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl Environ Microbiol.* 69(9): 5609-5621.
- Engel M, Behnke A, Bauerfeld S, Bauer C, Buschbaum C, Volkenborn N, Stoeck T. 2012. Sample pooling obscures diversity patterns in intertidal ciliate community composition and structure. *FEMS Microbiol Ecol.* 79(3): 741-750.
- Farias ME, Rascovan N, Toneatti DM, Albarracín VH, Flores M, Poire DG, Collavino M, Aguilar OM, Vazquez MP, Polerecky L. 2013. The discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake socompa, argentinean andes. *PLoS One.* 8(1); 1-15.

- Farias ME, Rasuk MC, Gallagher KL, Contreras M, Kurth, D, Fernandez AB, Poiré D, Novoa F, Visscher PT. 2017. Prokaryotic diversity and biogeochemical characteristics of benthic microbial ecosystems at La Brava, a hypersaline lake at Salar de Atacama, Chile. *PLoS One*. 12(11): 1-25.
- Fernandez AB, Rasuk MC, Visscher PT, Contreras M, Novoa F, Poire DG, Patterson MM, Ventosa A, Farias ME. 2016. Microbial diversity in sediment ecosystems (evaporites domes, microbial mats, and crusts) of Hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol*. 7(8): 1-18.
- Finke N, Simister RL, O'Neil AH, Nomosatryo S, Henny C, MacLean LC, Canfield DE, Konhauser K, Lalonde SV, Fowle DA, Crowe AS. 2019. Mesophilic microorganisms build terrestrial mats analogous to Precambrian microbial jungles. *Nat Commun*. 10(1): 1-11.
- Fischer E, Martínez GM, Rennó NO. 2016. Formation and persistence of brine on mars: experimental simulations throughout the diurnal cycle at the phoenix landing site. *astrobiology*. 16(12): 937-948.
- Fox-Powell MG, Hallsworth JE, Cousins CR, Cockell CS. 2016. Ionic strength is a barrier to the habitability of mars. *Astrobiology*. 16(6): 427-442.
- Franz HB, Mcadam AC, Ming DW, Freissinet C., Mahaffy PR, Eldridge DL, Fischer WW, Grotzinger JP, House CH, Hurowitz JÁ, McLennan SM, Schwenger SP, Vaniman DT, Archer PD, Atreya SK, Conrad PG, Dottin JW, Eigenbrode JL, Farley KA, Glavin DA, Johnson SS, Knudson CA, Morris RV, Navarro-González R, A. A. Pavlov AA, Plummer R, Rampe EB, Stern JC, Steele A, Summons RE Sutter B. 2017. Large sulfur isotope fractionations in Martian sediments at Gale crater. 10(9): 658-662.
- Franz HB, King PL, Gaillard F. 2019. Sulfur on Mars from the atmosphere to the core. In: *Volatiles in the Martian Crust*. Elsevier. 64 p.
- Franz HB, Trainer MG, Wong MH, Manning HLK, Stern JC, Mahaffy PR, Atreya SK, Benna M, Conrad PG, Harpold DN, Leshin LA, Malespin CA, McKay CP, Thomas Nolan J, Raaen E. 2014. Analytical techniques for retrieval of atmospheric composition with the quadrupole mass spectrometer of the Sample Analysis at Mars instrument suite on Mars Science Laboratory. *Planet Space Sci*. 96(2014): 99-113.
- Fukui K 2010. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*. 2010(260512): 1-16.
- Fuks G, Elgart M, Amir A, Zeisel A, Turnbaugh PJ, Soen Y, Shental N. 2018. Combining *16S rRNA* gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*. 6(1): 1-17.

- Hernandez-Eugenio L, Fardeau ML, Cayol JL, Patel BK, Thomas P, Macarie H, Garcia JL, Ollivier B. 2002. *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(4): 1217-1223.
- Galante D, Silva EP, Rodrigues F, Horvath, JE, Avellar MGB. 2016. *Astrobiologia: uma ciência emergente* São Paulo: Tikinet. 361 p.
- Garcia-Descalzo L, García-López E, Maria Moreno A, Alcazar A, Baquero F, Cid C. 2012. Mass spectrometry for direct identification of biosignatures and microorganisms in Earth analogs of Mars. In: *Planetary and Space Science*. Pergamon. p. 138-145.
- Garcia-Pichel F, Lombard J, Soule T, Dunaj S, Wu SH, Wojciechowski MF. 2019. Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later great oxidation event using gene phylogenies of a sunscreen. *MBio.* 10(3): 1-14.
- Garreaud R, Vuille M, Clement AC. 2003. The climate of the Altiplano: observed current conditions and mechanisms of past changes. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 194(1–3): 5-22.
- Gendrin A, Mangold N, Bibring JP, Langevin Y, Gondet B, Poule F, Bonello G, Quantin C, Mustard J, Arvidson R, Stéphane LeMouélic S. 2005. Sulfates in Martian layered terrains: The OMEGA/Mars express view. *Science* (80- ). 307(5715): 1587-1591.
- Glavin DP, Freissinet C, Miller KE, Eigenbrode JL, Brunner AE, Buch A, Sutter B, Archer PD, Atreya SK, Brinckerhoff WB, Cabane M, Coll P, Conrad PG, Coscia D, Dworkin JP, Franz HB, Grotzinger JP, Leshin LA, Martin MG, McKay C., Ming DW, Navarro-González R, Pavlov A, Steele A, Summons RE, Szopa C, Teinturier S, Mahaffy PR. 2013. Evidence for perchlorates and the origin of chlorinated hydrocarbons detected by SAM at the Rocknest aeolian deposit in Gale Crater. *J Geophys Res Planets.* 118(10): 1955-1973.
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 73(10): 3272-3282.
- González, BM. 2010. Análisis de las comunidades microbianas asociadas a tapetes hipersalinos de la laguna Rosada de Uaymitun, Yucatán, México. Tese (Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica) - Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. 2000. Application of the partial *16S rDNA* sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol.* 46(1): 1-8.
- Goudge TA, Fassett CI, Head JW, Mustard JF, Aureli KL. 2016. Insights into surface runoff on early Mars from paleolake basin morphology and stratigraphy. *Geology.* 44(6): 419–422.

- Grammann K, Volke A, Kunte HJ. 2002. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the Bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T. *J Bacteriol.* 184(11): 3078-3085.
- Grant, WD, Long, PE. 1989. *Microbiología Ambiental*. Espanha, Acribia, S.A. 222 p.
- Green ER, Meccas J. 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*. American Society of Microbiology. 24 p.
- Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, Oren A. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev.* 009(42): 353-375.
- Halevy I, Zuber MT, Schrag DP. 2007. A sulfur dioxide climate feedback on early Mars. *Science* (80- ). 318(5858): 1903–1907.
- Hall BG. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol.* 30(5): 1229-1235.
- Hallsworth JE. 2018. Stress-free microbes lack vitality. *Fungal Biol.* 122(6): 379-385.
- Hamilton TL, Klatt JM, De Beer D, Macalady JL. 2018. Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: Insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain hensonii. *ISME J.* 12(2): 568-584.
- Han R, Zhang X, Liu J, Long Q, Chen L, Liu D, Zhu D. 2017. Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke Salt Lake environments. *Can J Microbiol.* 63(11): 895–908.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68(4): 669-685.
- Harrington ED, Singh AH, Doerks T, Letunic I, Von Mering C, Jensen LJ, Raes J, Bork P. 2007. Quantitative assessment of protein function prediction from metagenomics shotgun sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(35): 13913-13918.
- Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H. 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* 7(7): 981-994.
- Hecht MH, Kounaves SP, Quinn RC, West SJ, Young SMM, Ming DW, Catling DC, Clark BC, Boynton W V., Hoffman J, DeFlores LP, Gospodinova K, Kapit J, Smith PH. 2009. Detection of perchlorate and the soluble chemistry of martian soil at the phoenix lander site. *Science* 325(5936): 64-67.

- Hedlund BP, Dodsworth JA, Murugapiran SK, Rinke C, Woyke T. 2014. Impact of single-cell genomics and metagenomics on the emerging view of extremophile “microbial dark matter.” *Extremophiles*. 18(5): 865-875.
- Hemme CL, Deng Y, Gentry TJ, Fields MW, Wu L, Barua S, Barry K, Tringe SG, Watson DB, He Z, Hazen TC, Tiedje JM, Rubin EM, Zhou J 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J*. 4(5): 660-672.
- Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, Stetter KO (Eds). 2011. *Extremophiles handbook*. Springer. 1247 p.
- Hurowitz JA, Grotzinger JP, Fischer WW, McLennan SM, Milliken RE, Stein N, Vasavada AR, Blake DF, Dehouck E, Eigenbrode JL, Fairén AG, Frydenvang J, Gellert R, Grant JA, Gupta S, Herkenhoff KE, Ming DW, Rampe EB, Schmidt ME, Siebach KL, Stack-Morgan K, Sumner DY, Wiens RC. 2017. Redox stratification of an ancient lake in Gale crater, Mars. *Science* . 356(6341): 1-10
- Imhoff JF. 2014. A família Chromatiaceae. In: Rosenberg E., DeLong EF, Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 27 p.
- Jung JS, Jang KH, Sihn EH, Park SK, Park CH. 2005. Characteristics of sulfur oxidation by a newly isolated burkholderia spp. *J Microbiol Biotechnol*. 15(4): 716-721.
- Jebbar M, Sohn-Bösser L, Bremer E, Bernard T, Blanco C. 2005. Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*. 187(4): 1293-1304.
- Johnson TL, Fong JC, Rule C, Rogers A, Yildiz FH, Sandkvist M. 2014. The Type II secretion system delivers matrix proteins for biofilm formation by vibrio cholerae. *J Bacteriol*. 196(24): 4245-4252.
- Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* (80- ). 296(5570): 1127-1129.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 42(D1): 199-205.
- Karunatillake S, Wray JJ, Gasnault O, McLennan SM, Rogers AD, Squyres SW, Boynton W V., Skok JR, Ojha L, Olsen N. 2014. Sulfates hydrating bulk soil in the Martian low and middle latitudes. *Geophys Res Lett*. 41(22): 7987-7996.

- Kaya-Ongoto MD, Kayath CA, Nguimbi E, Lebonguy AA, Nzaou SAE, Elenga Wilson PS, Ahombo G. 2019. Genetic clearness novel strategy of group i *bacillus* species isolated from fermented food and beverages by using fibrinolytic enzyme gene encoding a serine-like enzyme. *J Nucleic Acids*. 2019 (5484896): 1-13.
- Kerstens K, De Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackebrandt E 2006. Introduction to the Proteobacteria. In: *The Prokaryotes*. Springer New York: New York, NY. 34 p.
- Kim KK, Lee JS, Stevens DA. 2013. Microbiology and epidemiology of *Halomonas* species. *Future Microbiol*. 8(12): 1559-1573.
- Kindzierski V, Raschke S, Knabe N, Siedler F, Scheffer B, Ger-Grau KP, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Marin-Sanguino A, Kunte H-JJ, Pflüger-Grau K, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Marin-Sanguino A, Kunte HJJ. 2017. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: a case study for integrative Systems Biology. *12(1)*: 1-22.
- Kisker C, Kuper J, Van Houten B. 2013. Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5(3):1-18
- Klimmek O, Dietrich W, Dancea F, Lin Y-J, Pfeiffer S, LÖhr F, Rüterjans H, Gross R, Simon Jö, KrÖger A. 2004. Chapter 10: Sulfur Respiration. In: Springer, Dordrecht. 15 p.
- Knoll AH. 2015. Paleobiological perspectives on early microbial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7(7): 1-17.
- Knoll AH, Bergmann KD, Strauss J V. 2016. Life: The first two billion years. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 371(1707): 1-13.
- Koerdt A, Gödeke J, Berger J, Thormann KM, Albers SV. 2010. Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS One*. 5(11): 1-10.
- Konings WN, Albers SV, Koning S, Driesen AJM. 2002. The Cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 81(1–4): 61-72.
- Kopcakova A, Stramova Z, Kvasnova S, Godany A, Perhacova Z, Pristas P 2014. Need for database extension for reliable identification of bacteria from extreme environments using MALDI-TOF mass spectrometry. *Chem Pap*. 68(11): 1435-1442.
- Kopparapu RK 2020. Characterizing Exoplanet Habitability. In: *Planetary Astrobiology*. University of Arizona Press. p. 1–1.

- Kounaves SP, Hecht MH, Kapit J, Quinn RC, Catling DC, Clark BC, Ming DW, Gospodinova K, Hredzak P, McElhoney K, Shusterman J. 2010. Soluble sulfate in the martian soil at the Phoenix landing site. *Geophys Res Lett.* 37(9): 1-5.
- Kraegeloh A, Kunte HJ. 2002. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata*. *Extremophiles.* 6(6): 453-462.
- Kuever J. 2014. The family desulfobacteraceae. In: *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 45–73.
- Kuhlmann AU, Bremer E 2002. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 68(2): 772–783.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol.* 12(1): 118–123.
- Krumbein WE, Brehm U, Gerdes G, Gorbushina AA, Levit G, Palinska KA. 2003. Biofilm, Biodictyon, Biomat Microbialites, Oolites, Stromatolites Geophysiology, Global Mechanism, Parahistology. In: *Fossil and Recent Biofilms*. Springer Netherlands. 27 p.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 31(9): 814–821.
- Lapaglia C, Hartzell PL. 1997. Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl Environ Microbiol.* 63(8): 3158-3163.
- Lederberg JM. 2001. AT COMMENTARY 'Ome Sweet 'Omics-A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 15[7]:1-8.
- Lennon JT, Jones SE. 2011. Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol.* 9(2): 119–130.
- Lewin A, Wentzel A, Valla S. 2013. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Curr Opin Biotechnol.* 24(3): 516–525.
- Li Y, Shan M, Zhu Z, Mao X, Yan M, Chen Y, Zhu Q, Li H, Gu B. 2019. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. *BMC Infect Dis.* 19(1): 941.

- Li Y, Wang H, Zhao YP, Xu YC, Hsueh PR. 2017. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of *Aspergillus* species directly from growth on solid agar media. *Front Microbiol.* 8(6): 1-8
- Liebensteiner MG, Tsesmetzis N, Stams AJM, Lomans BP. 2014. Microbial redox processes in deep subsurface environments and the potential application of (per)chlorate in oil reservoirs. *Front Microbiol.* 5(428): 1-3.
- Liu Y, Lai Q, Du J, Shao Z. 2016. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66(3): 1193-1199.
- Llorens-Marès T, Yooseph S, Goll J, Hoffman J, Vila-Costa M, Borrego CM, Dupont CL, Casamayor EO. 2015. Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. *ISME J.* 9(7): 1648–1661.
- Loukas A, Kappas I, Abatzopoulos TJ 2018. HaloDom: a new database of halophiles across all life domains. *J Biol Res.* 25(1): 1-2.
- Lozupone CA, Knight R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(27): 11436-11440.
- Luo Y. 2018. geochemical cycle and environmental effects of sulfur in lakes IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 394 052039
- Lynch MDJ, Neufeld JD. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol.* 13(4): 217-229.
- MacKelprang R, Burkert A, Haw M, Mahendrarajah T, Conaway CH, Douglas TA, Waldrop MP. 2017. Microbial survival strategies in ancient permafrost: Insights from metagenomics. *ISME J.* 11(10): 2305-2318.
- Maidak BL. 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28(1): 173-174.
- Maldonado M, Albarracín V, Lara J, Ferrero M, Farías M. 2018. Culture-dependent and independent methods revealed dominance of halophilic Euryarchaeota at High-Altitude Andean Lakes. *Aquat Microb Ecol.* Vol. 81(2): 171–188
- Manter DK, Weir TL, Vivanco JM. 2010. Negative effects of sample pooling on PCR-Based estimates of soil microbial richness and community structure. *Appl Environ Microbiol.* 76(7): 2086-2090.
- Martín-Cerezo ML, García-López E, Cid C. 2015. Isolation and Identification of a Red Pigment from the Antarctic *Bacterium Shewanella frigidimarina*. *Protein Pept Lett.* 22(12): 1076-1082.

- Martín-Clemente E, Melero-Jiménez IJ, Bañares-España E, Flores-Moya A, García-Sánchez MJ. 2019. Adaptation dynamics and evolutionary rescue under sulfide selection in cyanobacteria: a comparative study between *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria* sp. (cyanobacteria). *J Phycol.* 55(6): 1348-1360.
- Martínez GM, Renno NO. 2013. Water and brines on mars: Current evidence and implications for MSL. *Space Sci Rev.* 175(1-4): 29-51.
- Matsubara T, Fujishima K, Saltikov CW, Nakamura S, Rothschild LJ. 2017. Earth analogues for past and future life on Mars: Isolation of perchlorate resistant halophiles from Big Soda Lake. *Int J Astrobiol.* 16(3): 218–228.
- Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y, Hiramatsu K, Kikuchia K. 2012. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 50(12): 3862-3866.
- Maza F, Maldonado J, Vásquez-Dean J, Mandakovic D, Gaete A, Cambiazo V, González M. 2019. Soil bacterial communities from the chilean andean highlands: taxonomic composition and culturability. *Front Bioeng Biotechnol.* 7(10): 1-12.
- Mayr E. 1997. *This is biology: the science of the living world.* Belknap Press of Harvard University Press. 327 p.
- McMahon S, Bosak T, Grotzinger JP, Milliken RE, Summons RE, Daye M, Newman SA, Fraeman A, Williford KH, Briggs DEG. 2018. A field guide to finding fossils on Mars. *J Geophys Res Planets.* 123(5): 1012-1040.
- Meyer-Dombard DR, Shock EL, Amend JP. 2005. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology.* 3(3): 211-227.
- Miller SR, Bebout BM. 2004. Variation in sulfide tolerance of photosystem ii in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. *Appl Environ Microbiol.* 70(2): 736-744.
- Mirete S, Mora-Ruiz MR, Lamprecht-Grandío M, de Figueras CG, Rosselló-Móra R, González-Pastor JE. 2015. Salt resistance genes revealed by functional metagenomics from brines and moderate-salinity rhizosphere within a hypersaline environment. *Front Microbiol.* 6(1121): 1-16.
- Mlewski EC, Pisapia C, Gomez F, Lecourt L, Rueda ES, Benzerara K, Ménez B, Borensztajn S, Jamme F, Réfrégiers M, Gérard E 2018. Characterization of pustular mats and related Rivularia-rich laminations in oncoids from the Laguna Negra lake (Argentina). *Front Microbiol.* 9(996):1-23.

- Montgomery K, Charlesworth J, LeBard R, Visscher P, Burns B. 2013. Quorum Sensing in Extreme Environments. *Life*. 3(1): 131–48.
- Montinaro A, Strauss H 2016. Sulphur tales from the early Archean world. *Int J Astrobiol*. 15(3): 177-185.
- Nagler K, Setlow P, Reineke K, Driks A, Moeller R. 2015. Involvement of coat proteins in *Bacillus subtilis* spore germination in high-salinity environments. *Appl Environ Microbiol*. 81(19): 6725-6735.
- Nishida A, Thiel V, Nakagawa M, Ayukawa S, Yamamura M. 2018. Effect of light wavelength on hot spring microbial mat biodiversity. *PLoS One*. 13(1): 1-30.
- Noffke N, Christian D, Wacey D, Hazen RM. 2013. Microbially induced sedimentary structures recording an ancient ecosystem in the ca. 3.48 Billion-year-old dresser formation, pilbara, Western Australia. *Astrobiology*. 13(12): 1103-1124.
- Noffke N, Gerdes G, Klenke T, Krumbein WE. 2001. Microbially induced sedimentary structures indicating climatological, hydrological and depositional conditions within recent and pleistocene coastal facies zones (Southern Tunisia). *Facies*. 44(44): 23-30.
- Nutman AP, Bennett VC, Friend CRL, Van Kranendonk MJ, Chivas AR. 2016. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*. 537(7621): 535-538.
- Ojha L, Wilhelm MB, Murchie SL, Mcewen AS, Wray JJ, Hanley J, Massé M, Chojnacki M 2015. Spectral evidence for hydrated salts in recurring slope lineae on Mars. *Nat Geosci*. 8(11): 829-832.
- Ordoñez OF, Lanzarotti E, Kurth D, Gorriti MF, Revale S, Cortez N, Vazquez MP, Farías ME, Turjanski AG. 2013. Draft genome sequence of the polyextremophilic *Exiguobacterium* sp. strain S17, isolated from hyperarsenic lakes in the Argentinian Puna. *Genome Announc*. 1(4): 1-2.
- Ordoñez OF, Rasuk MC, Soria MN, Contreras M, Farías ME. 2018. Haloarchaea from the Andean Puna: biological role in the energy metabolism of arsenic. *Microb Ecol*. 76(3): 695-705.
- Oren A. 1999. Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(2): 334-348.
- Oren A. 2013. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol*. 4(315): 1-6.
- Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*. 4(1): 1-2.

- Oren A, Elevi Bardavid R, Mana L. 2014. Perchlorate and halophilic prokaryotes: Implications for possible halophilic life on Mars. *Extremophiles*. 18(1): 75-80.
- Oren A, Larimer F, Richardson P, Lapidus A, Csonka LN. 2005. How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles*. 9(4): 275-279.
- Orosei R, Lauro SE, Pettinelli E, Cicchetti A, Coradini M, Cosciotti B, Di Paolo F, Flamini E, Mattei E, Pajola M, Soldovieri F, Cartacci M, Cassenti F, Frigeri A, Giuppi S, Martufi R, Masdea A, Mitri G, Nenna C, Noschese R, Restano M, Seu R. 2018. Radar evidence of subglacial liquid water on Mars. *Science*. 361(6401): 490-493.
- Osman OA, Beier S, Grabherr M, Bertilsson S. 2017. Interactions of freshwater cyanobacteria with bacterial antagonists. *Appl Environ Microbiol*. 83(7):1-18.
- Parro V, De Diego-Castilla G, Moreno-Paz M, Blanco Y, Cruz-Gil P, Rodríguez-Manfredi JA, Fernández-Remolar D, Gómez F, Gómez MJ, Rivas LA, Demergasso C, Echeverría A, Urtuvia VN, Ruiz-Bermejo M, García-Villadangos M, Postigo M, Sánchez-Román M, Chong-Díaz G, Gómez-Elvira J. 2011. A microbial oasis in the hypersaline atacama subsurface discovered by a life detector chip: Implications for the search for life on mars. *Astrobiology*. 11(10): 969-996.
- Patel HM, Rastogi RP, Trivedi U, Madamwar D. 2019. Cyanobacterial diversity in mat sample obtained from hypersaline desert, Rann of Kachchh. *3 Biotech*. 9(8): 1-13.
- Pavlov AA, Kasting JF. 2002. Mass-independent fractionation of sulfur isotopes in Archean sediments: Strong evidence for an anoxic Archean atmosphere. *Astrobiology*. 2(1): 27–41.
- Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. 1999. Assigning protein functions by comparative genome analysis: Protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8): 4285–4288.
- Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, De Philippis R, Tamagnini P. 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol Rev*. 33(5): 917-941.
- Petroff AP, Sim MS, Maslov A, Krupenin M, Rothman DH, Bosak T. 2010. Biophysical basis for the geometry of conical stromatolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(22): 9956–9961.
- Pikuta E V., Hoover RB, Tang J. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit Rev Microbiol*. 33(3): 183-209.
- Plaxco KW, Gross M. 2011. *Astrobiology : a brief introduction*. Johns Hopkins University Press. 330 p.

- Poli A, Esposito E, Orlando P, Lama L, Giordano A, de Appolonia F, Nicolaus B, Gambacorta A. 2007. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Syst Appl Microbiol.* 30(1): 31-38.
- Poli A, Finore I, Romano I, Gioiello A, Lama L, Nicolaus B. 2017. Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. *Microorganisms.* 5(2): 1-30.
- Preisner EC, Fichot EB, Norman RS. 2016. Microbial mat compositional and functional sensitivity to environmental disturbance. *Front Microbiol.* 7(1632): 1-16.
- Prieto-Barajas CM, Valencia-Cantero E, Santoyo G 2018. Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application. *Electron J Biotechnol.* 31(1): 48-56.
- Pulschen AA, Bendia AG, Fricker AD, Pellizari VH, Galante D, Rodrigues F. 2017. Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media. *Front Microbiol.* 8(1346): 1-12.
- Qu JH, Yuan HL. 2008. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(9): 2191-2194.
- Quatrini R, Johnson DB. 2018. Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Curr Opin Microbiol.* 43: 139-147.
- Quillaguamán J, Hatti-Kaul R, Mattiasson B, Alvarez MT, Delgado O. 2004. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(3): 721–725.
- Rahi P, Prakash O, Shouche YS. 2016. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: Challenges and scopes for microbial ecologists. *Front Microbiol.* 7(1359): 1-12.
- Rajendhran J, Gunasekaran P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res.* 166(2): 99-110.
- Ramirez RM, Craddock RA. 2018. The geological and climatological case for a warmer and wetter early Mars. *Nat Geosci.* 11(4): 230-237.
- Ramos V, Morais J, Vasconcelos VM. 2017. A curated database of cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy and phylogenetic studies. *Sci Data.* 4(1): 1-8.

- Rampelotto PH. 2010. Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*. 2(6): 1602-1623.
- Rapin W, Ehlmann BL, Dromart G, Schieber J, Thomas NH, Fischer WW, Fox VK, Stein NT, Nachon M, Clark BC, Kah LC, Thompson L, Meyer HA, Gabriel TSJ, Hardgrove C, Mangold N, Rivera-Hernandez F, Wiens RC, Vasavada AR. 2019. An interval of high salinity in ancient Gale crater lake on Mars. *Nat Geosci*. 12(11): 889-895.
- Rascovan N, Maldonado J, Vazquez MP, Eugenia Fariás M. 2016. Metagenomic study of red biofilms from Diamante Lake reveals ancient arsenic bioenergetics in haloarchaea. *ISME J*. 10(2): 299–309.
- Rasuk MC, Fernández AB, Kurth D, Contreras M, Novoa F, Poiré D, Fariás ME. 2016. Bacterial diversity in microbial mats and sediments from the Atacama Desert. *Microb Ecol*. 71(1): 44–56.
- Reysenbach A-L, Götz D, Banta A, Jeanthon C, Fouquet Y. 2002. Expanding the distribution of the Aquificales to the deep-sea vents on Mid-Atlantic Ridge and Central Indian Ridge. *Cah. Biol. Mai*. 43 (3-4): 425-428.
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. 2000. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 66(6): 2541-2547.
- Roohi A, Ahmed I, Khalid N, Iqbal M, Jamil M. 2014. Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the salt mines of Karak, Pakistan. *Int J Agric Biol*. 16 (3): 564-570.
- Ross KA, Feazel LM, Robertson CE, Fathepure BZ, Wright KE, Turk-MacLeod RM, Chan MM, Held NL, Spear JR, Pace NR. 2012. Phototrophic phylotypes dominate mesothermal microbial mats associated with hot springs in Yellowstone National Park. *Microb Ecol*. 64(1): 162-170.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL. 2001. Life in extreme environments. *Nature*. 409(6823): 1092–1101.
- Rozanov AS, Bryanskaya AV, Ivanisenko TV, Malup TK, Peltek SE. 2017. Biodiversity of the microbial mat of the Garga hot spring. *BMC Evol Biol*. 17(254): 37-54.
- Ruvindy R, White RA, Neilan BA, Burns BP. 2016. Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics. *ISME J*. 10(1): 183–196.
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol*. 173(14): 4371-4378.

- Schneider D, Arp G, Reimer A, Reitner J, Daniel R. 2013. Phylogenetic Analysis of a Microbialite-Forming Microbial Mat from a Hypersaline Lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PLoS One*. 8(6): 1-14.
- Schulze-Makuch D, Irwin LN, Lipps JH, LeMone D, Dohm JM, Fairén AG. 2005. Scenarios for the evolution of life on Mars. *J Geophys Res*. 110(E12): 1-12.
- Schwibbert K, Marin-Sanguino A, Bagyan I, Heidrich G, Lentzen G, Seitz H, Rampp M, Schuster SC, Klenk HP, Pfeiffer F, Oesterhelt D, Kunte HJ. 2011. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581 T. *Environ Microbiol*. 13(8): 1973-1994.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*. 4(47): 1-13.
- Shen Y, Farquhar J, Masterson A, Kaufman AJ, Buick R. 2009. Evaluating the role of microbial sulfate reduction in the early Archean using quadruple isotope systematics. *Earth Planet Sci Lett*. 279(3-4): 383-391.
- Siegert MJ, Ellis-Evans JC, Tranter M, Mayer C, Petit JR, Salamatin A, Priscu JC. 2001. Physical, chemical and biological processes in Lake Vostok and other Antarctic subglacial lakes. *Nature*. 414(6864): 603-609.
- Sigee DC, Glenn R, Andrews MJ, Bellinger EG, Butler RD, Epton HAS, Hendry RD. 1999. Biological control of cyanobacteria: Principles and possibilities. In: *Hydrobiologia*. Springer, Dordrecht. p. 161-172.
- Simon C, Daniel R. 2011. Metagenomic analyses: Past and future trends. *Appl Environ Microbiol*. 77(4): 1153-1161.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 6(791): 1-16.
- Sleep NH. 2010. The Hadean-Archaeon environment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(6): 1-14.
- Smith ML, Claire MW, Catling DC, Zahnle KJ. 2014. The formation of sulfate, nitrate and perchlorate salts in the martian atmosphere. *Icarus*. 231: 51-64.
- Schmitt S, Conroy JL, Flynn TM, Sanford RA, Higley MC, Chen M, Fouke BW. 2019. Salinity, microbe and carbonate mineral relationships in brackish and hypersaline lake sediments: A case study from the tropical Pacific coral atoll of Kiritimati. *Depos Rec*. 5(2): 212-229.
- Schopf JW. 2006. Fossil evidence of Archaean life. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 361(1470): 869-885.

- Spring S, Jäckel U, Wagner M, Kämpfer P. 2004. *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N<sub>2</sub>O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(1): 99-106.
- Stal LJ, Moezelaar JR. 1997. Fermentation in cyanobacteria<sup>1</sup>. *FEMS Microbiol. Reviews.* 21(2): 179-211.
- Staley JT. 2003. Astrobiology, the transcendent science: The promise of astrobiology as an integrative approach for science and engineering education and research. *Curr Opin Biotechnol.* 14(3): 347-354.
- Stevenson A, Cray JA, Williams JP, Santos R, Sahay R, Neuenkirchen N, McClure CD, Grant IR, Houghton JD, Quinn JP, Timson DJ, Patil S V., Singhal RS, Antón J, Dijksterhuis J, Hocking AD, Lievens B, Rangel DEN, Voytek MA, Gunde-Cimerman N, Oren A, Timmis KN, McGenity TJ, Hallsworth JE. 2015. Is there a common water-activity limit for the three domains of life. *ISME J.* 9(6): 1333-1351.
- Stewart EJ. 2012. Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol.* 194(16): 4151-4160.
- Stillman DE, Bue BD, Wagstaff KL, Primm KM, Michaels TI, Grimm RE. 2020. Evaluation of wet and dry Recurring Slope Lineae (RSL) formation mechanisms based on quantitative mapping of RSL in Garni Crater, Valles Marineris, Mars. *Icarus.* 335(113420): 1-19.
- Sutter B, McAdam AC, Mahaffy PR, Ming DW, Edgett KS, Rampe EB, Eigenbrode JL, Franz HB, Freissinet C, Grotzinger JP, Steele A, House CH, Archer PD, Malespin CA, Navarro-González R, Stern JC, Bell JF, Calef FJ, Gellert R, Glavin DP, Thompson LM, Yen AS. 2017. Evolved gas analyses of sedimentary rocks and eolian sediment in Gale Crater, Mars: Results of the Curiosity rover's sample analysis at Mars instrument from Yellowknife Bay to the Namib Dune. *J Geophys Res Planets.* 122(12): 2574-2609.
- Tang X, Xie G, Shao K, Bayartu S, Chen Y, Gao G. 2012. Influence of salinity on the bacterial community composition in Lake Bosten, a large oligosaline lake in arid Northwestern China. *Appl Environ Microbiol.* 78(13): 4748–4751.
- Tazi L, Breakwell DP, Harker AR, Crandall KA. 2014. Life in extreme environments: Microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles.* 18(3): 525–535.
- Teske A, Brinkhoff T, Muyzer G, Moser DP, Rethmeier J, Jannasch HW. 2000. Diversity of thiosulfate-oxidizing bacteria from marine sediments and hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol.* 66(8): 3125-3133.
- Teske A, Venkateswaran K, Pachiadaki M, Paul D, Kumbhare S V, Mhatre SS, Chowdhury SP, Shetty SA, Marathe NP, Bhute S, Shouche YS. 2016. Exploration of Microbial Diversity and Community Structure of Lonar Lake: The Only Hypersaline Meteorite Crater Lake within Basalt Rock. *Front Microbiol.* 1(1553):1-12.

- Tian Y, Zhao Y, Wu X, Liu F, Hu B, Walcott RR. 2015. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol Plant Pathol.* 16(1): 38-47.
- Tringe SG, Hugenholtz P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol.* 11(5): 442-446.
- Vaidya S, Dev K, Sourirajan A. 2018. Distinct Osmoadaptation Strategies in the Strict Halophilic and Halotolerant Bacteria Isolated from Lunsu Salt Water Body of North West Himalayas. *Curr Microbiol.* 75(7): 888-895.
- Vaishampayan PA, Rabbow E, Horneck G, Venkateswaran KJ. 2012. Survival of bacillus pumilus spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology.* 12(5): 487-497.
- Van Kranendonk MJ, Philippot P, Lepot K, Bodorkos S, Pirajno F. 2008. Geological setting of Earth's oldest fossils in the ca. 3.5 Ga Dresser Formation, Pilbara Craton, Western Australia. *Precambrian Res.* 167(1–2): 93-124.
- Vaniman DT, Bish DL, Chipera SJ, Fialips CI, Carey JW, Feldman WG. 2004. Magnesium sulphate salts and the history of water on Mars. *Nature.* 431(7009): 663-665.
- Van-Thuoc D, Quillaguamán J, Mamo G, Mattiasson B. 2007. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *J Appl Microbiol.* 104(2008): 420-428.
- Vikram S, Guerrero LD, Makhalanyane TP, Le PT, Seely M, Cowan DA. 2016. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community. *Environ Microbiol.* 18(6): 1875-1888.
- Vreeland RH. 2015. *Halomonas*. In: Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK. 19 p.
- Wadsworth J, Cockell CS. 2017. Perchlorates on Mars enhance the bacteriocidal effects of UV light. *Sci Rep.* 7(1): 1-8.
- Wang MSW. 2009. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16s rDNA sequences. *Brazilian J Microbiol.* 40(3): 505-521.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16): 5261–5267.
- Welsh DT, Herbert RA. 1993. Identification of organic solutes accumulated by purple and green sulphur bacteria during osmotic stress using natural abundance 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEMS Microbiol Ecol.* 13(2): 145-149.

- Weinisch L, Kühner S, Roth R, Grimm M, Roth T, Netz DJA, Pierik AJ, Filker S. 2018. Identification of osmoadaptive strategies in the halophile, heterotrophic ciliate *Schmidingerothrix salinarum*. *PLOS Biol.* 16(1): 1-29.
- White MF, Allers T. 2018. DNA repair in the archaea-an emerging picture. *FEMS Microbiol Rev.* 42(4): 514-526.
- Willey, Joanne M., Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton, M L. 2013. Prescott's Microbiology [Hardcover]. McGraw-Hill Science/Engineering Math; 9 edition. 847 p.
- Wong H, Ahmed-Cox A, Burns B. 2016. Molecular ecology of hypersaline microbial mats: current insights and new directions. *Microorganisms.* 4(1): 1-6.
- Wright KE, Williamson C, Grasby SE, Spear JR, Templeton AS. 2013. Metagenomic evidence for sulfur lithotrophy by epsilonproteobacteria as the major energy source for primary productivity in a sub-aerial arctic glacial deposit, borup fiord pass. *Front Microbiol.* 4(63): 1-20.
- Xia FF, Zhang HT, Wei XM, Su Y, He R. 2015. Characterization of H<sub>2</sub>S removal and microbial community in landfill cover soils. *Environ Sci Pollut Res.* 22(23): 18906-18917.
- Xia J, Ling SK, Wang XQ, Chen GJ, Du ZJ. 2016. *Aliifodinibius halophilus* sp. nov., a moderately halophilic member of the genus *Aliifodinibius*, and proposal of *Balneolaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66(6): 2225-2233.
- Xie W, Wang F, Guo L, Chen Z, Sievert SM, Meng J, Huang G, Li Y, Yan Q, Wu S, Wang X, Chen S, He G, Xiao X, Xu A. 2011. Comparative metagenomics of microbial communities inhabiting deep-sea hydrothermal vent chimneys with contrasting chemistries. *ISME J.* 5(3): 414-426.
- Zannier F, Portero LR, Ordoñez OF, Martinez LJ, Farías ME, Albarracin VH. 2019. Polyextremophilic bacteria from high altitude andean lakes: arsenic resistance profiles and biofilm production. *Biomed Res Int.* 2019(1231975): 1 -11.
- Zarkasi KZ, Halim MA, Nazari TF, Daud F. 2018. Metagenomic data on *Anadara granosa* associated bacterial communities using culture dependent approaches and 16S *rRNA* sequencing. *Data Br.* 19: 514-519.
- Zúñiga LR, Campos V, Pinochet H, Prado B. 1991. A limnological reconnaissance of Lake Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Hydrobiologia.* 210(1-2): 19-24.

## 9. APÊNDICES

### Apêndice I – Resultados do sequenciamento do 16S rRNA em nível família.

Bactérias; Outros; Outros; Outros; De outros	18,40%
Não atribuível; Outro; Outro; Outro; De outros	12,70%
Bactérias; Proteobactérias; Outros; Outros; De outros	6,50%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; Comamonadaceae	3,70%
Bactérias; Bacteroidetes; Outros; Outros; De outros	3,60%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Myxococcales; Polyangiaceae	3,40%
Bactérias; Proteobactérias; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae	3,40%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Pseudomonadales; Moraxellaceae	3,20%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; Burkholderiales_incertae_sedis	2,30%
Bactérias, Cianobactérias / Cloroplastos, Cianobactérias, Família XIII; Família XIII	2,20%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; De outros	2,00%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Myxococcales; De outros	2,00%
Bactérias; Verrucomicrobia; Subdivisão3; Subdivisão3_genera_incertae_sedis; Subdivisão3_genera_incertae_sedis	2,00%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; Burkholderiaceae	1,90%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Outros; De outros	1,70%
Bactérias; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; De outros	1,50%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae	1,50%
Bactérias; Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Chitinophagaceae	1,30%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Cromatiales; Chromatiaceae	1,30%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Outros; De outros	1,30%
Bactérias; Firmicutes; Bacilos; Bacillales; Planococcaceae	1,20%
Bactérias; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae	1,00%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae	0,90%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Outros; De outros	0,80%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	0,80%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Outros; De outros	0,80%
Bactérias; Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	0,70%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; Alcaligenaceae	0,70%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Desulfobacterales; Desulfobacteraceae	0,70%
Bactérias; Cianobactérias / Cloroplastos; Cianobactérias; Outros; De outros	0,60%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhizobiales; De outros	0,60%

Bactérias; Spirochaetes; Spirochaetia; Spirochaetales; Spirochaetaceae	0,60%
Bactérias; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae	0,50%
Bactérias; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; De outros	0,50%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae	0,50%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae	0,50%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae	0,50%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Xanthomonadales; Sinobacteraceae	0,50%
Bactérias; Acidobactérias; Acidobactérias_Gp6; Gp6; Gp6	0,40%
Bactérias; Actinobactérias; Actinobactérias; Solirubrobacterales; Solirubrobacteraceae	0,40%
Bactérias; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae	0,40%
Bactérias; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae	0,40%
Bactérias; Cloroflexos; Outros; Outros; De outros	0,40%
Bactérias; Cloacimonetes; Candidatus Cloacamonas; Candidatus Cloacamonas; Candidatus Cloacamonas	0,40%
Bactérias, Deinococcus-Thermus, Deinococci, Deinococcales; Trueperaceae	0,40%
Bactérias; Firmicutes; Outros; Outros; De outros	0,40%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae	0,40%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae	0,40%
Bactérias; Verrucomicrobia; Opitutae; Puniceococcales; Puniceococcaceae	0,40%
Bactérias; Verrucomicrobia; Spartobacteria; Spartobacteria_genera_incertae_sedis; Spartobacteria_genera_incertae_sedis	0,40%
Não classificado; Outro; Outro; Outro; De outros	0,40%
Archaea; Euryarchaeota; Outro; Outro; De outros	0,30%
Bactérias; Acidobactérias; Acidobactérias_Gp5; Gp5; Gp5	0,30%
Bactérias; Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae	0,30%
Bactérias; Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetales; Planctomycetaceae	0,30%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae	0,30%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Desulfovibrionales; Desulfobalobiaceae	0,30%
Bactérias; Verrucomicrobia; Outros; Outros; De outros	0,30%
Archaea; Thaumarchaeota; Nitrososphaerales; Nitrososphaerales; Nitrososphaeraceae	0,20%
Bactérias; Actinobactérias; Actinobactérias; Actinomycetales; De outros	0,20%
Bactérias; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales_Incertae_Sedis_XI	0,20%

Bactérias; Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Nitrospiraceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Caulobacterales; Caulobacteraceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Rhizobiales; Rhizobiaceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Burkholderiales; Oxalobacteraceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Betaproteobactérias; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Myxococcales; Myxococcaceae	0,20%
Bactérias; Proteobactérias; Gammaproteobactérias; Alteromonadales; Alteromonadaceae	0,20%
Bactérias SR1; SR1_genera_incertae_sedis; SR1_genera_incertae_sedis; SR1_genera_incertae_sedis	0,20%
Bactérias; Acidobactérias; Acidobactérias_Gp3; Gp3; Gp3	0,10%
Bactérias; Acidobactérias; Acidobactérias_Gp4; Blastocatella; Blastocatella	0,10%
Bactérias; Acidobactérias; Acidobactérias_Gp4; Gp4; Gp4	0,10%
Bactérias; Actinobactérias; Actinobactérias; Actinomycetales; Thermomonosporaceae	0,10%
Bactérias; Actinobactérias; Actinobactérias; Gaiellales; Gaiellaceae	0,10%
Bactérias; Actinobactérias; Actinobactérias; Solirubrobacterales; Conexibacteraceae	0,10%
Bactérias; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Marinilabiaceae	0,10%
Bactérias; Bacteroidetes; Citofagia; Citofagias; Cytophagaceae	0,10%
Bactérias; Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; De outros	0,10%
Bactérias, Cianobactérias / Cloroplastos, Cianobactérias, Família XII; Família XII	0,10%
Bactérias; Firmicutes; Bacilos; Lactobacillales; De outros	0,10%
Bactérias; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae 1	0,10%
Bactérias; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae	0,10%
Bactérias; Firmicutes; Clostridia; Halanaerobiales; Halanaerobiaceae	0,10%
Bactérias; Proteobactérias; Alphaproteobactérias; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae	0,10%
Bactérias; Proteobactérias; Deltaproteobactérias; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae	0,10%
Bactérias; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae	0,10%
Archaea; Euryarchaeota; Halobacteria; Halobacteriales; Halobacteriaceae	0,10%

Apêndice 2 – Resultados do nível dois e três da predição metabólica pelo software PICRUST.

KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Amino acid metabolism</b>	
Arginine and proline metabolism	647.298.102.863.206
Cysteine and methionine metabolism	490.136.598.705.236
Glycine, serine and threonine metabolism	526.621.338.760.873
Histidine metabolism	260.308.753.665.279
Lysine biosynthesis	307.248.101.137.982
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	414.020.837.579.311
Tyrosine metabolism	219.202.874.365.519
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	395.958.548.503.414
Valine, leucine and isoleucine degradation	387.254.269.570.187
<b>Biosynthesis of other secondary metabolites</b>	
Flavone and flavonol biosynthesis	287.341.209.220.672
Flavonoid biosynthesis	526.092.522.218.377
Isoquinoline alkaloid biosynthesis	374.124.893.022.375
Novobiocin biosynthesis	741.612.666.704.524
Phenylpropanoid biosynthesis	480.916.065.970.076
Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	755.989.448.931.057
<b>Carbohydrate metabolism</b>	
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	638.701.440.407.042
Citrate cycle (TCA cycle)	505.767.499.901.305
Fructose and mannose metabolism	360.621.338.778.014
Galactose metabolism	297.902.535.970.302
Glycolysis / Gluconeogenesis	658.858.387.804.529
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	403.606.567.978.779
Inositol phosphate metabolism	120.119.403.262.816
KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Carbohydrate metabolism</b>	
Pentose and glucuronate interconversions	239.498.240.474.985
Pentose phosphate pathway	425.747.785.542.621

KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Carbohydrate metabolism</b>	
Propanoate metabolism	440.353.434.634.951
Pyruvate metabolism	671.752.578.834.822
<b>Cell motility</b>	
Bacterial chemotaxis	309.575.200.268.392
Flagellar assembly	358.830.629.644.341
<b>Energy metabolism</b>	
Oxidative phosphorylation	698.053.393.956.913
Methane metabolism	646.950.040.506.766
Carbon fixation pathways in prokaryotes	618.202.543.881.299
Nitrogen metabolism	425.611.419.217.055
Sulfur metabolism	286.988.545.315.982
Photosynthesis proteins	174.155.697.358.079
Photosynthesis	160.593.933.330.688
Photosynthesis - antenna proteins	31.068.352.573.925
Carbon fixation in photosynthetic organisms	29.141.555.351.711
<b>Folding, sorting and degradation</b>	
Proteasome	357.851.866.374.637
Protein export	310.499.313.213.318
RNA degradation	242.379.635.241.193
Sulfur relay system	205.790.493.603.406
Other glycan degradation	524.656.375.160.143
Peptidoglycan biosynthesis	345.777.111.736.929
<b>Lipid metabolism</b>	
alpha-Linolenic acid metabolism	274.377.919.013.549
Fatty acid biosynthesis	292.458.672.310.933
Fatty acid elongation in mitochondria	690.638.590.745.311
Fatty acid metabolism	325.058.199.569.199

KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Lipid metabolism</b>	
Glycerolipid metabolism	202.518.255.470.438
Glycerophospholipid metabolism	284.663.796.417.181
Linoleic acid metabolism	191.563.553.733.244
<b>Membrane transport</b>	
Bacterial secretion system	411.646.460.977.556
Transporters	369.952.050.920.909
ABC transporters	203.952.885.810.252
Phosphotransferase system (PTS)	31.048.420.446.268
<b>Metabolism of cofactors and vitamins</b>	
Folate biosynthesis	229.793.474.645.673
Lipoic acid metabolism	470.154.770.760.169
Nicotinate and nicotinamide metabolism	249.564.765.525.219
One carbon pool by folate	244.411.854.012.853
Pantothenate and CoA biosynthesis	312.599.269.011.982
Porphyrin and chlorophyll metabolism	400.415.993.280.499
Phosphonate and phosphinate metabolism	354.838.262.714.872
<b>Metabolism of terpenoids and polyketides</b>	
Biosynthesis of ansamycins	455.817.287.507.642
Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	466.400.336.084.957
Carotenoid biosynthesis	195.045.647.885.486
Terpenoid backbone biosynthesis	272.634.343.901.926
Tetracycline biosynthesis	559.494.840.864.639
Nucleotide metabolism	
Pyrimidine metabolism	832.022.400.947.061
<b>Replication and repair</b>	
DNA replication	298.136.907.066.665
Mismatch repair	352.344.706.706.661
Nucleotide excision repair	1.908.822.675.149
Non-homologous end-joining	168.276.371.828.615
Base excision repair	23.129.107.644.765

KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Signal transduction</b>	
Two-component system	126.475.573.192.161
KEGG LEVEL 2 AND 3	Abundance
<b>Transcription</b>	
Basal transcription factors	131.483.543.694.098
RNA polymerase	861.830.291.249.881
Spliceosome	466.828.925.591.634
<b>Translation</b>	
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	528.235.334.714.833
mRNA surveillance pathway	185.724.633.211.674
<b>Transport and catabolism</b>	
Endocytosis	281.559.620.219.867
Lysosome	238.993.344.363.526
<b>Others</b>	432.554.792.611.793

APÊNDICE 3 – Resultados da densidade óptica na curva de crescimento da cepa OC 9.7 em NaCl.

NaCl	Controle					5%					15%					25%				
Tempo (Horas)	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão
0	0,022	0,021	0,025	0,023	0,0021	0,035	0,04	0,03	0,035	0,0050	0,025	0,03	0,021	0,025	0,0045	0,035	0,031	0,025	0,030	0,0050
6	0,528	0,592	0,601	0,574	0,0398	0,265	0,294	0,315	0,291	0,0251	0,08	0,115	0,06	0,085	0,0278	0,043	0,045	0,041	0,043	0,0020
12	1,065	1,014	1,12	1,066	0,0530	0,611	0,669	0,445	0,575	0,1163	0,127	0,159	0,131	0,139	0,0174	0,057	0,058	0,074	0,063	0,0095
18	1,504	1,349	1,44	1,431	0,0779	0,926	0,86	0,948	0,911	0,0458	0,136	0,18	0,15	0,155	0,0225	0,078	0,091	0,131	0,100	0,0276
24	1,62	1,544	1,67	1,611	0,0634	1,251	1,169	1,245	1,222	0,0457	0,268	0,344	0,333	0,315	0,0411	0,103	0,118	0,16	0,127	0,0295
48	1,872	1,764	1,612	1,749	0,1306	1,605	1,516	1,593	1,571	0,0483	0,388	0,353	0,360	0,367	0,0185	0,191	0,181	0,211	0,194	0,0153

APÊNDICE 4 – Resultados da densidade óptica na curva de crescimento da cepa OC 9.7 em MgSO<sub>4</sub>.

MgSO <sub>4</sub>	Controle					0.5 M					1.0 M					1.5 M					2.0 M				
Tempo (horas)	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão
0	0,022	0,021	0,025	0,023	0,0021	0,020	0,015	0,026	0,020	0,0055	0,030	0,035	0,025	0,030	0,0050	0,021	0,024	0,018	0,021	0,003	0,021	0,018	0,024	0,021	0,003
6	0,528	0,592	0,601	0,574	0,0398	0,331	0,344	0,280	0,318	0,0338	0,081	0,114	0,086	0,094	0,0178	0,036	0,032	0,041	0,036	0,005	0,027	0,023	0,023	0,024	0,002
12	1,065	1,014	1,12	1,066	0,0530	0,645	0,772	0,595	0,671	0,0912	0,331	0,274	0,316	0,307	0,0295	0,086	0,091	0,084	0,087	0,004	0,027	0,036	0,035	0,033	0,005
18	1,504	1,349	1,44	1,431	0,0779	1,208	1,147	1,094	1,150	0,0570	0,663	0,636	0,601	0,633	0,0311	0,234	0,244	0,233	0,237	0,006	0,084	0,08	0,075	0,080	0,005
24	1,62	1,544	1,67	1,611	0,0634	1,136	1,248	1,356	1,247	0,1100	0,718	0,803	0,820	0,780	0,0546	0,399	0,459	0,402	0,420	0,034	0,147	0,157	0,13	0,145	0,014
48	1,872	1,764	1,612	1,749	0,1306	1,84	1,894	1,794	1,843	0,0501	1,622	1,584	1,500	1,569	0,0624	0,634	0,769	0,684	0,696	0,068	0,215	0,217	0,238	0,223	0,013

APÊNDICE 5 – Resultados da densidade óptica na curva de crescimento da cepa OC 9.7 em  $Mg(ClO_4)_2$ .

$Mg(ClO_4)_2$	Controle					0.5 M					1.0 M					1.2 M				
Tempo (horas)	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão	OD1	OD2	OD3	Média	Desvio padrão
0	0,027	0,021	0,033	0,027	0,0060	0,037	0,039	0,031	0,036	0,0042	0,034	0,038	0,030	0,034	0,0040	0,020	0,034	0,03	0,028	0,0072
6	0,528	0,592	0,601	0,574	0,0398	0,421	0,335	0,302	0,353	0,0614	0,039	0,041	0,037	0,039	0,0020	0,020	0,028	0,029	0,026	0,0049
12	0,907	0,903	0,947	0,919	0,0243	0,909	0,854	1,005	0,923	0,0764	0,184	0,212	0,103	0,166	0,0566	0,029	0,026	0,02	0,025	0,0045
18	1,326	1,457	1,479	1,421	0,0827	1,504	1,349	1,44	1,431	0,0779	0,322	0,434	0,238	0,331	0,0983	0,033	0,03	0,024	0,029	0,0045
24	1,581	1,677	1,585	1,614	0,0543	1,855	1,788	1,801	1,815	0,0355	0,684	0,684	0,527	0,632	0,0906	0,033	0,035	0,022	0,030	0,0070
48	1,907	1,979	2,045	1,977	0,0690	2,301	2,221	2,221	2,248	0,0462	1,366	1,263	1,222	1,284	0,0742	0,027	0,03	0,024	0,027	0,0030