



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO EN EL ESTADO DE JALISCO, A.C.**



“Bioprospección de arqueas halófilas para la producción de pigmentos carotenoides:
aislamiento, identificación y factores que afectan la producción”

TESIS

**Para obtener el grado de Maestría en Ciencias en el programa de Innovación
Biotecnológica**

Presenta

Ana Sofía Vázquez Madrigal

Directora: Dra. Rosa María Camacho Ruiz, Codirectores: Dra. Alejandra Barbachano
Torres y Dr. Melchor Arellano Plaza

Guadalajara, Jalisco, febrero de 2021

Guadalajara, Jalisco a 12 de marzo de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Ana Sofía Vázquez Madrigal**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “BIOPROSPECCION DE ARQUEAS HALÓFILAS PARA LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES: AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 12 del mes de marzo del año dos mil veintiuno.



Dra. Rosa María Camacho Ruiz

Directora de tesis/tutor académico



Dra. Alejandra Barbachano Torres

Co-directora de tesis/tutora en planta



Dr. Melchor Arellano Plaza

Co-director de tesis/tutor en planta

Agradecimientos

A CIATEJ por brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, el apoyo económico en las estancias de investigación, congreso y al finalizar la beca y por el apoyo de los investigadores del centro.

A CONACyT por el apoyo económico durante los dos años de maestría.

Al Istituto di chimica biomolecolare por haberme recibido en mi estancia internacional.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León por haberme recibido en mi estancia nacional.

Y a la Dra. Rosa María Camacho, quien además de ser mi directora de proyecto, ha sido una gran inspiración y gracias a quien fue todo esto posible.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Resumen..... | 4 |
| 2. Introducción | 5 |
| 3. Antecedentes | 7 |
| Ecología de arqueas halófilas | 7 |
| Carotenoides..... | 8 |
| Bacterioruberina..... | 9 |
| Importancia económica | 10 |
| Producción de pigmentos por microorganismos | 10 |
| 4. Planteamiento del problema | 12 |
| 5. Justificación | 13 |
| 6. Hipótesis | 14 |
| 7. Objetivos..... | 15 |
| General | 15 |
| Particulares | 15 |
| 8. Metodología | 16 |
| Aislamiento..... | 16 |
| Identificación | 17 |
| Identificación molecular..... | 17 |
| Identificación quimio-taxonomica de lípidos..... | 17 |
| Producción de carotenoides a nivel matraz..... | 20 |
| Definición de condiciones óptimas | 20 |
| Enriquecimiento del medio de cultivo con fuentes de carbono..... | 21 |
| Identificación de pigmentos..... | 21 |
| Análisis estadístico..... | 21 |
| 9. Resultados y Discusión..... | 22 |
| Aislamiento e Identificación..... | 22 |
| Identificación quimio-taxonomica de lípidos | 25 |
| Lípidos apolares..... | 25 |
| Lípidos polares..... | 27 |
| Producción de carotenoides..... | 30 |
| Cuantificación de carotenoides | 30 |
| Barrido espectrofotométrico | 32 |

| | |
|--|----|
| Condiciones óptimas | 33 |
| Enriquecimiento del medio de cultivo con fuentes de carbono..... | 36 |
| 10. Conclusión | 39 |
| 11. Perspectivas | 40 |
| 12. Bibliografía..... | 41 |
| 13. Anexo | 47 |

Índice de Imágenes

| | |
|---|----|
| Imagen 1. Estructura de la bacterioruberina..... | 10 |
| Imagen 2. Ruta del mevalonato..... | 12 |
| Imagen 3. Mapa del municipio de Huatabampo, México, del estado de Sonora y de la salina de Santa Bárbara mostrando los 10 puntos de muestreo..... | 17 |
| Imagen 4. Salina de Santa Bárbara | 23 |
| Imagen 5. Cepas seleccionadas..... | 23 |
| Imagen 6. Cepas levemente pigmentadas..... | 24 |
| Imagen 7. Árbol filogenético..... | 25 |
| Imagen 8. Fosfolípidos..... | 29 |
| Imagen 9. Glicolípidos..... | 29 |
| Imagen 10. Aminolípidos..... | 29 |
| Imagen 11. Estándares S-DGD, PG y PGP-Me..... | 30 |
| Imagen 12. Lípidos polares hidrolizados..... | 31 |
| Imagen 13. Biorreactor..... | 34 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fórmula carotenoides totales | 21 |
| Figura 2. Resultados HPLC/MS de la cepa M3..... | 27 |
| Figura 3. Espectro H-RMN..... | 28 |
| Figura 4. Densidad óptica..... | 32 |
| Figura 5. Carotenoides totales..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Figura 6. Barrido espectrofotométrico..... | 33 |
| Figura 7. Crecimiento de <i>Haloarcula sp. M1</i> en diferentes concentraciones de NaCl.... | 34 |
| Figura 8. Crecimiento de <i>Halolamina sp. M3</i> en diferentes concentraciones de NaCl... | 34 |
| Figura 9. Crecimiento de <i>Halorubrum sp. M5</i> en diferentes concentraciones de NaCl.. | 35 |
| Figura 10. Crecimiento con fuentes de Carbono..... | 37 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Iniciadores..... | 18 |
| Tabla 2. Identificación molecular..... | 24 |
| Tabla 3. Quinonas de las 8 cepas..... | 26 |
| Tabla 4. Efecto del pH en el crecimiento de las cepas..... | 35 |
| Tabla 5. Efecto de la temperatura en el crecimiento..... | 36 |

1. Resumen

Las arqueas halófilas son microorganismos adaptados a habitar ambientes extremos con concentraciones altas de sal. Éstas producen bacterioruberina como pigmento principal, un carotenoide de 50 Carbonos con función antioxidante y reductora de radicales libres. Los estudios que relacionen el efecto de fuentes de Carbono en la producción de bacterioruberina son escasos y enfocados principalmente al género *Halobacterium*. Se realizó un aislamiento de arqueas de la salina de Santa Bárbara, Sonora. Se obtuvieron en total 17 cepas de las cuales se seleccionaron 8 para realizar identificación molecular y quimiotaxonómica de lípidos, obteniendo 3 géneros: *Haloarcula*, *Halolamina* y *Halorubrum*. Todas las cepas son productoras de carotenoides, (bacterioruberina principalmente), quinonas y fosfolípidos PG y PGP-Me. El glicolípido S-DGD se encontró solamente en *Halolamina* sp. M3. Se evaluó el efecto de glucosa, ácido glutámico y ácido succínico en la producción de pigmentos de una cepa de cada género. La producción de carotenoides mejoró significativamente con glucosa en *Haloarcula* sp. M1 y *Halorubrum* sp. M5 mientras que el ácido glutámico y succínico no tuvieron efecto significativo en ninguna de las cepas. Este trabajo evidencia por primera vez la presencia de haloarqueas en la salina de Santa Bárbara y aunque el metabolismo de las haloarqueas no ha sido completamente elucidado aún, puede llegar a variar entre géneros.

2. Introducción

Los organismos halófilos son especies adaptadas a habitar ambientes hipersalinos, desde el 1% de NaCl hasta el punto de saturación. La capacidad de tolerar estas concentraciones de sal tan diversas se debe a la necesidad de supervivencia dentro de los ambientes salinos tan cambiantes (Souza, Altekar, & D'Souza, 1997). Las arqueas halófilas son organismos principalmente aerobios, gram-negativos, quimioorganótrofos. Estos organismos representan un modelo de estudio para entender la vida, debido a que se encuentran en lugares que se creían inhabitables (Dassarma, 2006).

La salina de Santa Bárbara es un humedal salado con NaCl como sal principal y conexión permanente con el mar, localizado en el municipio de Huatabampo en el estado de Sonora, México. En él se encuentra gran diversidad de plantas, aves y mamíferos (Villa Andrade, 2012). La evidencia de microorganismos en esta zona incluye bacterias halófilas (J. C. C. Corral et al., 2018) y arqueas metanógenas (Vigneron et al., 2015), sin embargo, hasta este trabajo no se conocían trabajos que documenten la presencia de arqueas halófilas.

La familia *Halobacteriaceae* es la representante principal de los halófilos extremos. La mayoría de las especies dentro de esta familia comparten la característica de tener un color rojo-anaranjado debido a la cantidad de carotenoides (Children, 2001).

Los carotenoides son compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y reductora de radicales libres (Mandelli, Miranda, Rodrigues, & Mercadante, 2012a) con gran impacto económico, especialmente en las empresas que buscan reemplazar productos altamente contaminantes por otros naturales o amigables para el ambiente. Los carotenoides producidos por arqueas se sintetizan por medio de la ruta del mevalonato partiendo del compuesto Acetil Coenzima-A, el metabolismo completo de estos organismos no ha sido completamente elucidado y puede variar incluso dentro de especies dentro del mismo género (Sabet, Diallo, Hays, Jung, & Dillon, 2009). Algunas investigaciones han logrado incrementar la producción de carotenoides modificando condiciones de cultivo como luz, temperatura y agitación, sin embargo, son escasos los estudios que han buscado incrementarlo modificando la fuente de Carbono.

El pigmento más abundante dentro del grupo de las arqueas halófilas es bacterioruberina y sus derivados. La bacterioruberina es un carotenoide de 50 Carbonos con 13 enlaces dobles conjugados y cuatro grupos hidroxilo que le confiere función protectora contra la radiación y estrés oxidativo (Fontana, Maria, & Bonfim, 2016). También incrementa la rigidez de la membrana y aumenta la permeabilidad para el oxígeno y otros compuestos para ayudar a soportar las condiciones extremas de salinidad (Fang, Ku, Lee, & Su, 2010).

La alta cantidad de dobles enlaces de la bacterioruberina le proporciona mayor capacidad antioxidante con respecto a otros pigmentos como el β -caroteno, astaxantina y otros carotenoides (Yatsunami et al., 2014, Zalazar, Miró, & Andreina Cesari, 2018). Por otro lado, la alta concentración de sal requerida en el medio de cultivo y su tolerancia a un alto espectro de temperaturas de las arqueas halófilas suscita su fácil cultivo, aumentando aún más el potencial industrial para la producción de bacterioruberina a partir de éstos microorganismos.

La identificación molecular del gen 16s es comúnmente utilizada para los organismos procariotas (incluyendo a las arqueas halófilas), sin embargo, debido a su naturaleza altamente conservativa, no es suficiente para diferenciar entre especies y puede llegar a generar confusión, es por ello que se requiere el uso de otras técnicas de identificación como hibridación DNA-DNA, análisis de secuencias multilocus o caracterización de lípidos de membrana (Haba, Corral, & Sánchez-porro, 2018).

3. Antecedentes

Ecología de arqueas halófilas

Los ambientes hipersalinos se encuentran distribuidos alrededor de todo el mundo. Éstos se forman, entre otras cosas, por la evaporación del agua de mar y aunque son similares en sus propiedades, difieren en su composición iónica, en especial en la concentración de magnesio y calcio. La cantidad de organismos en ambientes hipersalinos puede ser tan alta como en cualquier otro ambiente acuático, la diferencia radica en la baja diversidad de especies debido a que el metabolismo de muy pocos organismos tolera estas altas concentraciones salinas (Oren, 1994).

La mayoría de los organismos halófilos crecen alrededor de 35 a 40°C, requieren para su crecimiento aminoácidos y proteínas en su mayoría y carbohidratos en muy pocas cantidades (Larsen, 1986). Los halófilos también contienen enzimas que trabajan con las altas concentraciones de sal, cuando esta cantidad baja, las enzimas sufren desnaturalización (Larsen, 1946). La característica más peculiar de las arqueas, con la que difieren del resto de los organismos se sitúa en la membrana, que está compuesta por cadenas de lípidos isoprenoides unidos a un glicerol por medio de enlaces éter que la hacen mucho más resistentes para poder tolerar grandes rangos de temperatura, pH y estrés oxidativo (Kellermann, Yoshinaga, Valentine, Wörmer, & Valentine, 2016).

En los ambientes extremadamente salinos el oxígeno es escaso, por ello los microorganismos han desarrollado capacidades para desplazarse a lugares con niveles más altos de oxígeno como la superficie empleando estructuras como flagelos o vesículas de gas, que les permiten flotar hacia la superficie, donde el oxígeno es más abundante (Oren, 1994).

Una estrategia que utilizan las halófilas para tolerar altas cantidades de sal es la de acumular iones de K^+ en el citoplasma para adaptarse al gradiente de concentración de sales del medio por medio de un sistema dependiente de energía, conforme van llegando a la fase estacionaria, van reemplazando los iones K^+ por Na^+ . (Thombre, Shinde, Oke, Dhar, & Shouche, 2016). Otra estrategia es el hecho de contener aminoácidos cargados electronegativamente en la parte externa de sus proteínas para su fácil solvatación

(Reyes-Martínez & Zavaleta, 2005). La capacidad de tolerar concentraciones de sal tan diversas se debe a la necesidad de supervivencia dentro de los ambientes salinos tan variables (Souza et al., 1997).

Carotenoides

Los pigmentos carotenoides son compuestos lipídicos de naturaleza hidrofóbica formados por un esqueleto de 40 a 50 átomos de Carbono. Estas moléculas pueden contener diversas estructuras dependiendo de sus dobles enlaces conjugados (Kirti, Amita, Priti, Mukesh Kumar, & Jyoti, 2014), peso molecular, terminales cíclicos o diferentes grupos funcionales oxigenados. (Naziri, Hamidi, Hassanzadeh, Tarhriz, Zanjani, et al., 2014a) El gran número de dobles enlaces les confiere propiedades antioxidantes y reductoras de radicales libres de Oxígeno y Nitrógeno (Mandelli, Miranda, Rodrigues, & Mercadante, 2012b). Los carotenoides son un grupo de pigmentos sumamente importante, contando con más de 750 estructuras diferentes, y siendo los segundos más abundantes en la tierra (Britton, 2004) y solamente pueden ser sintetizados por microorganismos, hongos y plantas. Los animales no somos capaces de sintetizarlos, por ello los debemos adquirir a través de la dieta para utilizarlos como precursor para producir retinol (Rodrigo-Baños, Garbayo, Vílchez, Bonete, & Martínez-Espinosa, 2015). Otra manera de producirlos es sintetizarlos artificialmente, aunque este proceso es altamente contaminante por la cantidad de químicos tóxicos no biodegradables que son arrojados al ambiente, además tienen efectos carcinógenos, especialmente contra las personas involucradas en su producción (Kumar, Shankar Vishwakarma, Singh, & Kumar, n.d.). Los pigmentos naturales son preferidos debido a su bajo impacto ambiental y a la creciente tendencia de utilizar productos de origen natural.

Se pueden utilizar varias técnicas para realizar caracterización de estos pigmentos como espectrofotometría, cromatografía en capa fina y/o líquida y resonancia magnética nuclear. Los carotenoides siguen la ley de Beer-Lambert donde una mayor concentración, exhibe mayor absorbancia (Meléndez-Martínez, Britton, Vicario, & Heredia, 2006), la cantidad de enlaces conjugados es proporcional a la longitud de onda, mientras mayor cantidad de enlaces, mayor será la intensidad del color rojo (Marshall et al., 2007). La mayoría de los carotenoides absorben en tres longitudes de onda diferentes, dando lugar a un espectro con tres picos (Rodríguez-Amaya & Kimura, n.d.). Los carotenoides más

conocidos y con mayor importancia económica son β -caroteno, astaxantina, cantaxantina y luteína (Potential, 2015)

Bacterioruberina

El pigmento más abundante dentro del grupo de las arqueas halófilas es la bacterioruberina con sus derivados (monoanhidrobacterioruberina, bisanhidrobacterioruberina y trisanhidrobacterioruberina) y un gran número de isómeros *trans* y *cis* como 5-*cis*-bacterioruberina, 9-*cis*-bacterioruberina, 13-*cis*-bacterioruberina, 15-*cis*-bacterioruberina, y 5-*cis*,90-*cis*-bacterioruberina (Calegari-Santos, Diogo, Fontana, & Bonfim, 2016a). Estos son los responsables del color rojizo-rosado encontrado en los cuerpos de agua hipersalinos (de la Vega, Sayago, Ariza, Barneto, & León, 2016).

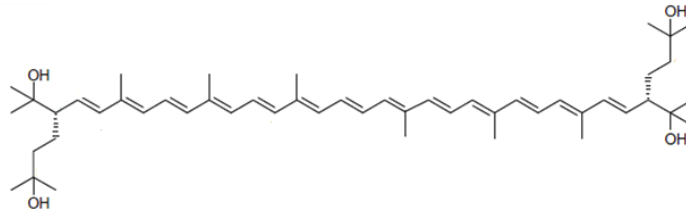


Imagen 1. Estructura de la bacterioruberina

La bacterioruberina (Imagen 1) es un carotenoide de 50 Carbonos con 13 enlaces dobles conjugados y cuatro grupos hidroxilo. El alto número de dobles enlaces y grupos hidroxilo le proporciona mayor capacidad antioxidante en comparación con otros carotenoides como β -caroteno, luteína y astaxantina (Yachai, 2009). La bacterioruberina es un pigmento que realiza varias funciones en las arqueas halófilas, principalmente para proteger al ADN contra la radiación (Fontana et al., 2016) y estrés oxidativo. También incrementa la rigidez de la membrana y aumenta su permeabilidad, ayudando a poder soportar las condiciones extremas de temperatura y salinidad (Fang et al., 2010). La síntesis de este pigmento se lleva a cabo por medio de dos precursores, pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) a través de dos rutas metabólicas. La ruta metileritritol fosfato (MEP) conocida como la ruta del no-mevalonato (para algunas bacterias y cloroplastos) y la ruta del mevalonato en el caso de las arqueas, bacterias y algunas eucariotas, (Matsumi, Atomi, Driessen, & van der Oost, 2011).

Importancia económica

Los pigmentos carotenoides son ampliamente utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y textil. El mercado mundial para los carotenoides fue de \$1.44 billones USD en 2019 y está proyectado un crecimiento de 3.4% anual, de los cuales el 90% es abarcado por el β -caroteno (Fortune Business Insights, 2019, Berman et al., 2015).

Producción de pigmentos por microorganismos

Las arqueas halófilas están comenzando a ser utilizadas para la producción de pigmentos carotenoides. Las ventajas que presentan son su gran posibilidad de mejorar la producción de estos pigmentos por medio de manipulación genética o modificando las condiciones de su cultivo, la fácil extracción de los pigmentos y el hecho de tener concentraciones tan altas de sal que provoca no requerir condiciones asépticas.

Existen trabajos que demuestran la presencia de pigmentos en haloarqueas, en particular dentro del género *Halorubrum*, el cual contiene bacterioruberina como pigmento principal. Naziri cuantificó 11.28 mg/L de carotenoides totales en una cepa de este género aislada del lago Urmia, Irán (Naziri, Hamidi, Hassanzadeh, Tarhriz, Zanjani, et al., 2014b).

Los intentos por incrementar la cantidad de carotenoides producidos cultivando arqueas halófilas son escasos, y la mayoría lo han buscado cambiando las condiciones de cultivo. Por ejemplo, de la Vega muestra evidencia de que es posible optimizar condiciones de cultivo de cepas de *Halorubrum*, modificando agitación, concentración de sal, luz, radiación UV y temperatura para incrementar la producción de pigmento, logrando alcanzar 25 mg/L de carotenoides totales (de la Vega et al., 2016). Hasta ahora son pocos los que lo han intentado modificando la fuente de Carbono.(Gochnauer, Kushwaha, Kates, & Kushner, 1972^a, Fontana et al., 2016)

La ruta mevalonato (Imagen 2) recibe aproximadamente 80% del carbono de acetyl coA producido a partir del medio de cultivo (Oberwinkler, 2011) es decir, la producción de acetyl-CoA es proporcional a la actividad de la ruta, y dado que los carotenoides se sintetizan por esta ruta (junto con el resto de isoprenoides), se aumenta la posibilidad de producción de pigmentos. Algunas arqueas halófilas (como *Halobacterium*) contienen enzimas que permiten a algunos aminoácidos como ácido glutámico, ser incorporadas

directamente al ciclo de Krebs y así, obtener mayor disponibilidad de este compuesto (Ng et al., 2000).

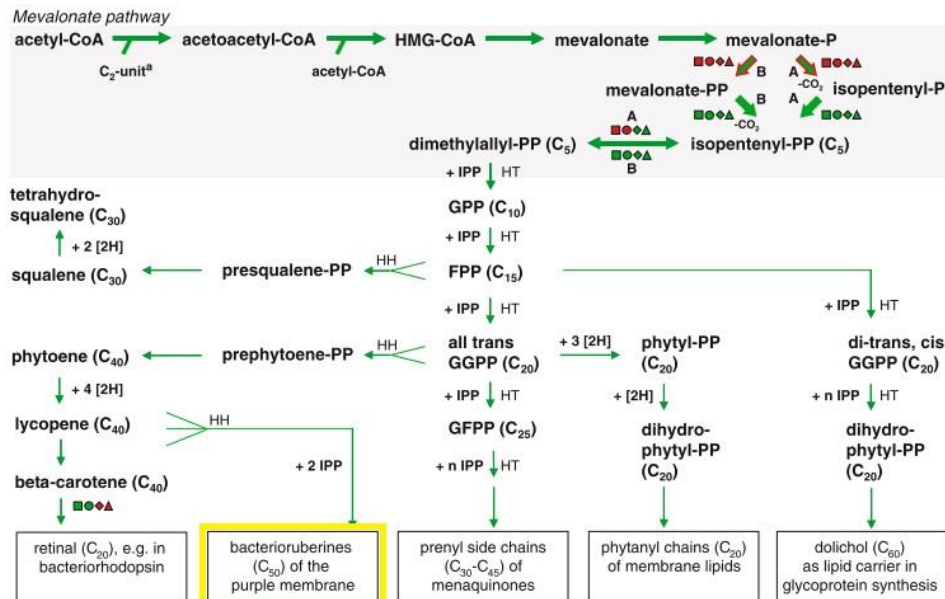


Imagen 2. Ruta del mevalonato. Ruta de síntesis de los carotenoides en arqueas halófilas.

Asimismo algunas arqueas halófilas utilizan una versión modificada de la ruta Entner-Doudoroff (ED) para la conversión de glucosa en piruvato, posteriormente un grupo carboxilo es removido y Coenzima A se adjunta, dando lugar a Acetil-CoA (Bräsen, Esser, Rauch, & Siebers, 2014). Gochnauer utilizó diversas concentraciones de glucosa en *Halobacterium* logrando estimular con 2% la producción de pigmentos (Gochnauer et al., 1972a).

Xanthophyllomyces denrorhous es un hongo productor de carotenoides, Martínez-Moya adicionó ácido succínico al medio de cultivo y éste entró directamente al ciclo de Krebs, logrando producir mayor cantidad de carotenoides (Martínez-Moya, Niehaus, Alcaíno, Baeza, & Cifuentes, 2015).

4. Planteamiento del problema

La información sobre la presencia de microorganismos halófilos en México es escasa y hasta ahora no se han encontrado trabajos que documenten la presencia de éstos en la zona de la salinera de Santa Bárbara, Sonora.

La filogenia, metabolismo y papel biológico de las arqueas halófilas es un campo de reciente exploración y constantes hallazgos. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en taxonomía, fisiología y caracterización de pigmentos.

La bioprospección inmediata de las arqueas halófilas es la producción de bacterioruberina por su potencial biotecnológico debido a su origen natural y capacidad antioxidante, a pesar de ello, no ha sido aprovechada con fines industriales, por ello es preciso buscar alternativas para mejorar su producción, identificando la influencia que tienen algunos factores que no se hayan estudiado previamente para la producción de pigmentos.

5. Justificación

Es importante conocer la diversidad de microorganismos en diferentes ambientes ya que ayuda a explicar la función e importancia que tienen los organismos para la estabilidad de los ecosistemas. Este conocimiento puede ayudar a promover la conservación de ecosistemas como el de Santa Bárbara.

También se busca elucidar la influencia que tienen algunos factores en la producción de pigmentos carotenoides para su posible aplicación en la industria.

6. Hipótesis

La adición de algunas fuentes de Carbono como ácido glutámico, ácido succínico y glucosa influye en la síntesis de pigmentos carotenoides producidos por arqueas halófilas aisladas de la salina de Santa Bárbara.

7. Objetivos

General

Efectuar una bioprospección de arqueas halófilas aisladas de la salina de Sta. Bárbara, Sonora en función a los pigmentos carotenoides que producen.

Particulares

- Generar una colección de haloarqueas aisladas de la Salina de Santa Bárbara, Sonora.
- Identificar de manera molecular y quimiotaxonómica por medio del gen 16s y caracterización lipídica a las haloarqueas aisladas.
- Seleccionar tres cepas productoras de pigmentos y establecer condiciones óptimas de crecimiento (Temperatura, pH y salinidad).
- Evaluar el efecto de ácido glutámico, ácido succínico y glucosa en la producción de pigmentos carotenoides en las tres cepas seleccionadas.

8. Metodología

Aislamiento

Se tomaron 13 muestras de costra de sal y lodo salino a 20 cm de profundidad en 10 puntos diferentes dentro de un área de 8.2 km² en la salina en Santa Bárbara, Sonora (Imagen 3). Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Se pesó 1 g de suelo para mezclar con 9 mL de solución salina al 20% por cada muestra, se agitaron suavemente por 10 min y se midió el pH. Se hicieron diluciones 1:10 y fueron sembradas en cajas Petri con medio sólido ATCC2185 (20 g/L MgSO₄·7H₂O, 3 g/L citrato de sodio, 2 g/L KCl, 5 g/L triptona, 3 g/L extracto de levadura, 100 µL/L elementos traza, 4 M NaCl) se ajustó a pH 8 y se incubaron a dos temperaturas diferentes, 37 y 50°C (debido a los cambios drásticos de temperatura del lugar) por 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación se aislaron las cepas con morfología diferente. Las cepas aisladas se conservaron a -80°C en el mismo medio líquido adicionando 25% de medio GSW (80 mL glicerol, 20 mL agua de mar artificial, 200 µL CaCl₂) estéril.

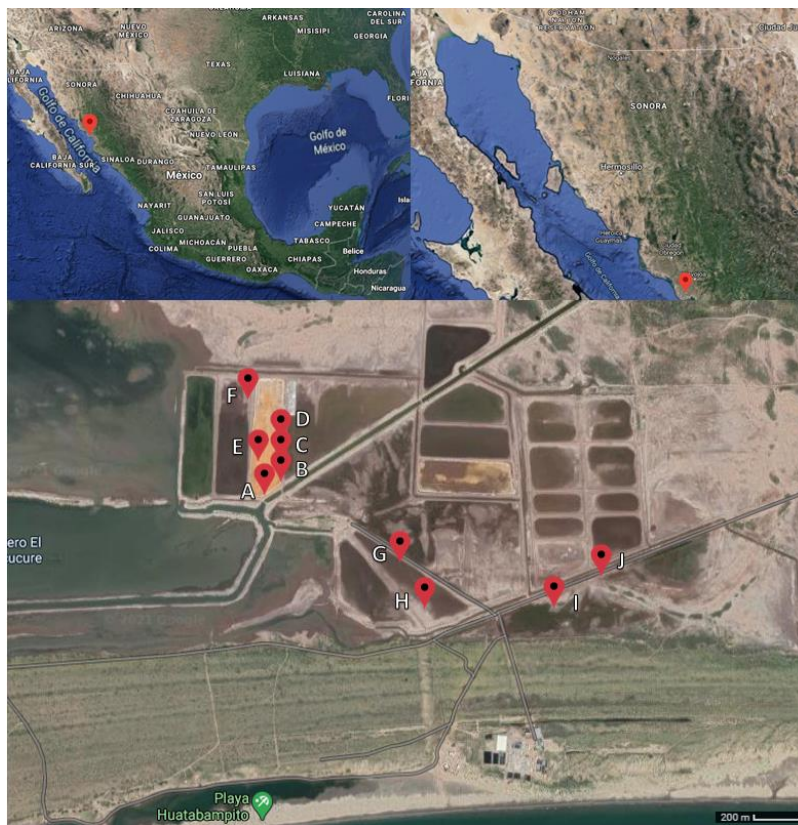


Imagen 3. Mapa del municipio de Huatabampo, México, del estado de Sonora y de la salina de Santa Bárbara mostrando los 10 puntos de muestreo. A.- N26°42.421'W109°38.510', B.- N26°42.444'W109°38.475', C.- N26°42.469'W109°38.468', D.- N26°42.512'W109°38.469', E.- N26°42.498'W109°38.530', F.- N26°42.619'W109°38.554', G.- N26°42.269'W109°38.176', H.- N26°42.175'W109°38.119', I.- N26°42.167'W109°37.800', J.- N26°42.240'W109°37.677'. Imagen satelital

Identificación

Identificación molecular

Para realizar la identificación molecular a nivel género, se realizó una PCR de colonia del gen 16s con los iniciadores PARCH340F y ARCH915R (O'Connell et al., 2003) los fragmentos amplificados fueron secuenciados en ambos extremos y se generaron secuencias consenso con el software CLC Main Workbench 8. Se realizó una búsqueda de nucleótidos (BLASTn) comparando con secuencias de la base de datos 16S de GenBank:

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Para la identificación molecular a nivel especie, se realizó una extracción de ADN genómico de las células con GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit Protocol (Sigma-Aldrich) seguido por una PCR del gen 16s con los iniciadores D30 y D56 (Arahal, Dewhirst, Paster, Volcani, & Ventosa, 1996) y polimerasa Platinum Taq (Thermofisher) . Con el fin de mantener el fragmento íntegro de ARN para una secuenciación más precisa, se clonaron los productos de PCR utilizando CloneJET PCR Cloning Kit (Thermofisher) y se transformaron en células *E. Coli* calcio-competentes. Posteriormente se extrajo el plásmido y se corrió otra PCR para asegurar la presencia del fragmento.

Tabla 1.- Iniciadores utilizados para la identificación de arqueas a nivel género (primeros dos) y especie (últimos dos).

| | |
|------------------|-----------------------------|
| PARCH340F | 5'-CCCTACGGGGYGCASCAG-3' |
| ARCH915R | 3'-GTGCTCCCCCGCCAAATTCCT-5' |
| D30 | 5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3' |
| D56 | 3'-GYTACCTTGTTACGACTT-5' |

Las secuencias obtenidas del gen 16s se utilizaron para construir un árbol filogenético con el método de Maximum Likelihood en el modelo evolutivo MEGA y T92 + 1 con 1000 bootstraps.

Identificación quimio-taxonomica de lípidos

Lípidos apolares

Se tomaron 2.5 g de liofilizado de células y se colocaron en frascos sellados con 50 mL de *n*-hexano en agitación por 24 h para la extracción de quinonas. Se pasó a un matraz redondo pasando por papel filtro y se evaporó en rotavapor 10 min a 40°C. Una vez evaporado, se resuspendió en 500 µL de metanol, se cargó en una TLC preparativa de sílica 20X10 y se colocó en cámara con fase móvil hexano/acetato de etilo (96:4, v/v). La TLC se reveló con luz UV. Las bandas presentes se rasparon, se resuspendieron en 2 mL de cloroformo y pasaron a un frasco nuevo a través de una pipeta Pasteur con algodón, por último, se evaporaron con flujo de Nitrógeno y almacenaron a -20°C.

Las muestras se analizaron en cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (HPLC/MS) en columna RP-18 eluidas en *n*-hexano/acetato de etilo (99:1, v/v) con flujo de 1.0 ml min⁻¹ acoplado a ESI/MS) y con espectro H-NMR Bruker DPX-300 de 300MHz del Instituto de química biomolecular de CNR en Pozzuoli, Italia.

Lípidos polares

Para la extracción de lípidos polares se tomó la biomasa posterior a la extracción de quinonas; se dejó secar y se colocó en frascos sellados con 50 mL de solución cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v) en agitación por 24 h. Se pasó a un matraz redondo a través de papel filtro y se evaporó en rotavapor por 10 min a 40°C. Se repitió dos veces este proceso con el fin de incrementar la obtención de lípidos polares. Una vez evaporados, se resuspendieron en 3 mL de la misma solución y se pasaron a un frasco a través de una pipeta Pasteur con algodón para eliminar el exceso de sal. Se evaporaron en flujo de Nitrógeno y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se resuspendieron en 2 mL de solución cloroformo/metanol/agua (65: 25: 4, v/v) y se realizó una TLC analítica de 20X20 con los lípidos extraídos de las 8 cepas. Para revelar la TLC se roció con Ce(SO₄)₂ 0.1% y calentó a 160°C para apreciar los lípidos polares. En el caso de las muestras que presentaron mala migración, se volvieron a pasar por pipeta Pasteur para la remoción de sales. Se repitió 3 veces el proceso de la TLC, rociando una con reactivo Dittmer-Lester a 100°C para fosfolípidos, otra con α-Naftol a 160°C para glicolípidos y otra con Ninhidrina a 160°C para aminolípidos.

Por separado se cargó una TLC de 5x10 por cada una de las muestras, utilizando la misma fase móvil. Se reveló la mitad de cada una con reactivo Dittmer-Lester y la mitad con α -Naftol para detectar la presencia de glico-fosfolípidos.

Para la hidrólisis de lípidos polares, se tomó la mitad del contenido de los frascos y se evaporó con flujo de Nitrógeno. Se agregaron 4 mL de solución metanol/HCl (9:1, v/v) y se dejó 12 h a 75°C. Se evaporó con Nitrógeno y se lavó dos veces con 2 mL de metanol. Se resuspendió en 1 mL de cloroformo/metanol (1:1, v/v) y se cargaron todas las muestras en una TLC 20X20 con fase móvil hexano/acetato de etilo (75:25 v/v) y se reveló con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 0.1% a 160°C. Una vez confirmada la presencia de todas las bandas, se cargó el remanente de cada una de las muestras en TLC 10X20 individuales y se rasparon cada una de las bandas. El raspado se pasó a través de una pipeta Pasteur con algodón con 2 mL de cloroformo/metanol (1: 1, v/v) y se evaporó con Nitrógeno. Se resuspendieron en 1 mL de la misma solución y se cargaron todos, junto con estándares de 20 C y 40 C en una TLC 20X20 con la misma fase móvil.

El restante del contenido de los lípidos polares se usó para comparar con estándares glico y fosfolipídicos:

S-DGD – diglicosil diftatanil éter sulfatado

PG - 2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicero-1-fosfo-3'-*sn*-glicerol

PGP-Me - 2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicero-1-fosfo-(3'-*sn*-glicero-1'-metil fosfato)

Y para determinar el tipo de fosfolípidos mediante TLC de dos dimensiones. De cada extracto de cepa, se cargó una TLC 10X20 con la muestra, una con el estándar y otra con el estándar más la muestra. Los estándares utilizados fueron:

P4013 – 1, 2 Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato de sodio

21979 – Sal disódica de cardiolipina del corazón bovino

79406 - 3-*sn*-fosfatidil-L-serina de cerebro bovino

P4329 - 1, 2 Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

79403 – Sal de sodio fosfatidilinositol

85615 - Esfingomielina

50445 – Sal de sodio 1-(3-*sn*-fosfatidil)-*rac*-glicerol

42566 - 2, 3-Dipalmitoil-*sn*-glicero-1-fosfocolina

P3275 - 1, 2-Dipalmitoil-*rac*-glicero-3-fosfoetanolamina

P7769 - 1,2-Diacil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina

Producción de carotenoides a nivel matraz

Se inocularon frascos de 250 mL con 80 mL de medio de cultivo líquido ATCC2185 en condiciones del aislamiento (pH correspondiente con el lugar de muestreo), pero en agitación a 200 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL cada 24 h durante 6 días, se midió densidad óptica a 620 nm y pigmentos carotenoides totales. La extracción del pigmento se llevó a cabo con el método modificado de Naziri (Naziri, Hamidi, Hassanzadeh, Tarhriz, & Zanjani, 2014) utilizando acetona/metanol 7:3 y evaporando en SpeedVac por 45 min. La cuantificación de carotenoides totales se calculó con la ley de Beer-Lambert como lo describe Britton (Britton, 1985), leyendo absorbancia a 490 nm y utilizando 2660 como el valor correspondiente al coeficiente de absorción de la bacterioruberina en metanol.

$$C\left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{(A_{490})(V1)(10^5)}{(2660)(0.625)(V2)}$$

Figura 1.- Fórmula carotenoides totales. A= absorbancia, V1= volumen resuspendido. 0.625= trayecto óptico de microplaca, V2=

Para identificar el pigmento principal, se evaporó el solvente y se resuspendió en acetona, se realizó un barrido espectrofotométrico de 400 a 600 nm.

Crecimiento en reactor

La cepa mayor productora de carotenoides fue elegida para probarla en biorreactor. Se inoculó con 10% un reactor con 2 L de medio de cultivo ATCC2185 con pH 8 a 650 rpm, flujo de aire de 1 vvm y luz permanente. Se midió crecimiento con densidad óptica y carotenoides totales.

Definición de condiciones óptimas

Se seleccionó una cepa de cada género y en el caso de *Halorubrum*, la mayor productora de carotenoides para definir condiciones óptimas y posteriormente enriquecerlas con fuentes de Carbono. Se inocularon matraces de 125 mL con 40 mL de medio de cultivo líquido a 200 rpm con molaridad 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 M NaCl, se

determinó la DO (densidad óptica) cada 12 h. Fue seleccionada la de mayor DO. Para determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura se realizó el mismo procedimiento, pero a punto final y con valores de pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y temperatura 20, 30, 37, 50, 60 y 70°C.

Enriquecimiento del medio de cultivo con fuentes de carbono

Por triplicado, se inocularon matraces de 250 mL con 80 mL de medio de cultivo líquido ATCC2185 en sus respectivas condiciones óptimas enriquecidos con tres diferentes fuentes de carbono: 3.5 g/L de ácido succínico, 3 g/L de ácido glutámico o 10 g/L y 25 g/L de glucosa a 200 rpm. La concentración de ácido glutámico se tomó con base al trabajo de Yokooji con *Thermococcus kodakarensis* (Yokooji, Sato, Fujiwar, Imanak, & Atomi, 2013), el ácido succínico se escogió por el efecto positivo que tuvo en *Xanthophyllomyces dendrorhous* en el trabajo de Martínez-Moya (Martinez-Moya et al., 2015), la concentración utilizada fue seleccionada con base a un análisis estadístico (ANOVA) realizado por Aragón (Aragón, 2019) y las concentraciones de glucosa se seleccionaron con base al trabajo de Gochnauer en *Halobacterium* (Gochnauer et al., 1972a).

Se realizó una cinética por 120 horas tomando muestra aproximadamente cada 20 hrs para medir crecimiento con DO₆₂₀ y carotenoides totales.

Identificación de pigmentos

Para identificar el pigmento principal, se realizó una extracción de pigmentos a todas las cepas, posteriormente se resuspendió en acetona (para así poder compararlo con la bibliografía) y se realizó un barrido espectrofotométrico de 400 a 600 nm en un espectrofotómetro Biotek Eon Microplate Spectrophotometer (Agilent, CA, EU).

Análisis estadístico

El análisis estadístico para probar la significancia de las fuentes de Carbono en la producción de carotenoides se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

9. Resultados y Discusión

Aislamiento e Identificación

La salina de Santa Bárbara está localizada en el municipio de Huatabampo, Sonora a 10 m sobre el nivel del mar (Imagen 4), pertenece a la provincia fisiográfica costera del pacífico. Ésta región es un relieve plano inundado paralelo a la costa cubierto con sedimento de aluvión proveniente de la Sierra Madre Occidental (Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático, 2007). El clima es seco con temperatura promedio de 23.4°C que va de 0 a 49°C en invierno y verano respectivamente. La precipitación anual es de menos de 300 mm, la vegetación está compuesta principalmente de plantas halófilas y xerófilas (Ortiz, 2008) y la fauna por una variedad de aves endémicas, reptiles, anfibios, felinos y tortugas (Castillo, 2021).



Imagen 4.- Salina de Santa Bárbara. Fotografía de uno de los puntos donde se realizó el muestreo dentro de la salina.

En total se aislaron 17 cepas, se fotografió, crioconservó en glicerol y asignó un código a cada una de ellas. Se seleccionaron las 8 cepas más pigmentadas para identificar (Imagen 5), las 9 cepas restantes (Imagen 6) se conservaron para futuros proyectos.

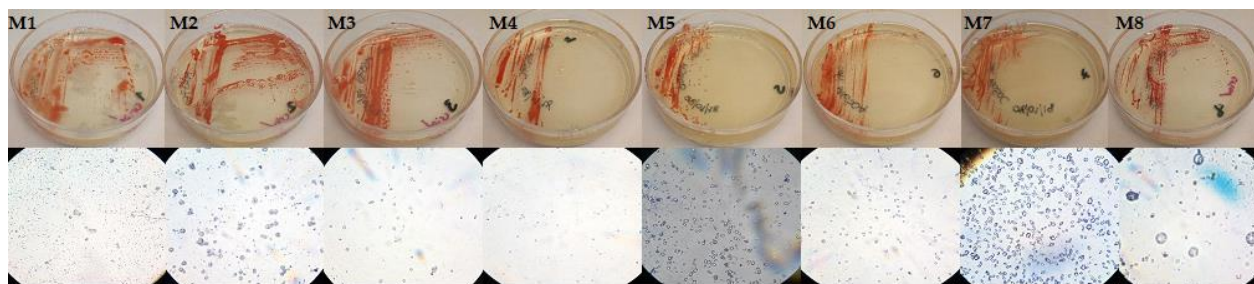


Imagen 5.- Cepas seleccionadas. Ocho arqueas elegidas por su pigmentación y crecidas en medio de cultivo ATCC2185

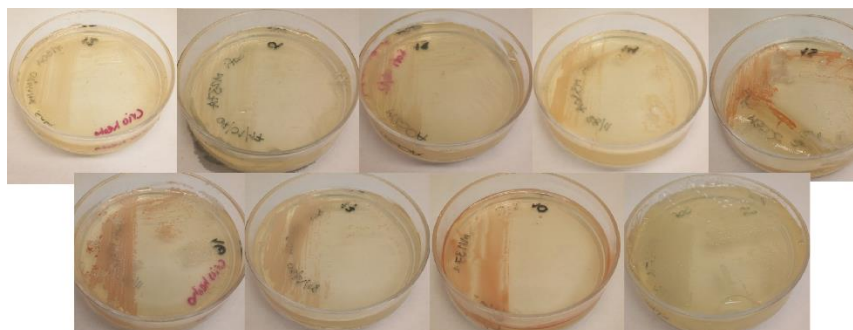


Imagen 6.- Cepas levemente pigmentadas. El resto de las 17 cepas aisladas de salina Santa Bárbara, las cuales fueron crio-conservadas, pero no fueron seleccionadas para identificar.

El resultado de la identificación de las cepas se muestra en la tabla 2, algunas de las cepas coincidieron con más de una especie de la base de datos. La secuencia consenso de cada una de las cepas se encuentra en el Anexo 1.

Tabla 2.- Identificación molecular de arqueas aisladas de la salinera de Santa Bárbara.

| Código de cepa | Especies más cercanas en la base de datos GenBank | Número de acceso | Porcentaje de similitud |
|----------------|---|------------------|-------------------------|
| M1 | <i>Haloarcula</i> sp. M1 | MW567147 | 100% |
| CA_13B53 | <i>Haloarcula salaria</i> | LN649977.1 | 99.4% |
| M2 | <i>Halorubrum</i> sp. M2 | MW567148 | 100% |
| Fb21 | <i>Halorubrum ezzemoulense</i> | CP034940.1 | 99.3% |
| M3 | <i>Halolamina</i> sp. M3 | MW567149 | 100% |
| UAH-SP14 | <i>Haloarchaeon UA-SP14</i> | HM031393.1 | 99.46% |
| M4 | <i>Halorubrum</i> sp. M4 | MW567151 | 100% |
| SD683 | <i>Halorubrum</i> sp. SD683 | LT578362.2 | 99.85% |
| M5 | <i>Halorubrum</i> sp. M5 | MW567150 | 100% |
| Fb21 | <i>Halorubrum ezzemoulense</i> | CP034940.1 | 93.3% |
| M6 | <i>Halorubrum</i> sp. M6 | MW567152 | 100% |
| Fb21 | <i>Halorubrum ezzemoulense</i> | CP034940.1 | 99.85% |
| M7 | <i>Halorubrum</i> sp. M7 | MW56567153 | 100% |
| Fb21 | <i>Halorubrum ezzemoulense</i> | CP034940.1 | 100% |
| M8 | <i>Halorubrum</i> sp. M8 | MW567154 | 100% |
| E302-1 | <i>Halorubrum</i> sp. E302-1 | JN196504.1 | 99.17% |

Los géneros identificados fueron *Haloarcula* (cepa M1), *Halolamina* (cepa M3) y *Halorubrum* (M2, M4, M5, M6, M7, M8 y M9). Algunas de las especies identificadas, a pesar de tener el gen 16s casi completamente secuenciado, no coinciden al 100% con una única especie o coinciden con más de una. El árbol filogenético muestra que cada

aislado podría representar diferentes especies. Por ello en este trabajo las llamamos por el género + sp. + el código de cepa.

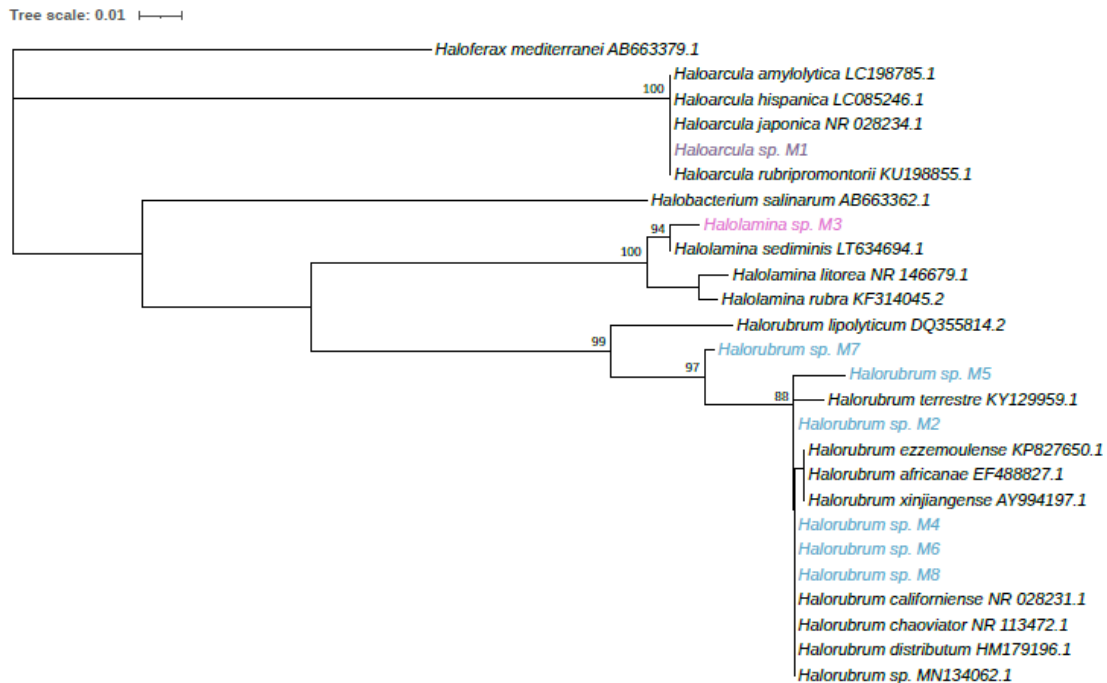


Imagen 7.- Árbol filogenético con el método de Maximum Likelihood basado en secuencias 16s rRNA mostrando la relación entre las cepas aisladas y los taxones relacionados. *Haloferax mediterranei* fue usado como grupo externo.

Halorubrum es el género más grande dentro de la clase *Halobacteria* (Oren, 2018), pertenece a la familia *Halorubraceae* y al orden *Haloferacales*, las especies son pleomórficas, Gram negativas (Oren, 2018) y en acuerdo con lo sugerido por Haba, el género *Halorubrum* se debería dividir tomando en cuenta otros parámetros no moleculares (Haba et al., 2018).

La especie *Halolamina* sp. M3 está más cercanamente emparentada con *Haloarchaeon UA-SP14*, a pesar de ser una especie no clasificada, tiene más del 98% de similitud con especies dentro del género *Halolamina*, las especies de este género son Gram negativas, pleomórficas, heterótrofos aerobios (Cui, Gao, Yang, & Xu, 2011); me atrevo a hipotetizar que hay posibilidad de que sea una especie nueva debido al porcentaje de similitud y a la gran distancia geográfica que hay con el resto de las especies de *Halolamina* (China y Corea).

El cambio constante en las condiciones del ecosistema, la exposición constante a radiación y la alta capacidad de realizar recombinación homóloga (Haba et al., 2018) son algunas de las razones que explican la alta tasa de evolución de las arqueas halófilas, provocando la gran diversidad en la fisiología de los organismos, incluso dentro del mismo género y explica la razón por la cual su clasificación y la elucidación de su funcionamiento se torna tan complicado.

Identificación quimio-taxonomía de lípidos

Lípidos apolares

Los resultados de quinonas encontradas por espectrometría de masas (HPLC/MS) (Ver Tabla 3) mostraron la presencia de moléculas con pesos de 717 correspondientes a Menaquinona-8 (MK-8) en todas las cepas, mientras que M3, M4, M6, M7 y M8 contenían moléculas con pesos de 719 Da, correspondiente a Menaquinona-8 hidrogenada (H₂)(MK-8(H₂)), esto concuerda con las quinonas encontradas en otros trabajos de taxonomía de halófilas de los géneros *Haloarcula* y *Halorubrum* (Chen et al., 2018, Namwong, Tanasupawat, Kudo, & Itoh, 2011, Yim et al., 2014). Este es el primer trabajo que reporta el contenido de quinonas en *Halolamina*. En el caso de *Halorubrum* sp. M5, se encontró un peso diferente (733 Da) al resto de las cepas. Este peso corresponde al de una metil-menaquinona8 (MMK-8) la cual no es reportada comúnmente pero sí ha sido encontrada en *Natronobacterium gregoryi*, una arquea halófila aislada de Kenia por Collins & Tindall (Collins & Tindall, 1987).

Tabla 3.- Quinonas de las 8 cepas. Peso molecular en Da encontrados MK-8= Menaquinona8, MK-8(H₂) = Menaquinona8 hidrogenada, MMK-8= Metil-menaquinona8

| Código | PM | Quinonas |
|--------|-----------|-----------------------------|
| M1 | 717 | MK-8 |
| M2 | 717 | MK-8 |
| M3 | 717 y 719 | MK-8, MK-8(H ₂) |
| M4 | 717 y 719 | MK-8, MK-8(H ₂) |
| M5 | 717 y 733 | MK-8 Y MMK-8 |
| M6 | 717 y 719 | MK-8, MK-8(H ₂) |
| M7 | 717 y 719 | MK-8, MK-8(H ₂) |
| M8 | 717 y 719 | MK-8, MK-8(H ₂) |

En la fig. 2 se muestra el ejemplo de un cromatograma obtenido en la espectrometría de masas correspondiente a *Halolamina* sp. M3, el detalle de todos los cromatogramas se encuentra en el Anexo 1.

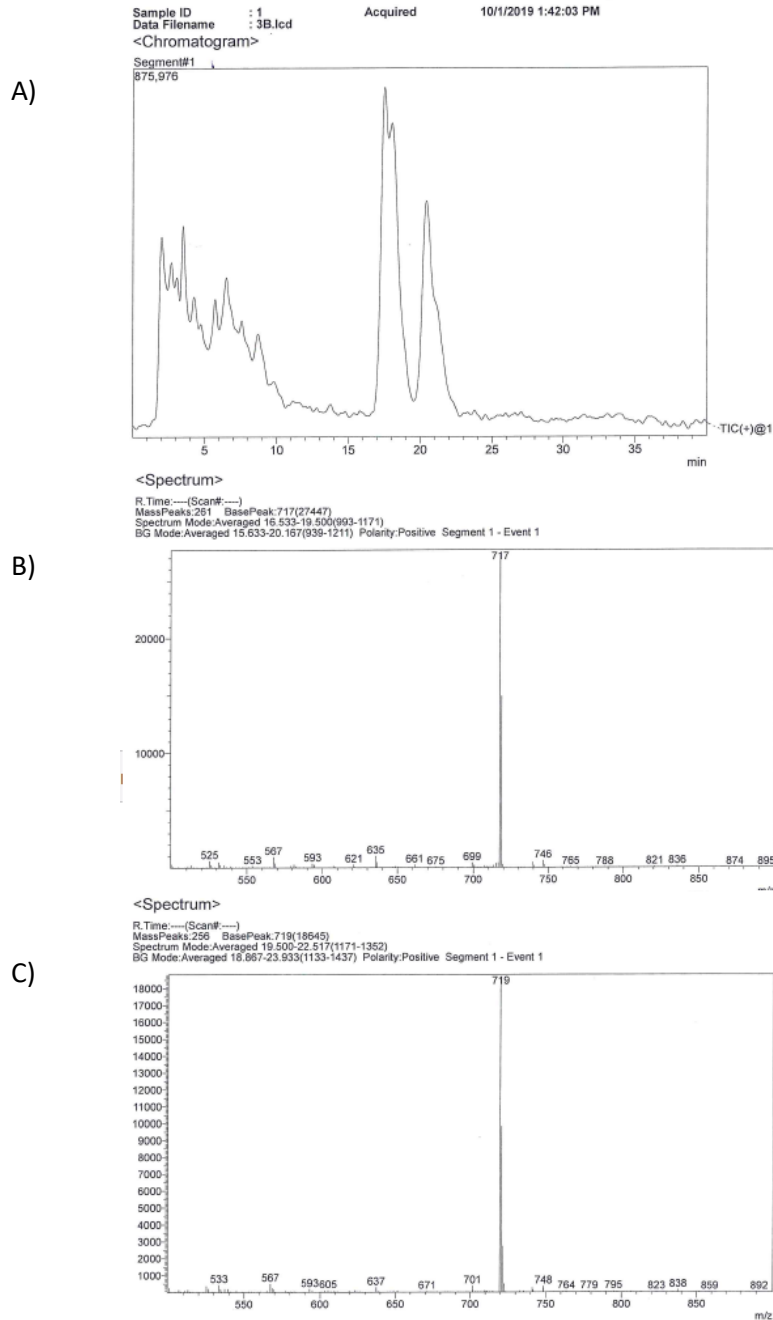


Figura 2.- Resultados HPLC/MS de la cepa M3. A) Cromatograma mostrando dos picos B) Espectro de masas del primer pico, con peso correspondiente a MK-8 y C) Espectro de masas del segundo pico con peso correspondiente a MK-8(H₂)

Los resultados de H-RMN (fig. 3), el espectro muestra señales en 5.1 ppm correspondientes a protones olefínicos, 2.18 ppm para anillo metil en en C-2, una señal compleja de metilenos alílicos en 2.1 ppm, extremo *cis* de la cadena metilo en 1.67, *trans*-metilos internos en 1.5-1.6 y un pequeño doblete en 3.36 por un metileno alílico junto al anillo C-1.

Collins y Tindall (Collins & Tindall, 1987) encontraron señales similares en el espectro de masas de las quinonas. Tales resultados corresponden con los obtenidos en este trabajo, confirmando así la presencia de MK-8 en las cepas.

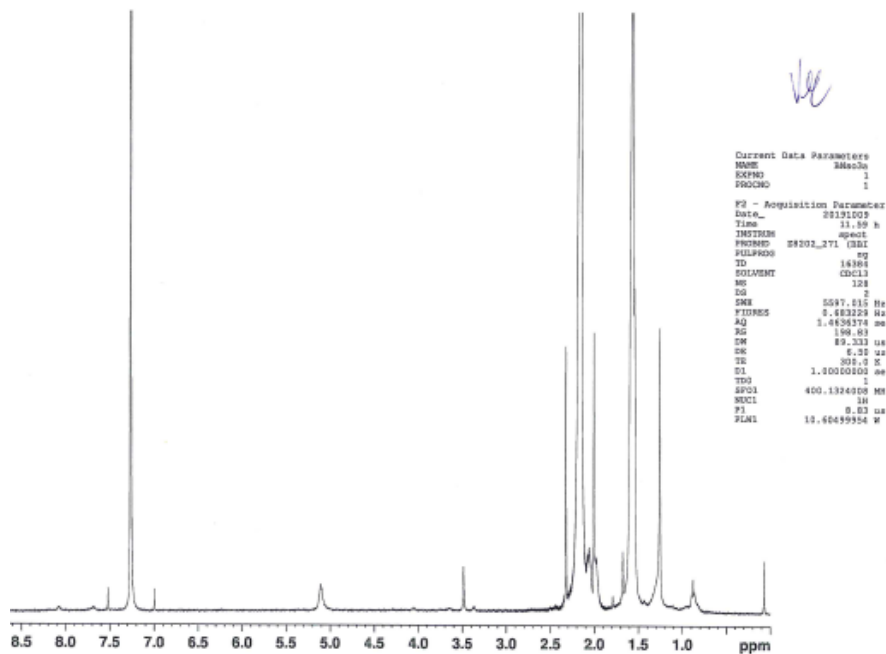


Figura 3.- Espectro H-RMN. El espectro de la cepa M3 (*Halolamina*) muestra los picos característicos de menaquinona MK-8.

Lípidos polares

Los perfiles de lípidos polares de las 8 cepas fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC) acomodados de manera que *Haloarcula* sp. M1 se encuentra en el extremo izquierdo, las cepas de *Halorubrum* sp. (M2, M4, M5, M6, M7 y M8) se encuentran al centro y *Halolamina* sp. M3 en el extremo derecho.

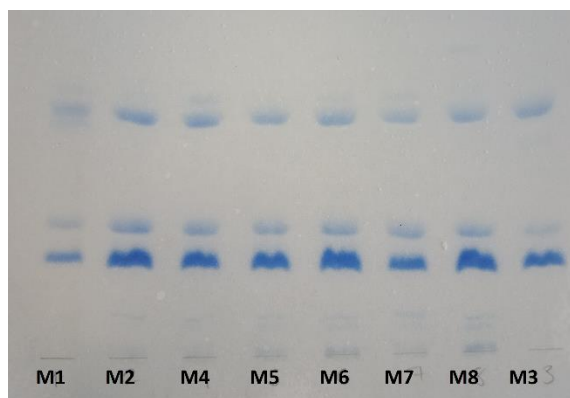


Imagen 8.- Fosfolípidos. TLC revelada con reactivo de Dittmer-Lester mostrando fosfolípidos de las 8 arqueas.

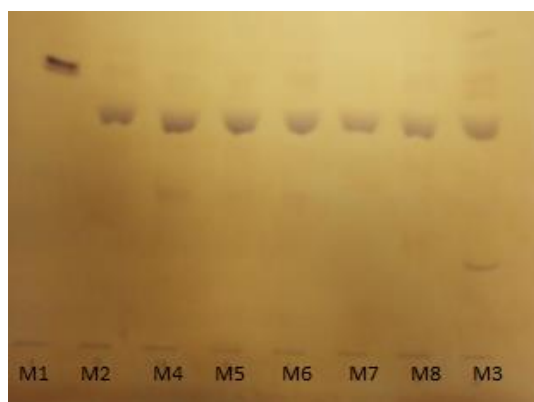


Imagen 9.- Glicolípidos. TLC revelada con α -Naftol mostrando glicolípidos de las 8 arqueas.

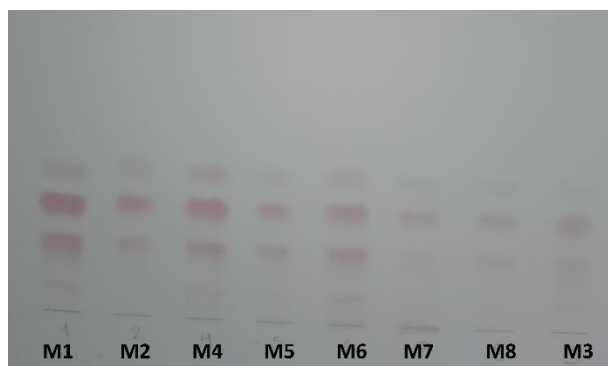


Imagen 10.- Aminolípidos. TLC revelada con ninhidrina mostrando aminolípidos de las 8 arqueas.

Los glicolípidos (Ver Imagen 9) juegan un papel importante en la producción y estabilización de la molécula de bacteriorodopsina (Oberwinkler, 2011). Las arqueas halófilas tienden a diferir en el tipo de glicolípidos contenidos en la membrana incluso entre miembros de la misma familia. En la Imagen 9 se puede apreciar la diferencia del contenido de los glicolípidos entre los 3 géneros diferentes, todos los glicolípidos de las cepas de *Halorubrum* y *Halolamina sp.M3* presentan la misma migración, mientras que el de *Haloarcula sp. M1* es mayor, además *Halolamina sp. M3* contiene uno extra con menor migración.

Una cepa de cada género se utilizó para la comparación con estándares. La cepa *Halolamina sp. M3* fue la única en la que se encontró el glicolípidos S-DGD (Imagen 10), este resultado es congruente con (Zhang, Huo, Zhang, Zhu, & Wu, 2013) al haberlo

encontrado también en *Halolamina salifodinae* y *Halolamina salina*, su ausencia en *Haloarcula* coincide con la descripción de Torreblanca (Torreblanca et al., 1986) del mismo género. En el trabajo de Rocco (Mancinelli et al., 2009) encontraron este glicolípido también en el género de *Halorubrum* pero la producción de lípidos polares también depende de las condiciones de cultivo, por lo que no se descarta por completo la posibilidad de su contenido en estas cepas. Es posible que este tipo de glicolípido sea el componente principal de las vesículas de gas que producen algunas arqueas para desplazarse a lugares con más oxígeno (Aharon, 2003). Los resultados también mostraron otros glicolípidos no identificados, por lo que se requiere más trabajo para su identificación.

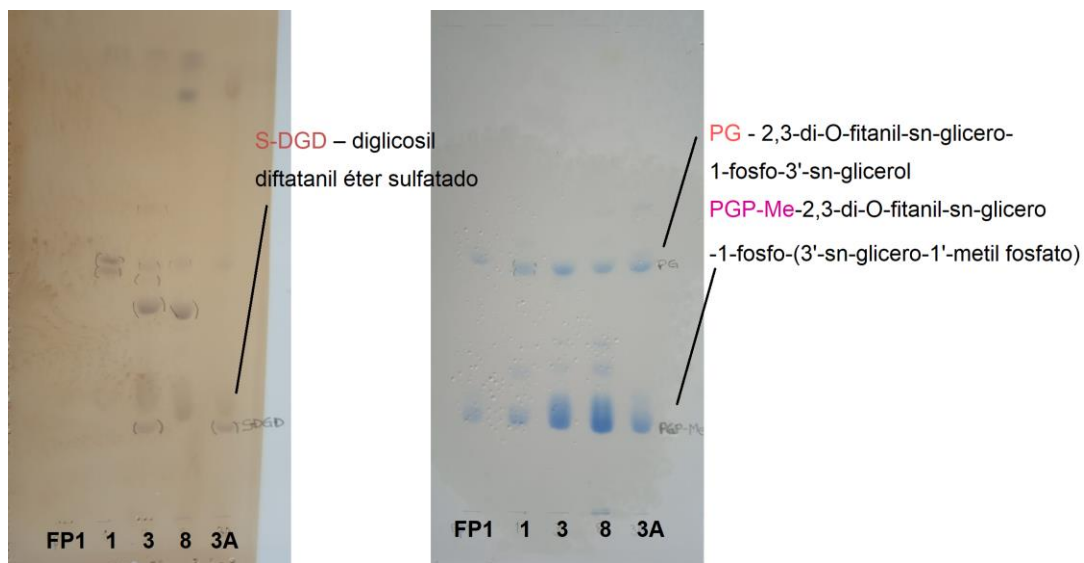


Imagen 11.- Estándares S-DGD, PG y PGP-Me. La única cepa presentando S-DGD fue *Halolamina sp. M3*, mientras que todas las cepas presentaron PG y PGP-Me.

En comparación con los estándares PG y PGP-Me, estuvieron presentes en todas las cepas, coincidiendo con los trabajos taxonómicos de *Haloarcula salaria* (Namwong et al., 2011), *Halolamina salifodinae* y *Halolamina salina* (Zhang et al., 2013) y *Halorubrum sfaxense* (Trigui, Masmoudi, Maalej, & Dukan, 2011). El PGP-Me es un marcador taxonómico, por ello el hecho de ser el fosfolípido más abundante confirma tratarse de arqueas halófilas (Corcelli, Lobasso, & Cesare, 2006). Los PGS son indicadores de especies de arqueas neutrófilas, su función está relacionada con la actividad de citocromo C oxidasa; las alcalófilas carecen de este fosfolípido (Oberwinkler, 2011).

En los resultados de TLC en 2D también se encontró coincidencia en todas las cepas con el estándar 50445 (Sal de sodio 1-(3-*sn*-fosfatidil)-*rac*-glicerol), este fosfolípido puede estar asociado a la molécula de bacteriorodopsina (Aharon, 2003). También se mostró un glico-fosfolípido no identificado en las cepas *Haloarcula sp. M1*, *Halolamina sp. M3* y *Halorubrum sp. M4* el cual sería interesante investigar a fondo porque es común encontrar este tipo de lípidos en las arqueas metanógenas pero no en las halófilas (Kates, 1993).

Los resultados obtenidos en la hidrólisis de lípidos fueron principalmente cadenas isoprenoides 20C-20C de membrana (Imagen 12). Misma longitud encontrada en diversos trabajos con identificación de lípidos de haloarqueas, a diferencia de otro tipo de arqueas, las cuales contienen una monocapa de 40 Carbonos (Namwong et al., 2011), (P. Corral et al., 2015).

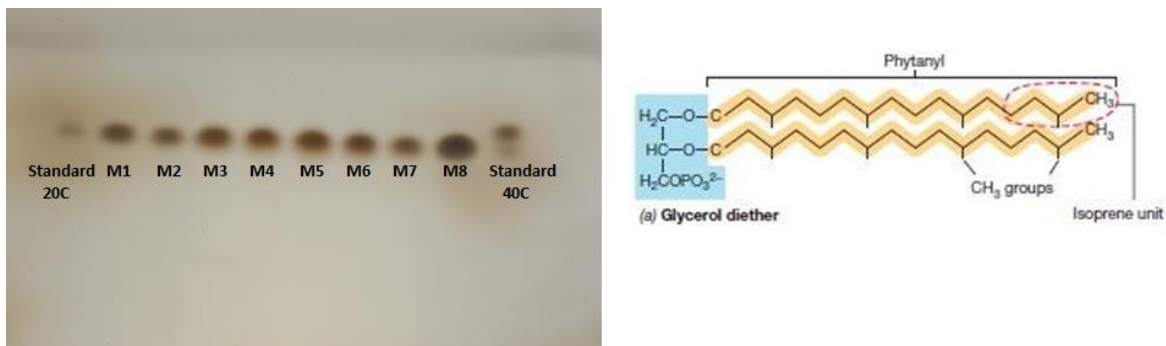


Imagen 12.- Lípidos polares hidrolizados. Del lado izquierdo los lípidos polares hidrolizados dispuestos en una TLC con los estándares en los extremos. Del lado derecho el diagrama de un lípido de membrana típico de arquea halófila con los grupos de diferentes colores unidos mediante un enlace éter (en azul el glicerol y en amarillo la cadena isoprenoide de 20C que fue separada).

Producción de carotenoides

Cuantificación de carotenoides

La producción de carotenoides fue evaluada en todas las cepas. La mayor producción se desarrolló durante la fase estacionaria, especialmente a las 136 h con excepción de la cepa *Halorubrum sp. M8*, la cual tuvo su producción máxima a las 112 h. El crecimiento de las cepas se vio favorecido en aquellas cultivadas a 37°C (Figura 4). Las crecidas a 45°C (de la M5 a la M8) obtuvieron los valores más bajos de producción de biomasa por lo que se puede inferir que la temperatura afecta el crecimiento.

CRECIMIENTO

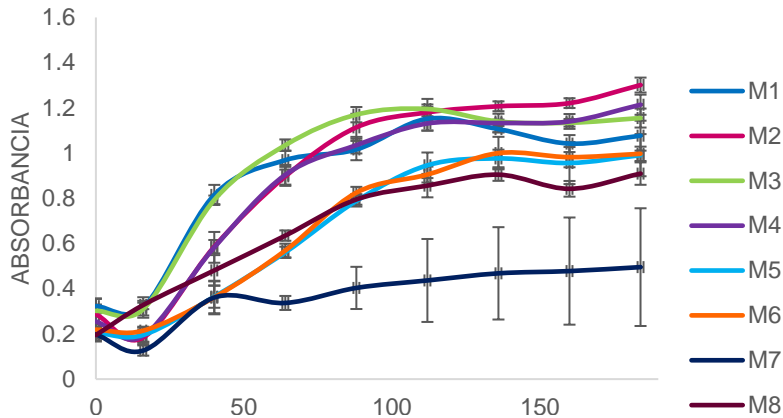


Figura 4.- Densidad óptica. Crecimiento con desviación estándar de todas las cepas. De la M1 a la M4 crecidas 37°C y de la M5 a la M8 a 45°C. M1 del género *Haloarcula*, M3 del género *Halolamina* y el resto del género *Halorubrum*.

La cepa *Halorubrum sp. M5*, a pesar de haber tenido baja densidad óptica con respecto a las de 37°C fue la mayor productora de carotenoides, obteniendo 18.98 mg/L a las 136 h.

La producción de pigmentos de las cepas crecidas a 37°C (de la M1 a la M4) fue similar entre ellas y la cepa M7, también perteneciente al género *Halorubrum*, resultó ser la menor productora con 8.3 mg/L en su producción más alta.

Con excepción de la cepa M7, *Halorubrum* fue el género líder en producción de carotenoides, mientras que *Haloarcula sp. M1* y *Halolamina sp. M3* fueron similares y relativamente bajas con respecto a las demás.

La concentración de carotenoides totales del género *Halorubrum* es ligeramente menor en comparación con los valores de De la Vega et al. (de la Vega et al., 2016) en donde se emplearon condiciones óptimas y mayor concentración de NaCl (250 g/L), obteniendo valores de hasta 25 mg/L de carotenoides totales producidos en el mismo género taxonómico. Todo lo anterior se muestra en la Figura 5.

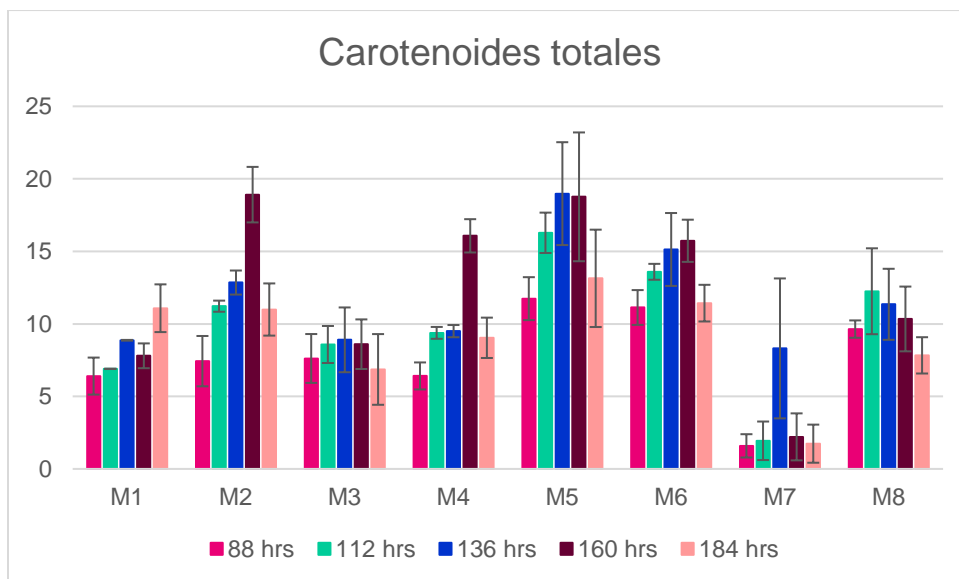


Figura 5.- Carotenoides totales. Valores obtenidos de carotenoides de las 8 cepas a 5 tiempos diferentes.

Barrido espectrofotométrico

Las 8 cepas seleccionadas demostraron ser productoras de pigmentos carotenoides. Según el manual de carotenoides de Britton (Britton, 1985) el barrido de 400 a 600 nm mostró los 3 picos característicos de la bacterioruberina (468, 498 y 532) en acetona en todas las cepas, no existe un estándar de bacterioruberina, por lo que con esta evidencia se puede inferir que este es el pigmento principal (Figura 6).

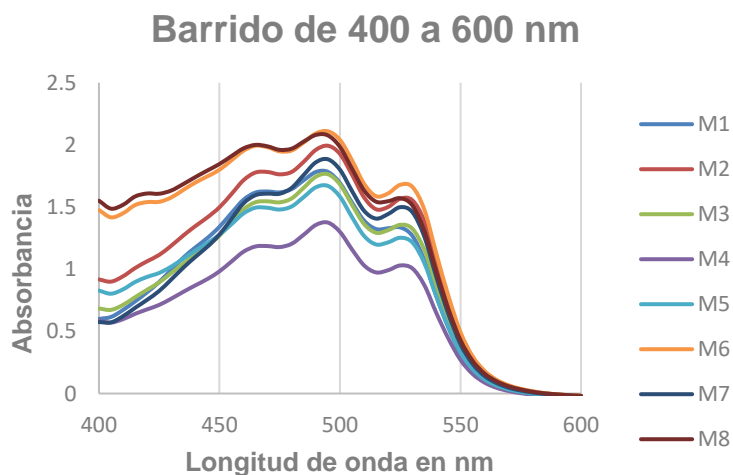


Figura 6.- Barrido espectrofotométrico. Barrido de los extractos de pigmentos de las cepas. Todas muestran los 3 picos característicos de la bacterioruberina en acetona (468, 498 y 532).

Crecimiento en reactor

Los resultados del reactor fueron positivos, regularmente al escalar un proceso a biorreactor se encuentran una serie de problemas y complicaciones. En el caso de *Halorubrum* sp. M5 se demostró que es posible realizar este escalamiento a nivel piloto sin ningún problema e incluso incrementando la cantidad de carotenoides (27.22 mg/L) con respecto a crecimiento en matraz (18.98 mg/L).

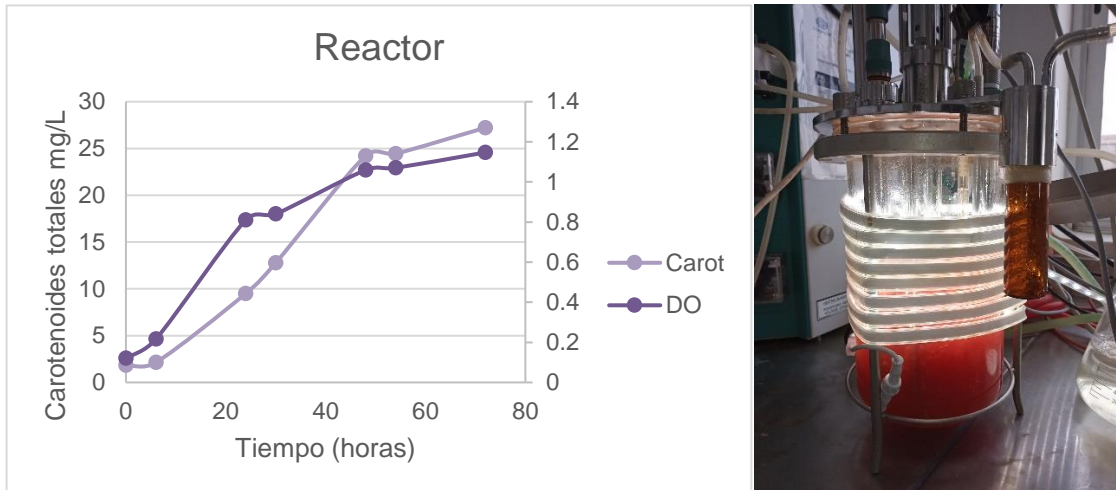


Imagen 13.- Del lado izquierdo gráfica mostrando crecimiento medido en densidad óptica y carotenoides totales. No se muestra desviación estándar debido a que se creció una única vez.

Condiciones óptimas

La especie *Halolamina* sp. M3 mostró mejor crecimiento a concentración de 4 M de NaCl (Figura 6 y 7), mientras que *Haloarcula* sp. M1 y *Halorubrum* sp. M5 obtuvieron el mejor valor a 3.5 y 4 M NaCl (Figura 8), todas crecieron en todos los niveles de NaCl excepto a 0, 0.5 y 1 M.

La razón por la que existe tolerancia a tantas concentraciones de NaCl puede ser debido a los ambientes en los que habitan, donde la concentración de sales y el tiempo de retención de agua dependen de las condiciones climáticas (Oren, 2002).

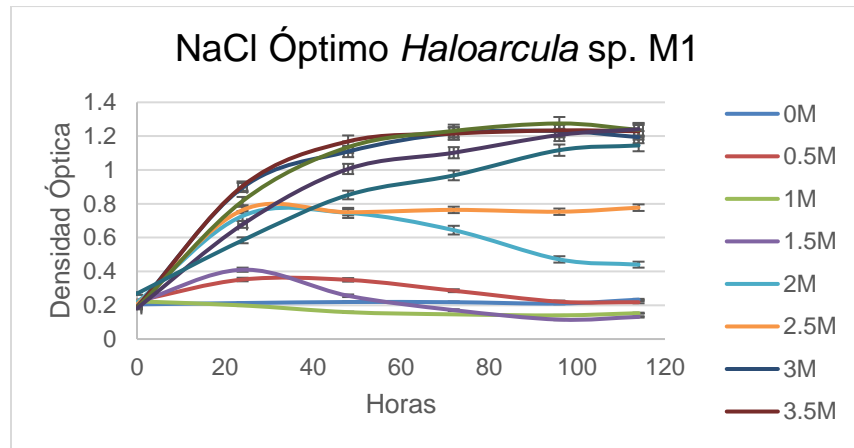


Figura 7.- Crecimiento de *Haloarcula sp. M1* en diferentes concentraciones de NaCl. En el eje de las y la densidad óptica y en el eje de las x el tiempo.

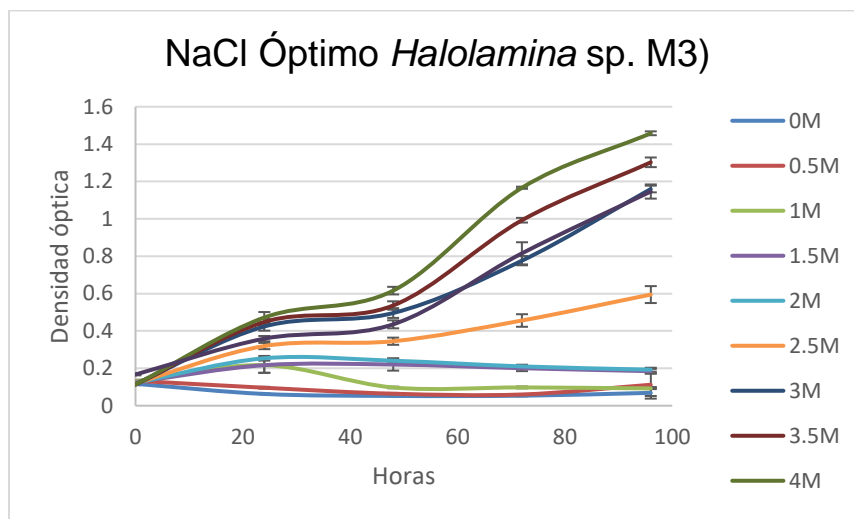


Figura 8.- Crecimiento de *Halolamina sp. M3)* en diferentes concentraciones de NaCl. En el eje de las y la densidad óptica y en el eje de las x el tiempo.

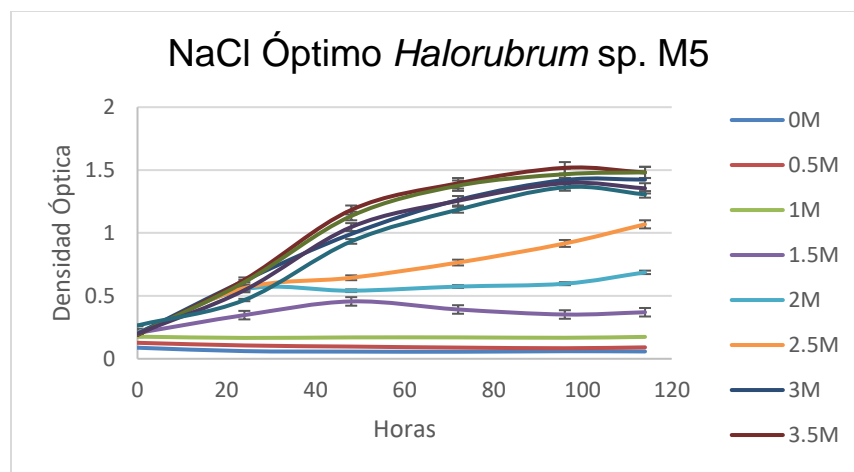


Figura 9.- Crecimiento de *Halorubrum sp. M5* en diferentes concentraciones de NaCl. En el eje de las y la densidad óptica y en el eje de las x el tiempo.

Con respecto al pH, se observó crecimiento en las tres cepas a partir de pH 6, hasta pH 9, esto significa que los tres géneros, además de ser halófilos, también son ligeramente alcalófilos por tolerar niveles más altos de pH de 8.5 (Larsen, 1980). En pH 10 se muestran valores de densidad óptica que pareciera crecimiento, pero esto solo se debe a la misma turbidez que mostraba el medio de cultivo desde el tiempo 0.

El nivel óptimo de pH fue 8 para *Halolamina sp. M3* y *Halorubrum sp. M5*, correspondiente al tomado de las muestras donde se aislaron las cepas (Tabla 4). El óptimo para *Haloarcula sp. M1* fue de 7.

Tabla 4.- Efecto del pH en el crecimiento de las cepas. Del lado izquierdo el valor de pH, del lado derecho el crecimiento en valores de densidad óptica de las repeticiones promediadas de las 3 cepas a las 72 horas.

| pH | <i>Haloarcula sp. M1</i> | <i>Halolamina sp. M3</i> | <i>Halorubrum sp. M5</i> |
|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 4 | 0.086±0.0765 | 0.0905±0.0037 | 0.083±0.075 |
| 5 | 0.167±0.043 | 0.08175±0.001 | 0.06±0.0367 |
| 6 | 1.027±0.055 | 0.9595±0.0059 | 0.353±0.054 |
| 7 | 1.056±0.002 | 1.0575±0.032 | 1.095±0.0104 |
| 8 | 0.984±0.0341 | 1.12775±0.0048 | 1.357±0.0742 |
| 9 | 0.955±0.0583 | 1.0395±0.0229 | 1.332±0.0653 |
| 10 | 0.225±0.0466 | 0.21125±0.0093 | 0.308±0.004 |

Todas las cepas demostraron ser termo-tolerantes, la temperatura del lugar en donde se realizó el aislamiento oscila entre los 34.5°C en verano y -1.5°C en invierno (Sánchez, 2013), probable razón por la cual las cepas hayan soportado todos los diferentes niveles de temperatura. A nivel matraz se observó crecimiento desde 20 hasta 70°C (Tabla 5) siendo 37°C el óptimo para *Halolamina sp. M3* y *Halorubrum sp. M5* y 50°C para *Haloarcula sp. M1*. En 30°C se muestra un valor elevado, pero esto se debe a que, debido a la baja disponibilidad de orbitales, fueron los únicos matraces que se sometieron a una agitación diferente (250 rpm). Está comprobado que la agitación favorece el crecimiento (Calegari-Santos, Diogo, Fontana, & Bonfim, 2016b) pero en los orbitales disponibles, 200 rpm era la agitación máxima posible.

Tabla 5.- Efecto de la temperatura en el crecimiento. Del lado izquierdo la temperatura probada con su repetición, del lado derecho el crecimiento en valores de densidad óptica obtenida con su desviación estándar.

| Temperatura | <i>Haloarcula sp. M1</i> | <i>Halolamina sp. M3</i> | <i>Halorubrum sp. M5</i> |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 20° | 0.281±0.0054 | 0.2145±0.0079 | 0.273±0.0034 |
| 30° | 0.972±0.0124 | 1.05325±0.0076 | 0.775±0.0097 |
| 37° | 0.945±0.0057 | 1.16275±0.0092 | 1.284±0.0034 |
| 50° | 0.968±0.0087 | 1.10925±0.0177 | 1.11±0.0056 |
| 60° | 0.358±0.0033 | 0.5695±0.0298 | 0.174±0.041 |
| 70° | 0.285±0.0047 | 0.29225±0.0211 | 0.324±0.0062 |

La versatilidad de las cepas para crecer en tan diversas condiciones representa una gran ventaja para el cultivo a nivel industrial debido a que puede reducir costos de incubación y enfriamiento.

Enriquecimiento del medio de cultivo con fuentes de carbono

El análisis estadístico mostró aumento en la producción de pigmentos en *Haloarcula sp. M1* con ambas concentraciones de glucosa con respecto al control, especialmente a 2.5%, en crecimiento no mostró diferencia significativa con ninguna fuente de Carbono. *Halolamina sp. M3*, a pesar de ser capaz de metabolizar azúcares (Cui et al., 2011), no mostró ninguna diferencia con respecto al control tanto en crecimiento como en producción de pigmentos. La glucosa también estimuló el crecimiento y la producción de pigmentos en *Halorubrum sp. M5*, pero en este caso 1% fue la concentración en la que produjo mayor cantidad. En este último caso la producción de pigmento se vio afectada por la adición de ácido glutámico. Las gráficas mostrando los resultados se muestran en la Figura 10.

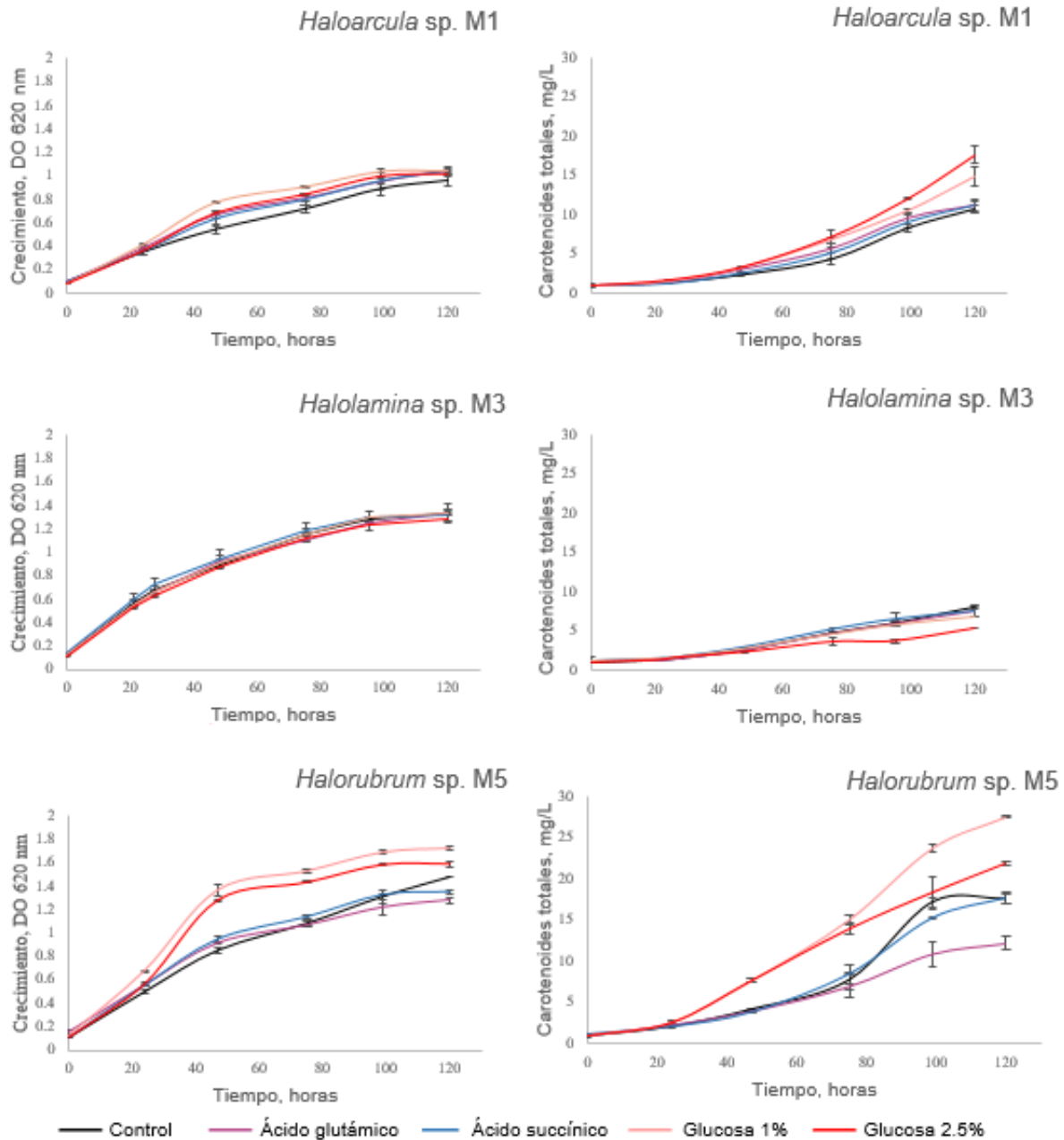


Figura 10- Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono. - Gráficas indicando del lado izquierdo el crecimiento en densidad óptica y del lado derecho la producción de carotenoides en mg/L. Arriba la cepa *Haloarcula sp. M1*, en medio *Halolamina sp. M3* y abajo *Halorubrum sp. M5*. Horas en el eje de las X.

No todas las haloarqueas funcionan con el mismo metabolismo, el uso de las rutas metabólicas depende tanto de la genética como de la ecología. La asimilación del ácido

glutámico en estos organismos no ha sido completamente elucidado, es por ello que la información puede ser confusa, algunos trabajos reportan que puede ser metabolizado por *Halobacterium salinarum* y *Haloarcula marismortui* (Falb et al., 2008) y otros reportan que *Haloarcula* y *Halorubrum* son incapaces de crecer en ácido glutámico a menos que sean la única fuente de Carbono disponible (Torreblanca et al., 1986). Esta información unida a los resultados obtenidos puede significar que el ácido glutámico afecta el crecimiento a menos de ser la única fuente de carbono disponible, que la capacidad de metabolizarlo varía dependiendo de la especie (incluso especies dentro del mismo género), que se puede metabolizar solamente en determinadas condiciones de estrés o todo lo anterior.

El efecto del ácido succínico en la producción de carotenoides no resultó como en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Martinez-Moya et al., 2015), aunque poseen rutas metabólicas similares, son organismos filogenéticamente alejados.

El metabolismo en arqueas halófilas es complejo y variable. La glucosa puede ser degradada mediante diferentes variantes de la ruta ED (Falb et al., 2008). En algunas arqueas como *Halobacterium* capaces de utilizar glucosa como fuente de carbono, existe una curva en la que bajas concentraciones de glucosa estimulan la producción de pigmentos y altas concentraciones lo inhiben. En el trabajo de Gochnauer 2% de glucosa estimuló ligeramente el crecimiento y considerablemente la producción de pigmento, mientras que 4% de glucosa inhibió el crecimiento (Gochnauer, Kushwaha, Kates, & Kushner, 1972b). Esta información concuerda con el caso de la producción de pigmentos en *Haloarcula sp. M1* y con el crecimiento y la producción de pigmento en *Halorubrum sp. M5*, aunque difiriendo en la concentración de glucosa.

Existe una relación proporcional entre el crecimiento y la producción de carotenoides aunque la producción de carotenoides también se puede ver afectada por la fuente de carbono del medio de cultivo, ya que se ha demostrado por medio de resonancia magnética nuclear que algunas sintetizan sus lípidos isoprenoides a partir exclusivamente de aminoácidos y otras de cualquier compuesto orgánico (Oberwinkler, 2011).

10. Conclusión

El presente estudio devela que se encuentran presentes al menos 17 cepas de arqueas halófilas en la salina de Santa Bárbara en el estado de Sonora, México de las cuales 8 fueron identificadas como pertenecientes a tres géneros distintos (*Haloarcula*, *Halorubrum* y *Halolamina*) dentro de las familias *Halobacteriaceae* y *Halorubraceae* arrojando la posibilidad de que la cepa *Halolamina* sp. M3 sea una nueva especie.

Además, se demostró que las cepas son productoras de carotenoides, con bacterioruberina como pigmento principal, las cepas alcanzan su mayor producción a partir de las 136 h y la mayor productora es *Halorubrum* sp. M5. Esta última cepa es posible crecerla en biorreactor para escalar la producción de carotenoides a nivel piloto.

Existe una relación proporcional entre el crecimiento y la producción de pigmentos, aunque ésta también se puede ver influenciada por factores de estrés y los componentes del medio. La adición de glucosa al medio de cultivo ATCC2185 aumenta considerablemente la producción de carotenoides en *Haloarcula* sp. M1 y *Halorubrum* sp. M5.

Este trabajo incrementa el acervo científico de la ecología del ecosistema salino de Santa Bárbara, de la composición lipídica y de las condiciones de cultivo de arqueas halófilas. Estos conocimientos sientan las bases para la bioprospección de dichos microorganismos para su aprovechamiento.

11. Perspectivas

Al ser un trabajo que abarca diversos temas, arroja muchas perspectivas para investigación.

La identificación molecular dio como resultado probables nuevas especies, para confirmar esto se debe realizar un trabajo taxonómico para proponer (en caso de que sean) las especies nuevas.

La bacterioruberina es el pigmento principal en las arqueas halófilas aisladas de la salina de Santa Bárbara, sin embargo, no es el único carotenoide producido. Un análisis cromatográfico ayudaría a identificar el espectro completo de los pigmentos producidos.

Es un hecho que la bacterioruberina tiene gran potencial industrial y ofrece ventajas para su producción, se recomienda realizar experimentos para definir la estabilidad del pigmento para sus posibles aplicaciones, así como buscar medios de cultivo alternos para economizar su producción.

El metabolismo completo de las halófilas continúa sin ser completamente elucidado y al parecer, la producción de carotenoides varía en función de la especie. Su caracterización es fundamental debido a su posible aplicación biotecnológica y además, por ser un modelo de estudio evolutivo con alcances en astrobiología

12. Bibliografía

- Aharon, O. (2003). *Halophilic Microorganisms and their Environments*. *International Microbiology*, 6: 151-152
- Arahal, D. R., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Volcani, B. E., & Ventosa, A. (1996). *Phylogenetic Analyses of Some Extremely Halophilic Archaea Isolated from Dead Sea Water , Determined on the Basis of Their 16S rRNA Sequences*. 62(10), 3779–3786.
- Berman, J., Zorrilla-López, U., Farré, G., Zhu, C., Sandmann, G., Twyman, R. M., ... Christou, P. (2015). Nutritionally important carotenoids as consumer products. *Phytochemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9373-1>
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., & Siebers, B. (2014). *Carbohydrate Metabolism in Archaea : Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation*. 78(1), 89–175. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-13>
- Britton, G. (1985). General carotenoid methods. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)11007-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)11007-4)
- Calegari-Santos, R., Diogo, R. A., Fontana, J. D., & Bonfim, T. M. B. (2016). Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions. *Current Microbiology*, 72(5), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0974-8>
- Calegari-Santos, R., Diogo, R. A., Fontana, J. D., & Bonfim, T. M. B. (2016b). Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions. *Current Microbiology*, 72(5), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0974-8>
- Chen, Y., Mu, Q., Hu, K., Chen, M., Yang, J., Chen, J., ... Sun, Z. (2018). Characterization of MK 8 (H 2) from *Rhodococcus* sp. B7740 and its potential antiglycation capacity measurements. *Marine Drugs*, 16(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/md16100391>
- Children, W. (2001). *Chapter 5 Pigments of Halophilic Microorganisms*. 173–206.
- Collins, M. D., & Tindall, B. J. (1987). Occurrence of menaquinones and some novel methylated menaquinones in the alkaliphilic, extremely halophilic archaeobacterium *Natronobacterium gregoryi*. *FEMS Microbiology Letters*, 43(3), 307–312. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02163.x>
- Corcelli, A., Lobasso, S., & Cesare, P. G. (2006). *Characterization of Lipids of Halophilic Archaea*. 35(05). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(05\)35025-2](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(05)35025-2)
- Corral, J. C. C., De Los Santos Villalobos, S., Barrgàn, L. A. P., Figueroa, J. J. B., Vásquez-Murrieta, M. S., Alvarado, M. I. E., & Chávez, L. A. C. (2018). Isolation of Moderately Halophilic Bacteria in Saline Environments of Sonora State Searching for Proteolytic Hydrolases. *Open Agriculture*, 3(1), 207–213.

<https://doi.org/10.1515/opag-2018-0021>

- Corral, P., De La Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., Amoozegar, M. A., Thane Papke, R., & Ventosa, A. (2015). *Halorubrum persicum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from sediment of a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(6), 1770–1778.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.000175>
- Cui, H. L., Gao, X., Yang, X., & Xu, X. W. (2011). *Halolamina pelagica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(7), 1617–1621.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.026799-0>
- Dassarma, S. (2006). *Extreme Halophiles Are Models for Astrobiology*. 1(3), 120–126.
- De la Vega, M., Sayago, A., Ariza, J., Barneto, A. G., & León, R. (2016). Characterization of a bacterioruberin-producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnology Progress*, 32(3), 592–600. <https://doi.org/10.1002/btpr.2248>
- Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., Von Gronau, S., ... Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles*.
<https://doi.org/10.1007/s00792-008-0138-x>
- Fang, C. J., Ku, K. L., Lee, M. H., & Su, N. W. (2010). Influence of nutritive factors on C50carotenoids production by *Haloferax mediterranei* atcc 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.044>
- Fontana, D., Maria, T., & Bonfim, B. (2016). *Carotenoid Production by Halophilic Archaea Under Different Culture Conditions*. 641–651.
<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0974-8>
- Gochnauer, M. B., Kushwaha, S. C., Kates, M., & Kushner, D. J. (1972a). Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Archiv Für Mikrobiologie*, 84(4), 339–349.
<https://doi.org/10.1007/BF00409082>
- Haba, R. R. De, Corral, P., & Sánchez-porro, C. (2018). *Genotypic and Lipid Analyses of Strains From the Archaeal Genus Halorubrum Reveal Insights Into Their Taxonomy , Divergence , and Population Structure*. 9(March), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00512>
- Instituto Nacional de ecología y cambio climático.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/421/cap2.html#:~:text=Se%20distri buyen%20principalmente%20en%20cuatro,la%20Sierra%20Madre%20del%20Sur.> Accesado 26-01-2021.
- Kellermann, M. Y., Yoshinaga, M. Y., Valentine, R. C., Wörmer, L., & Valentine, D. L. (2016). Important roles for membrane lipids in haloarchaeal bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(11), 2940–2956.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.010>

Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Mukesh Kumar, A., & Jyoti, S. (2014). Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*. <https://doi.org/10.1155/2014/837891>

Kumar, A., Shankar Vishwakarma, H., Singh, J., & Kumar, M. (n.d.). International Journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences microbial pigments:: production and their applications in various industries. *IJPCBS*, 2015(1), 203–212. Retrieved from www.ijpcbs.com

Larsen, H. (1946). *ECOLOGY OF HYPERSALINE ENVIRONMENTS*. 23–39.

Larsen, H. (1980). Ecology of hypersaline environments. *Developments in Sedimentology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-4571\(08\)70227-9](https://doi.org/10.1016/S0070-4571(08)70227-9)

Larsen, H. (1986). *Halophilic and halotolerant microorganisms -an overview and historical perspective*. 39, 3–7.

Mancinelli, R. L., Landheim, R., Sánchez-Porro, C., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Legat, A., ... Stan-Lotter, H. (2009). Halorubrum chaoviator sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000463-0>

Mandelli, F., Miranda, V. S., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2012a). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0993-y>

Marshall, C. P., Leuko, S., Coyle, C. M., Walter, M. R., Burns, B. P., & Neilan, B. A. (2007). Carotenoid Analysis of Halophilic Archaea by Resonance Raman Spectroscopy. *Astrobiology*. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.0097>

Martinez-Moya, P., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2015). Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. *BMC Genomics*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1484-6>

Matsumi, R., Atomi, H., Driessen, A. J. M., & van der Oost, J. (2011). Isoprenoid biosynthesis in Archaea - Biochemical and evolutionary implications. *Research in Microbiology*, 162(1), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.10.003>

Namwong, S., Tanasupawat, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2011). *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 231–236. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021790-0>

Naziri, D., Hamidi, M., Hassanzadeh, S., Tarhriz, V., Zanjani, B. M., Nazemyieh, H., ... Hejazi, M. S. (2014a). Analysis of carotenoid production by *Halorubrum* sp.

- TBZ126; an extremely halophilic archeon from Urmia Lake. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.010>
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., ... DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12176–12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.190337797>
- O'Connell, S. P., Lehman, R. M., Snoeyenbos-West, O., Winston, V. D., Cummings, D. E., Watwood, M. E., & Colwell, F. S. (2003). Detection of Euryarchaeota and Crenarchaeota in an oxic basalt aquifer. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00465-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00465-8)
- Oberwinkler, T. M. (2011). Metabolic and Genomic Annotations in Halophilic Archaea. *PhD Thesis*, 1–223.
- Oren, A. (1994). *The ecology of the extremely halophilic archaea*. 13, 415–439.
- Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00200-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00200-8)
- Oren, A. (2018). *Halorubrum*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 639). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00487.pub2>
- Ortiz, E. (2008). Características edafológicas, fisiográficas, climáticas e hidrográficas de México. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*, 32. Retrieved from http://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/INTERNET/1-GEOGRAFIADEMEXICO/MANUAL_CARAC_EDA_FIS_VS_ENERO_29_2008.pdf
- Potential, T. (2015). *marine drugs*. 5508–5532. <https://doi.org/10.3390/md13095508>
- Reyes-Martínez, M. A., & Zavaleta, A. I. (2005). *Bacteriorrodosina una molécula peculiar*.
- Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md13095508>
- Rodriguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (n.d.). *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*.
- Sabet, S., Diallo, L., Hays, L., Jung, W., & Dillon, J. G. (2009). Characterization of halophiles isolated from solar salterns in Baja California, Mexico. *Extremophiles*, 13(4), 643–656. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0247-1>
- Souza, S. E. D., Altekar, W., & D'Souza, S. F. (1997). Adaptive response of hfx mdi to low NaCl. *Arch Microbiol*, 168, 68–71.
- Thombre, R. S., Shinde, V. D., Oke, R. S., Dhar, S. K., & Shouche, Y. S. (2016). Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated

from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. *Scientific Reports*.
<https://doi.org/10.1038/srep25642>

Torreblanca, M., Rodriguez-valera, F., Kamekura, M., Kates, M., Juezi, G., & Ventosa, A. (1986). Classification of Non-alkaliphilic Halobacteria Based on Numerical Taxonomy and Polar Lipid Composition, and Description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1–2), 89–99.
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(86\)80155-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(86)80155-2)

Trigui, H., Masmoudi, S., Maalej, S., & Dukan, S. (2011). *Characterization of Halorubrum sfaxense* sp. nov., a New Halophilic Archaeon Isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia. <https://doi.org/10.1155/2011/240191>

Vigneron, A., L'Haridon, S., Godfroy, A., Roussel, E. G., Cragg, B. A., Parkes, R. J., & Toffin, L. (2015). Evidence of active methanogen communities in shallow sediments of the sonora margin cold seeps. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(10), 3451–3459. <https://doi.org/10.1128/AEM.00147-15>

Villa Andrade, F. M. (2012). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). In *Comisión de Ecología y Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora, (CEDES)* (Vol. 2009–2012). Retrieved from http://www.conanp.gob.mx/conanp/dominios/ramsar/docs/sitios/FIR_RAMSAR/Sonora/Yavaros_Moroncarit/HUMEDALES_DE_YAVAROS_MONOCARIT.pdf

Yachai, M. (2009). *Carotenoid Production by Halophilic Archaea and Its Applications*.

Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., & Baxter, B. K. (2014). Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. 5(March), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00100>

Yim, K. J., Cha, I. T., Lee, H. W., Song, H. S., Kim, K. N., Lee, S. J., ... Kim, D. (2014). *Halorubrum halophilum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt-fermented seafood. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105(3), 603–612. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0115-6>

Yokooji, Y., Sato, T., Fujiwar, S., Imanak, T., & Atomi, H. (2013). Genetic examination of initial amino acid oxidation and glutamate catabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of Bacteriology*, 195(9), 1940–1948. <https://doi.org/10.1128/JB.01979-12>

Zalazar, L., Miró, P. P. M. V., & Andreina Cesari, R. E. D. C. M. C. M. M. I.-C. A. J. S. V. (2018). Bacterioruberin extracts from a hyperpigmented *Haloferax volcanii* strain: Antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5422347530(12), 0–1. <https://doi.org/10.1111/jam.14160>

Zhang, W. Y., Huo, Y. Y., Zhang, X. Q., Zhu, X. F., & Wu, M. (2013). *Halolamina salifodinae* sp. nov. and *Halolamina salina* sp. nov., two extremely halophilic archaea isolated from a salt mine. *International Journal of Systematic and*

Evolutionary Microbiology, 63(PART 12), 4380–4385.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.050864-0>

13. Anexo

1 Secuencias consenso de las 8 cepas

| | |
|-----------|--|
| M1 | AGTGTGAGGGCATATAGCCCTCGCTTTTCTGTACCCTAAGGTGGTACAGGAACAAGGACTGGGCAAGACCGGTGCC AGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGTCCAAGTGTAGGCCGATATTATGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTTGTGTGTA AGTCCATTGGGAAATCGACCAGCTCAACTGGTCGGCGTCCGGTGAAACTACACAGCTTGGGGCCGAGAGACTCAA CGGGTACGTCCGGGTAGGAGTGAATCCTGTAATCCTGGACGGACCACCAATGGGAAACCACGTTGAGAGACC GGACCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCAGGATTAGATACCCGGGTAGTCTGGCTGTAACAATG CTCGTAGGTATGTCAGCGCCATGAGCACGTGATGTGCCGTAGTGAAGACGATAAGCGAGCCGCCTGGGAAGTACG TCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACCACAACCCGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACTCAA CGCCGAAATCTCACCGTCCCAGACGTAGTAATGACAGTCAGGTTGACGACTTTACTCGACGCTACTGAGAGGAG GTGCATGGCCGCCGTACGCTGTAACCGTGTAGGCGTCCCTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACTTCTAGTT GCCAGCAATACCCTTGGGTAGTTGGGTACACTAGGAGGACTGCCGCTGCTAAAGCGGAGGAAGGAACGGGCAAC GGTAGGTCAGTATGCCCGAATGGACCGGGCAACACGCGGGTACAATGGCTCTGACAGTGGGATGCAACGCCGA GAGGCGACGCTAATCTCAAACGGAGTCTAGTTCCGATTGCGGGCTGAAACCCGCCGCATGAAGCTGGATTTCGG TAGTAATCGCGTGTGAGAAGCGCGGGTGAATACGTTCCCTGCTTCTTGCACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGA GTGGGGTCCGGAT |
| M2 | CTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCGGAACACAATACCCT CGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAGGG ATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGAGTG AGAACCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACACTGCA CGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGCGGTTACCAGAA TAAGGGTGGCCAGACCGGTGCCAGCCGCGGTAAATACCGGCAGCCCAAGTATGAGGCTGCTGCGGCTATTGGGCC TAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAACTG CGTGGCTTGGGACCGGAAGGCGCGACGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGACCGCC GATGGCGAAAGCACGTCCGAGAACGGATCCGACAGTGAAGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCAGGATTAGATA CCGGGTAGCTGGCCGTAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCACTACGAGTGGGTGTGCCGTAGGGGAGG CGCTAAGCAGACCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACCG GAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGGACATCTACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGATCAGGTTGAT GACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCGACGCTCGTACCCTGAGGCGTCTGTTAAGTCAGGC AACGAGCGAGACCCGACCCCTTACTTCCAGCAGTACCCGAGTGTAGTGGGACAGTAGGGGACGACGCGCGTGGC TAACACGGAAGGAACCGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACAATGG TCGAGACAAAGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCCGATTGTGGGTGCA CTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTCAACAGCGCGGGTGAATACGTCCTGCTCCTTGCAC ACACCGCCGTCGAAAGCACCCGAGTGAAGTCCGGATGAGGCGTACCCTCGTACGTCG |
| M3 | CCATGCTAGTCGCGCGGGTTAGACCCGCGCGTATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTACAGACAGGAAC AACCTCGGAAACTGAGGCTAATCCTGATACGCGTGCAGTGTGTTGAACACATCGACGCTCAAACGCTCCGGCGCT GTAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTACGGGTTGTG AGAGCAAGAGCCCGGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTAC ACTGCACGCCAGTGCATAAAGGGACCCCGAGTGAAGGGCATATCGCCCTTTCTTTTCTGAAACCGTAGGGATT CAGGAACAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCAGTAATACCGGCAGCTCGAGTGTGACCGATCTTATT GGGCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCGTCCGGAAATCCACCCGCTTAAACGGGTGGGCGTCCGGCGG AACTGTGCGGCTTGGGACAGGAAGGCTCGAGGGTACGTTCCGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGAAACGG ACCGCCGTGGCGAAAGCACCTCGAGAGACTGATCCGAGTGAAGGACGAAAGCTGGGGTCTGAAACCGGATT AGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAACGATGTTCCGTAGGTGTGCCACTCACTACGAGTGAAGTGGTGTGCCGAG GGAAGCCGCTAAGCGAACCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTA CAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACGCCGTAACCTTACCAGCCCCGACTACGGTGTGACGGCCA GGTTGATGACCTCGTACGACGCCGTAGAGAGTGGTGCATGGCCGCGTACGCTCGTACCCTGAGGCGTCCCTGT TAAGTCAGGCAACGAGCAGACCCGCGTCCATTAATTCCAGCATGTCCTTGGAGGATGGGTACATTAGGAGGA CTGCCGCGCAAGGCGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCGAATGGGCTGGGCAACACGCG GGCTACAATGGCCGAGACAATGGGTCCCAACCCCGAGAGGGGACGGTAATCTCAGAACTCGGTGATGTTCCGGAT TGCGGACTGCAACTCGTCCGCATGAAGCTGGATTCCGTAGTAATCGCATTCCAGGAGAGTCCGGTGAATACGTCCT TGCTCCTTGCACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGGGGTCCGGATGAGGCCTGTTACAGGTCGAA |
| M4 | TGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCGGAACACAATACC CTCGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATAACCACCTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCCGAA GGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTCATGAGA GTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGGCGGAAACCTTTACACT GCACGACAGTGCATAGGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTACCA GAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCGCGGTAATACCGGCAGCCCAAGTGTAGGCGATCTTATTGG GCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAA ACTCGTGGCTTGGACCGGAAGGCGGACGGTACGTTCCGGGTAGGAGTGAATCCCGTAATCCTGGACGGAC CGCCGATGGCGAAAGCACGTCCGAGAACGGATCCGACAGTGAAGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCCGATTAG ATACCCGGGTAGTCTGCGCGTAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAGGG AAGCCGCTAAGCAGACCCGCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGAGCACTACAA CCGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACCGCGACATCTGCCAGCATCGACTGTAGTAATGACGATCAGTT TGATGACCTTACGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCGCTCAGCTCGTACCGTGAAGGCGCTGTTAAGT AGGCAACGAGCGAGACCCGACCCCTTACTTCCAGCAGTTCGGCGAGGTAGCTGGGACAGTAGGGGGACCGCCG TGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGGGCTACA |

ATGGTCGAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTGTGGGCT
GCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCTGCTCCTT
GCACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCGGATGAGGCGTACTTCGTACGTCGTA

M5 AGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTATCCCTAAGGCGGTACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGC
CAGCCGCCGCGGTAATACCGGCAGCCAAAGTCATGGCCGATCTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCG
CAAGTCCATCGGAAATCCACCTGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTAGAAA-
CTGCGTGGCTTGGACCGGAAGGCGGACGGTACGTCCGGGTAGGAGTAAATCCCGTAAT-
CCTGGACGGACCGCGATGGCGAAAGCACGTCCGCGAAGCGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCGAGGGTCTC
GAACCGGATTAGATACCC-
GGGTAGTCTGGCCGTAACAAATGTTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCCGTAAGGGAAA
GCCGTAAGCAGACCGC

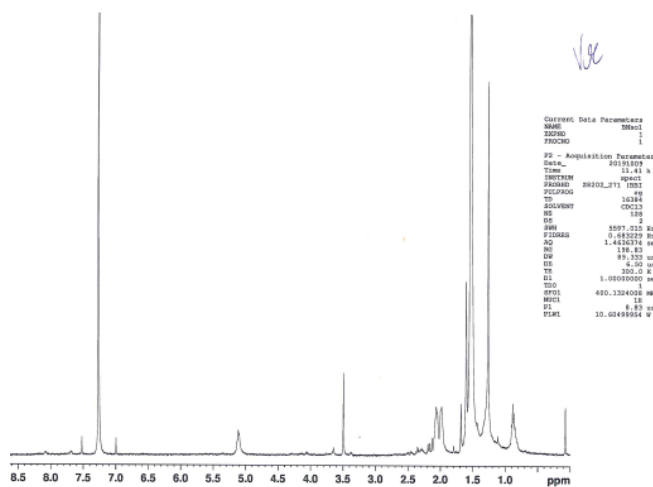
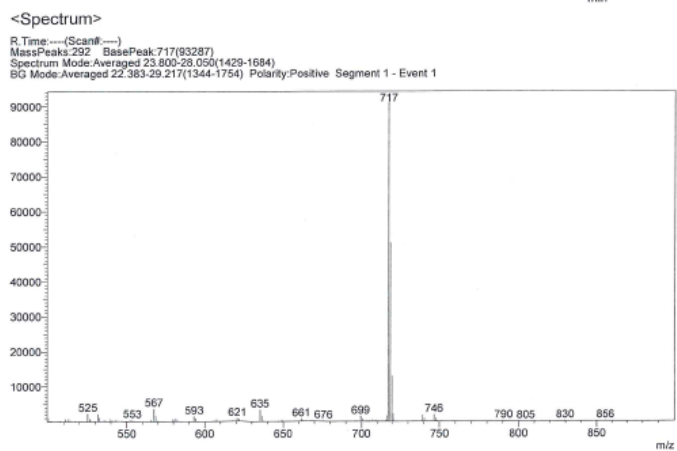
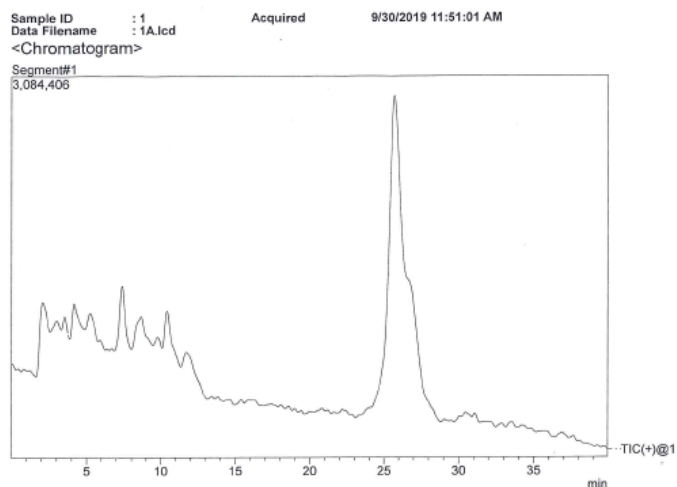
M6 CCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCGGAACACAAT
ACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCC
GAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATG
AGAGTGAAACCTGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTAC
ACTGCACGACAGTGCATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTA
CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCCGATCTTAT
TGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACAGGTGGGCGCCCGGTA
GAAACTGCGTGGCTTGGACCGGAAGGCGGACGGTACGTCCGGGTAGGAGTAAATCCCGTAATCCTGGAC
GGACCGCGGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGAACCGG
ATTAGATACCAGGGTAGTCCCTGGCCGTAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTGTGCC
GTAGGGAAAGCGCTAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGC
ACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACCGCGACATCTCACCAGCATCGACTGTAGTAATGACGA
TCAGTTGAGGATTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTACGCTCGTACCGTGAAGCGCTCTGT
TAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAGCTGGGGACAGTAGGGGGA
CCGCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCGAATGTGCTGGGCAACACGCGG
GCTACAATGGTGCAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGATTG
TGGCTGAAACCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCCTG
CTCCTTGACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGTACGTCG

M7 CCATGCTAGTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCGGAACACAAT
ACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCTCCGGCGCC
GAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTATGGGTATG
AGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGGAAACCTTTAC
ACTGCACGACAGTGCATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAAGGCGGTA
CCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCCGAGTATGGCCGATCTTAT
TGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGACAAAGTCCATCGGAAATCCACCGCCCAACGGTGGGCGTCCGGTG
GAAACTGTGTGGCTTGGACCGGAAGGCGGACGGTACGTCCGGGTAGGTCCGACAGTGAGGGACGAAAGCC
AGGGTCTCGAACCGGATTAGATACCAGGGTAGTCTGCGCGTAAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGA
GTGGGTGCTGTGCCGTAGGGAAAGCCGCTAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGA
ATTGGCGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTAATTGGACTCAACCGCGGACATCTCACCAGCATCGA
CTGTAGTAATGAGCATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTACGCTG
CGTGAGGCGTCTGTAAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAGCTG
GGGACAGTAGGGGGACCGCCGTGGCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTAGTATGCCCGAATGTG
CTGGGCAACACGCGGGCTACAATGGTGCAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCG
ATCGTAGTTCGGATTGTGGGCTGCAACTCGCCACAGCTGGGAAGTACGTCCGTAAGTTCGGTAGTAATCGCGT
GGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGT
ACGT

M8 CGATNTNGCCNTGCTAGTTCGCACGAGTTCAGACTCGTGGCGAATAGCTCAGTAACACGTGGCCAACTACCCTTCG
GAACACAATACCCTCGGGAAACTGAGGCTAATAGTGTATACCATACCACACTGGAATGAGTGGTATGCCAAACGCT
CCGGCGCCGAAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAAACGGCCACCGTGCCAATAATCGGTAT
GGTTCATGAGAGTGAGAACCCAGAGACGGAATCTGAGACAAGATTCCGGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAA
ACCTTTACTGACGACAGTGCATAGGGGATCCCAAGTGCACAGGCATAGCGCCTGTGCTTTTCGGTACCCTAA
GGCGGTACCAGAATAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGTAATACCGGCAGCCCAAGTATGGCC
GATCTTATTGGCCCTAAAGCGTCCGTAGCTGGCCGCGCAAGTCCATCGGGAAATCCACCTGCTCAACAGGTGGGCG
CCCGGTAGAACTGCGTGGCTTGGACCGGAAGGCGGACGGTACGTCCGGGTAGGAGTAAATCCCGTAATC
CTGGACGGACCGCCGATGGCGAAAGCACGTGCGGAGAACGGATCCGACAGTGAGGGACGAAAGCCAGGGTCTCGA
ACCGGATTAGATACCAGGGTAGTCTGGCCGTAACAATGTCTGCTAGGTGTGGCTCCCACTACGAGTGGGTGCTG
TGCCNTAGGGAAGCCGCTAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGG
GAGCACTACAACCGGAGGAGCTTGGGTTAATTGGACTCAACCGCGGACATCTCACCAGCATCCAATGTAGTAATG
CCGATCAGGTTGATGACCTTATCCGAGCTTCAGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTACGCTCGTGGCGTGGGCGTC
CTGTTAAGTCAGGCAACGAGCGAGACCCGCACCCTTACTTGCCAGCAGTACCGCGAGGTAGCTGGGGACAGTAGG
GGCCNCCGTCCCTAACACGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTACGATGCTCCGAATGTGCTGGGCAACACCG
GGGCTACAATGGTGCAGACAAAGGGTTCCAACCTCCGAAAGGAGACGGTAATCTCAGAACTCGATCGTAGTTCGGAT
TGAGGGCTGCAACTCGCCACATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCGCGTGTACAAGCGCGCGGTGAATACGTCCC
TGCTCCTTGACACACCGCCCGTCAAAGCACCCGAGTGAGGTCCGGATGAGGCGTACCTCGTAC

2 Cromatogramas de espectrómetro de masas (HPLC/MS) y de espectro H-NMR

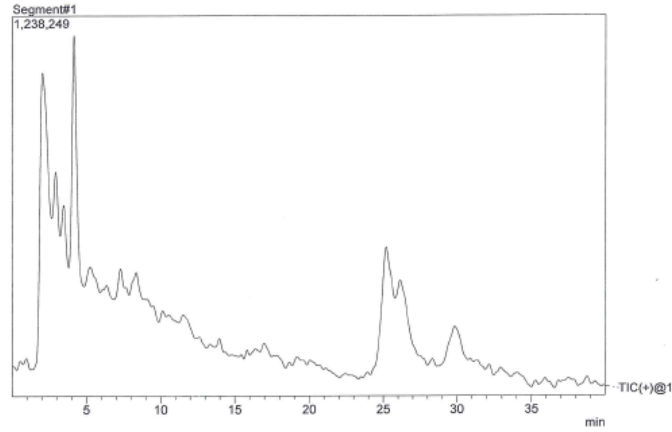
M1



M2

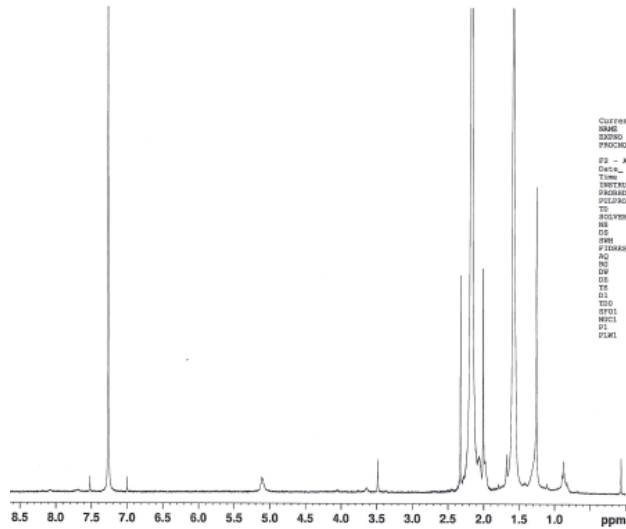
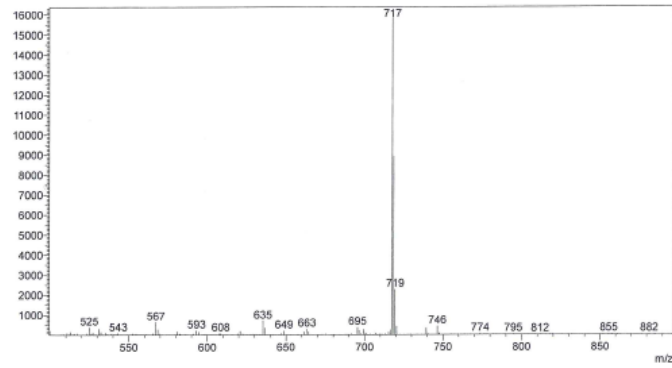
Sample ID : 1
Data Filename : 2B.lcd
Acquired 9/30/2019 2:39:06 PM

<Chromatogram>



<Spectrum>

R Time: ---(Scan#: ---)
Mass Peak: 243 Base Peak: 717(16222)
Spectrum Mode: Averaged 24.167-27.483(1451-1650)
BG Mode: Averaged 23.217-28.583(1394-1716) Polarity: Positive Segment 1 - Event 1

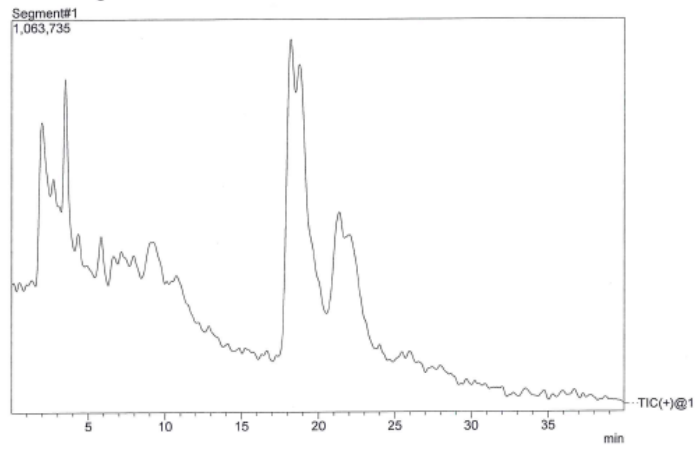


Current Data Parameters
NAME: M202
EXNO: 1
PROCNO: 1

P2 - Acquisition Parameters
Date_: 20191009
Time: 11.51 h
INSTRUM: spect
PROCNO: M202_#11 IN01
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: CDCl3
NS: 128
DS: 4
SWH: 5597.315 Hz
FIDRES: 0.083279 Hz
AQ: 1.4626374 sec
RG: 185.43
DW: 89.353 usec
DE: 6.20 usec
TE: 300.2 K
D1: 1.00000000 sec
TSD: 400.1324018 MHz
SFO1: 1H
P1: 6.89 usec
PL1: 10.00499984 W

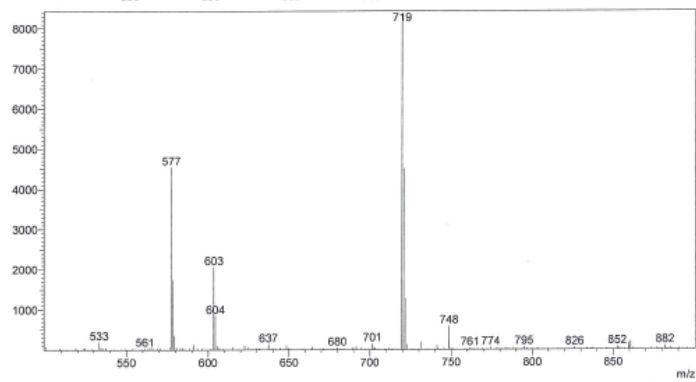
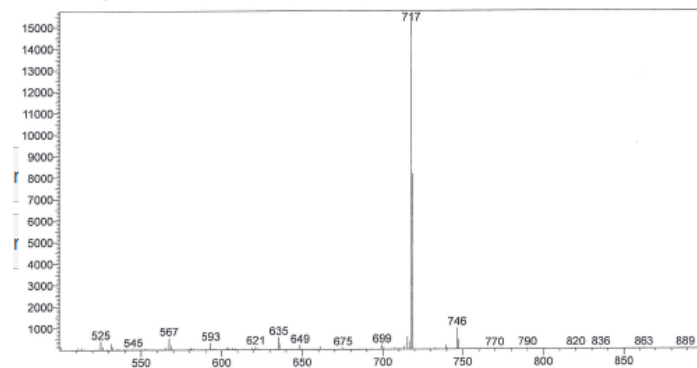
M4

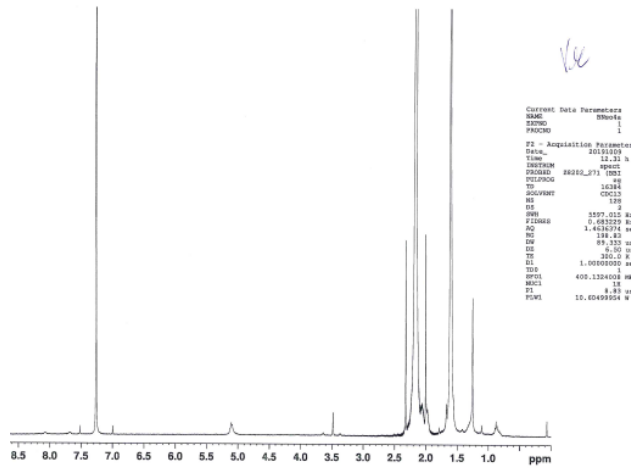
Sample ID : 1 Acquired 10/1/2019 9:29:53 AM
Data Filename : 4B.lcd
<Chromatogram>



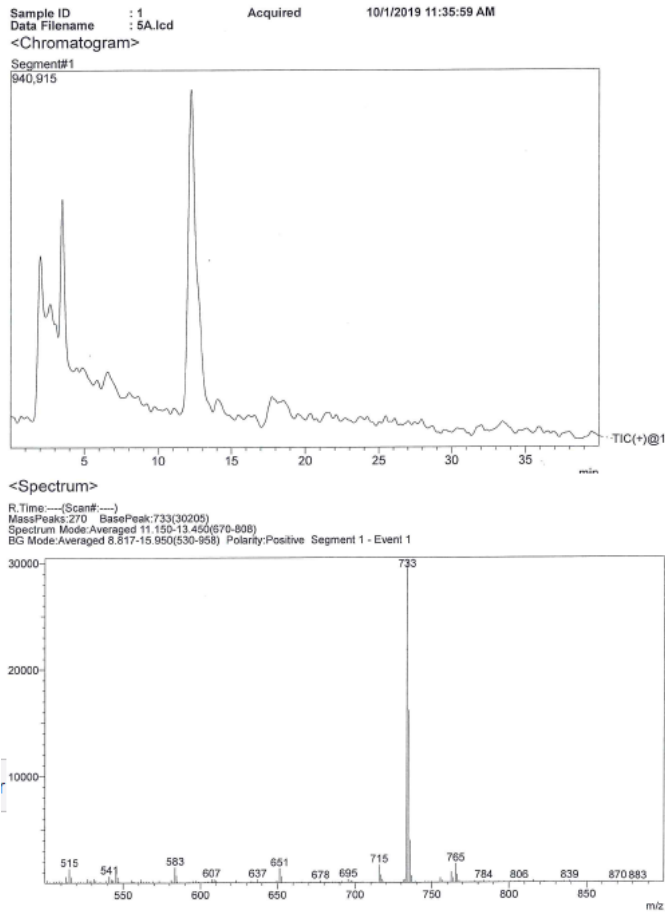
<Spectrum>

R.Time:----(Scan#:---)
MassPeaks:234 BasePeak:717(15596)
Spectrum Mode:Averaged 16.957-20.500(1013-1237)
BG Mode:Averaged 16.400-21.117(985-1266) Polarity:Positive Segment 1 - Event 1





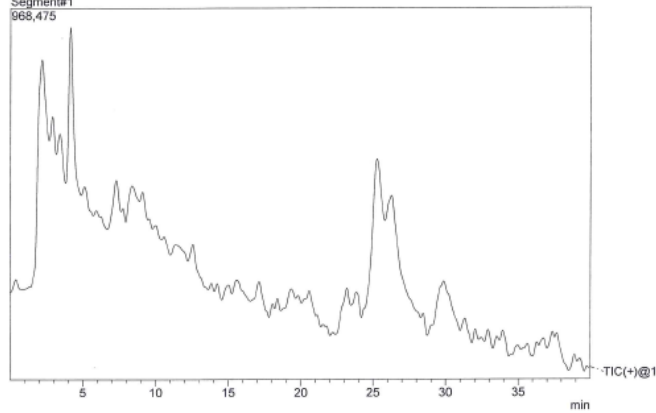
M5



Sample ID : 1 Acquired 9/30/2019 1:57:05 PM
Data Filename : 5C.lcd

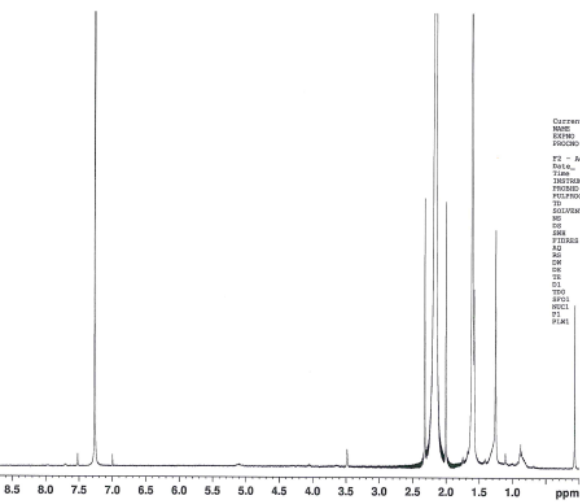
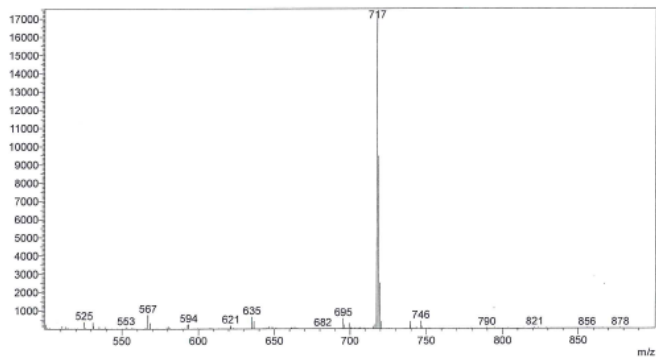
<Chromatogram>

Segment#1
968,475



<Spectrum>

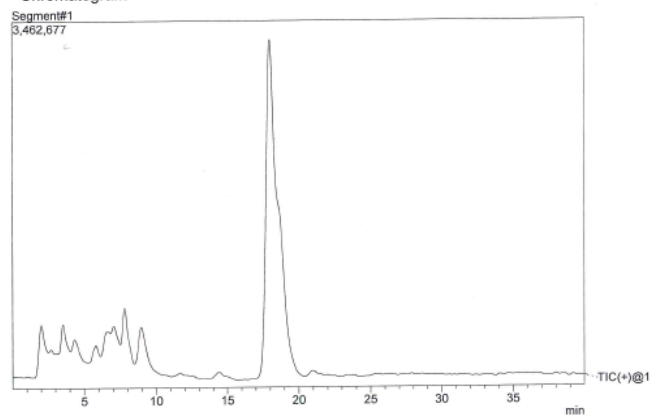
R Time:---(Scan#---)
MassPeak: 185 BasePeak: 717(17379)
Spectrum Mode: Averaged 24.350-27.467(1462-1649)
BG Mode: Averaged 22.683-26.783(1362-1728) Polarity: Positive Segment 1 - Event 1



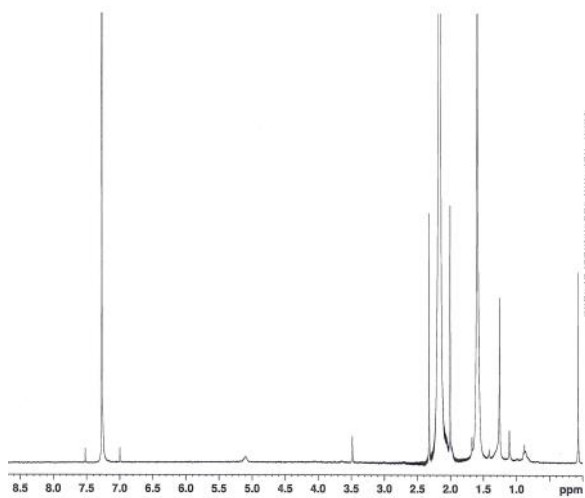
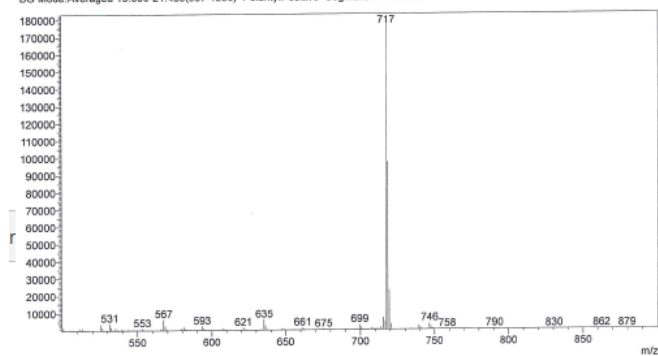
Current Data Parameters
NAME 880006
SOLVENT 1
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20191029
Time 12:15 h
INSTRUM spect
PROCNO 2022_371_0001
PULPROG zg
TD 16384
SOLVENT CDCl3
NS 128
DS 2
SFR 5097.012 Hz
F2RES2 0.605229 Hz
AQ 1.452374 sec
RG 195.03
OR 89.383 use
DE 6.125 use
CR 1.80000000 use
SFO 0
SFO2 400.1324000 MHz
RGCL 0
PI 0.83 use
PULPR 13.404899254 use

M6

Sample ID : 1 Acquired 10/1/2019 10:11:55 AM
Data Filename : 6A.lcd
<Chromatogram>



<Spectrum>
R. Time:---(Scan#:---)
MassPeaks:334 BasePeak:717(181367)
Spectrum Mode:Averaged 16.867-19.967(1013-1199)
BG Mode:Averaged 15.600-21.483(937-1290) Polarity:Positive Segment 1 - Event 1



Current Data Parameters
NAME 28464
EXPNO 1
PROCNO 1
F2 - Acquisition Name
Date_ 20191009
Time 10:11:55
INSTRUM spect
PROBHD 5MMQ1H1
PULPROG zgpg30
SOLVENT CDCl3
NS 1024
DS 4
SFO 5091.013
FIDRES 0.460359
AQ 1.4625716
RG 64
DM 69.333
DE 1.00
TE 300.2
SI 1.60000000
SFO 400.1324000
NUC1 13
P1 0.00
P2 0.00
P3 18.48499954

M7

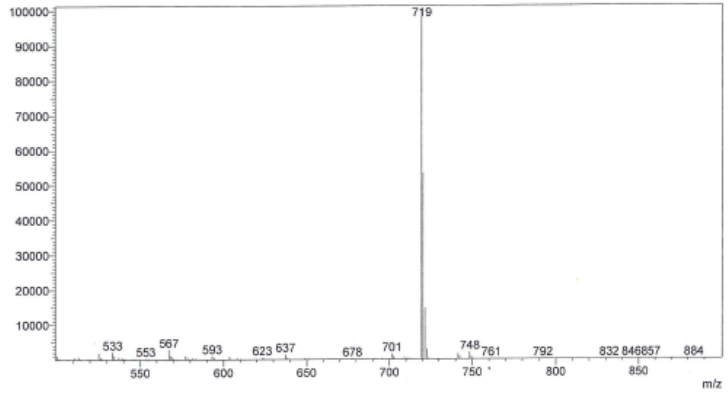
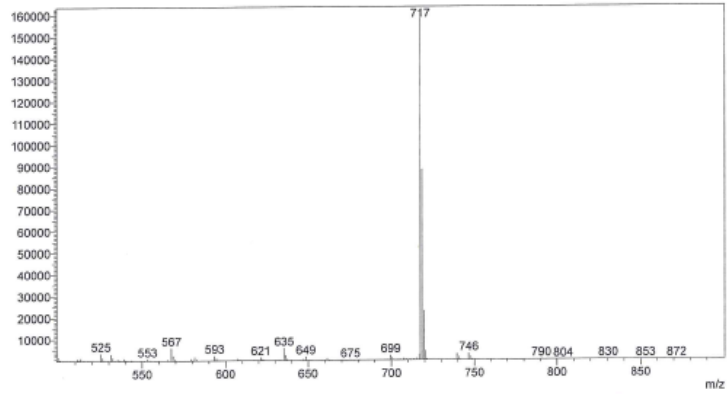
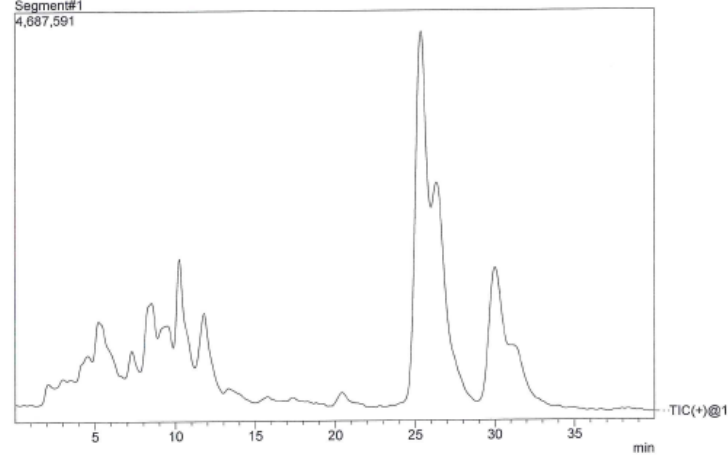
Sample ID : 1 Acquired 9/30/2019 1:15:05 PM

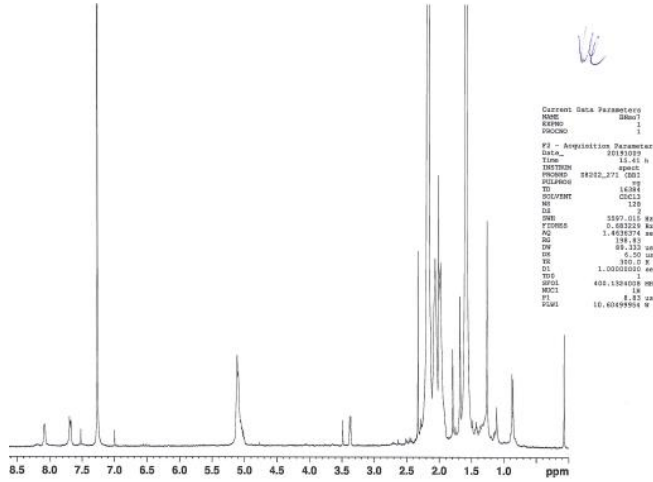
Data Filename : 7.lcd

<Chromatogram>

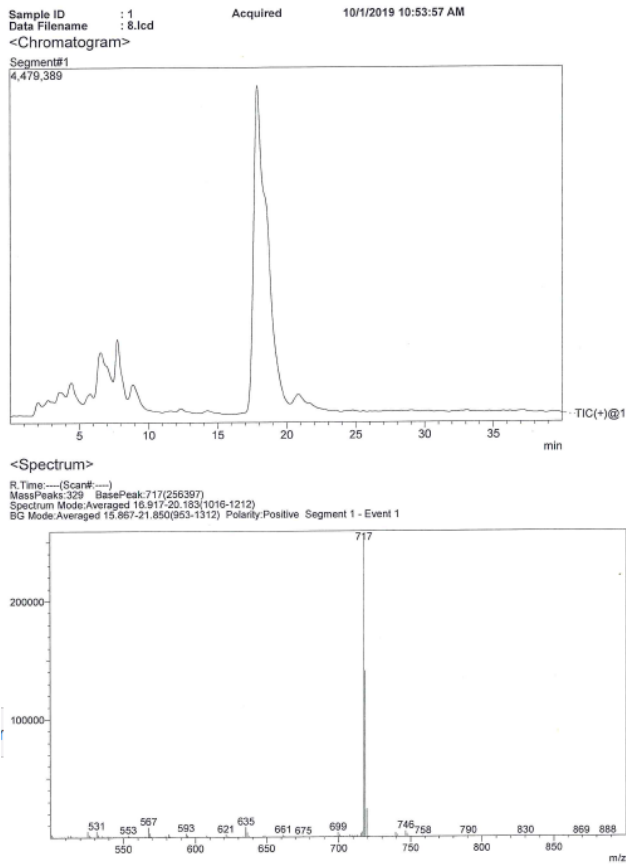
Segment#1

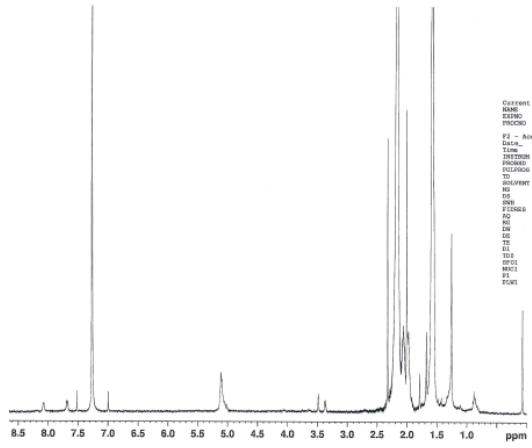
4,687,591





M8





16

```

Current Data Parameters
NAME          88888
EXPNO        1
PROCNO       1
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20150209
Time         14.31 A
INSTRUM      zgpg30
PROBHD       zgpg30z1 5mm1
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      CDCl3
NS           180
DS           4
SWH           5507.811 Hz
FIDRES       0.481229 Hz
AQ           1.421874 sec
RG           384.83
WDW           EM
SSB           0.333 sec
LB           0.30
GB           0.00
HY           300.0 Hz
EL           1.00000000 sec
RG          1
AQ          1
SFO          400.1304000 MHz
NUC1         13
P1           8.83 usec
PL1          0.00000000 usec
SFO2         10.6289904 MHz
  
```