



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

**CAMPUS GUANAJUATO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

---

---

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS ENDÉMICOS DE PIELES  
PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA DE LA  
CURTIDURÍA POR ESPECTROMETRÍA DE  
MASAS”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO ALCOCER VELÁZQUEZ**

**GUANAJUATO, GTO., AGOSTO DEL 2019**



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

**CAMPUS GUANAJUATO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

---

---

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS ENDÉMICOS DE PIELES  
PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA DE LA  
CURTIDURÍA POR ESPECTROMETRÍA DE  
MASAS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO ALCO CER VELÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. ALMA ROSA CORRALES ESCOBOSA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. KAZIMIERZ WROBEL ZASADA**



UNIVERSIDAD  
DE GUANAJUATO

Guanajuato, Gto. 21 de Julio de 2019

**Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez**  
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas  
Universidad de Guanajuato  
Campus Guanajuato  
PRESENTE

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo **“Aislamiento e Identificación de Microorganismo Endémicos de Pieles Procedentes de la Industria de la Curtiduría por Espectrometría de Masas”**, realizado por el alumno **C. Alejandro Alcocer Velázquez**, para obtener el título de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. El proyecto se llevó a cabo en las Instalaciones del Departamento de Química de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato.

Sin otro tema adicional que tratar, nos despedimos usted, agradeciendo la atención prestada y quedando a sus órdenes para cualquier aclaración

ATENTAMENTE

Alma Rosa Corrales Escobosa  
Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa  
Director

Kazimierz Wrobel Zasada  
Dr. Kazimierz Wrobel Zasada  
Co-Director

**CAMPUS GUANAJUATO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
Sede Noria Alta: Col. Noria Alta s/n  
Teléfono: 01 (473) 73 2 00 06, ext. 6001 y 6002  
Sede Pueblito de Rocha: Cerro de la Venada s/n Col. Pueblito de Rocha  
Teléfono: 01 (473) 73 2 75 55, ext. 5499  
Guanajuato, Gto., México; C.P. 36050  
[www.dcne.ugto.mx](http://www.dcne.ugto.mx)

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado en la convocatoria institucional 2019 al proyecto con número 016/2019.

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a los proyectos 253879 y 294024.

## DEDICATORIA

A mi madre por aconsejarme, soportar las tonterías que hago, así como los errores que he llegado cometer y aun así continuar apoyándome, sirviendo como guía en este largo tiempo.

A mis hermanos (Edgar, Caro, Gaby) por estar presentes en las buenas y malas, al igual que mamá; nos apoyamos y aconsejamos.

A todos esos amigos y compañeros de confianza que he llegado a conocer a lo largo de la carrera que a pesar de que no tomemos los mismos caminos, sabemos que nos podemos orientar a pesar de las distancias.

Al grupo de estudio por permitirme ser parte de ellos, logrando obtener nuevas experiencias, conocimientos y amistades.

A la Dra. Eunice y la M.C. Bianey García, la primera por darme a conocer el grupo de estudio, orientarme sobre lo que trabajan en este. a Bianey por guiarme dentro del grupo, así como auxiliarme con la experimentación, el ser una gran compañera y amiga.

Y principalmente a la Doctora Alma por permitirme el desarrollar este proyecto y convertirse en mi asesor, guiándome el cómo desarrollarlo, haciéndose responsable en las cosas en las que llegue a equivocarme, así como el apoyarme en este tiempo.

Gracias a todos.

## Tabla de contenido

LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
INDICE DE FIGURAS .....	v
INDICE DE TABLAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
1. INTRODUCCION .....	1
1.1. Proceso del curtido de pieles .....	3
1.2. Principales microorganismos presentes en las pieles durante el proceso de curtido .....	7
1.3. Control del crecimiento de microorganismos en cueros .....	10
1.4. Métodos de identificación de microorganismos .....	13
1.4.1. Identificación de microorganismo por MALDI-TOF MS y uso del sistema Biotyper™ .....	17
2. JUSTIFICACIÓN .....	21
3. HIPÓTESIS .....	22
4. OBJETIVOS .....	23
4.1. General .....	23
4.2. Específicos .....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
5.1 Muestras .....	24
5.2. Reactivos .....	24
5.2.1. Medios de cultivo para el aislamiento, crecimiento y preservación de microorganismos .....	24
5.3. Equipo de laboratorio .....	25
5.3.1. Equipo utilizado en el procesamiento de muestras o preparación de los reactivos .....	25
5.3.2. Instrumentación analítica .....	26
5.4. Programas para análisis de datos .....	26
5.5. Parte experimental .....	27
5.5.1. Evaluación del aspecto físico de las pieles .....	27
5.5.2. Preparación de soluciones estándares de biocidas .....	27
5.5.3. Determinación de concentración de PCMC, OPP, TCMTB y OIT en muestras comerciales de biocidas .....	28

5.5.4. Determinación de la concentración de biocidas en las muestras de pieles .....	28
5.6. Aislamiento de microorganismos en pieles “cuero azul” .....	29
5.6.1. Obtención de esporas .....	29
5.6.2. Caracterización morfológica de los microorganismos .....	30
5.7. Crecimiento de microorganismos en medio líquido para la identificación por MALDI-TOF .....	30
5.7.1. Cultivo de aislados bacterianos y extracción de proteínas .....	30
5.7.2. Cultivo de aislados fúngicos y extracción de proteínas .....	31
5.8. Identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS BIOTYPER™ .....	32
5.9. Creación de base de datos.....	33
5.9.1. obtención de espectros de masas .....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
6.1. Análisis de pieles “cuero azul” .....	37
6.2. Análisis de biocidas utilizados en la industria de la curtiduría .....	40
6.3. Identificación de microorganismos aislados de muestras de cuero azul .....	43
6.3.1. Bacterias aisladas en pieles .....	44
6.3.2. Hongos aislados de pieles.....	50
6.4. Creación de espectros de masas principales (MPS).....	62
7. CONCLUSIONES .....	68
8. PERSPECTIVAS .....	69
REFERENCIAS .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>significado</b>
a. u.	Intensidad
AFLP	Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
API	Índice analítico de perfil
ARDRA	Evaluación del análisis de restricción de rDNA amplificado
BMC	2-benzimidazol-il-metil-carbamato
BTS	Test de estándar bacteriano
Cr <sup>+3</sup>	Cromo Trivalente
Cr <sup>+6</sup>	Cromo Hexavalente
Da	Dalton
DBNP	2,2-dibromo-3-nitripropionamida
DIMTS	Diyodometil-p-tolilsulfona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAB	Fragmento de Unión de Antígeno
FAME	Esteres metílicos de los ácidos grasos
FTIR	Espectroscopia Infrarroja de transformada de Fourier
HCCA	Ácido $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinámicos
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
IPBC	3-yodo-2-propinil-N-butilcarbamato
ITS	Espaciador transcrito interno
ISTD	Estándar Interno
KDDC	Dimetilditiocarbamato de potasio
kV	kilo Volt
LB	Luria Bertani
m/z	Relación masa-carga
MALDI	Desorción-ionización con láser asistida por matriz
MBT	MALDI Biotyper™
MeCN	Acetonitrilo
MLSA	Análisis de secuencia multilocus
MLST	Tipificación multilocus de secuencias

MS	Espectrometría de masas
MSP	Espectro principal de masas
MTB	2-mercaptobenzotiazol
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	nanómetros
OIT	n-octil-isotiazolinona
OPP	orto-fenil-fenol
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCMC	4-cloro-3 metil- fenol
PCP	Pentaclorofenol
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PD	Papa-Dextrosa
PDA	Agar Papa-Dextrosa
pH	Potencial de hidrógeno
PMA	Acetato de fenil mercurio
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PPO	Polifenol oxidasa
ppm	Partes por millón
RAPD	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico
REP	Elemento palíndromos repetitivos
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TCMTB	2-tiocianometil-tio-benzotiazol
TOF	Tiempo de Vuelo
<i>x g</i>	Fuerzas G
2-BPB	2,2-bis (4-hidroxifenil) butano
4-CMF	4-Clorometilfurfural

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de un proceso típico en la industria del curtido .....	5
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de biocidas comúnmente utilizados en la industria para prevenir el crecimiento de microorganismos en el cuero .....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema general de los métodos comúnmente utilizados para la tipificación microbiana, con estimaciones de los niveles de resolución esperados para cada método. ....	16
<b>Figura 4.</b> Etapas de identificación de microorganismos por MALDI-TOFMS con Biotyper™ .....	18
<b>Figura 5.</b> Ejemplo de espectro de masas con diferentes rangos de masas .....	34
<b>Figura 6.</b> Ejemplo de espectro de masas con baja intensidad .....	35
<b>Figura 7.</b> Apariencia de las distintas muestras de piel “cuero azul” analizadas ....	38
<b>Figura 8.</b> Típicos cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC de una solución preparada que contenía los estándares auténticos .....	41
<b>Figura 9.</b> Cromatograma obtenido de análisis por HPLC del biocida Ecosoft. ....	42
<b>Figura 10.</b> Cajas de Petri con distintas muestras bacterias hechas por triplicado.	45
<b>Figura 11.</b> Distribución de los aislados bacterianos de las pieles clasificados según su identificación por MALDI-Biotyper™ usando la base de datos de Bruker Daltonics .....	47
<b>Figura 12.</b> Dendograma PCA de los aislados Bacterianos .....	48
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de espectros de masas de la muestra F11 obtenido por dos métodos de extracción .....	53
<b>Figura 14.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos A1 y A2 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada A .....	57
<b>Figura 15.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos B22 y B23 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada B ...	57
<b>Figura 16.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos C1B, C11, C21, C221 y C23 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada C.....	58
<b>Figura 17.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos D11, D121, D121A, D12, D213, D221, D222 y D224 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada D.....	59
<b>Figura 18.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos E1 y E2 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada E .....	60
<b>Figura 19.</b> Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos F11, F131, F132, F21, F21A, F22 y F241 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada F .....	61

<b>Figura 20.</b> Análisis de componentes principales (PCA) de los espectros de masas de los aislados fúngicos. ....	62
<b>Figura 21.</b> Dendograma PCA de los espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de las cepas fúngicas aislados de pieles “cuero azul”. Para cada aislado se utilizó tres replicas.....	64
<b>Figura 22.</b> Comparación entre los espectros de masas de los hongos utilizados para crear la librería local. La relación m/z es de 2500 a 10000.....	65

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones utilizadas para el análisis de biocidas mediante HPLC .....	28
<b>Tabla 2.</b> Valores de rango de masas del calibrante obtenidos contra rango de masas de referencia. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Parámetros usados en el equipo MALDI-TOF MS .....	33
<b>Tabla 4.</b> Descripción del aspecto físicos de las muestras de piel “cuero azul” evaluadas y lista general de bacteria y hongos aislados .....	39
<b>Tabla 5.</b> Concentración de biocidas en muestras líquidas de biocidas comerciales determinadas por HPLC-DAD.....	41
<b>Tabla 6.</b> Determinación de la concentración de PCMC, OPP, <i>TCMTB</i> y OIT en muestras de piel “cuero azul” utilizadas en este estudio.....	43
<b>Tabla 7.</b> Descripción de características macroscópicas e identificación por MALDI-Biotyper™ de las cepas bacterianas aisladas de pieles “cuero azul”.....	46
<b>Tabla 8.</b> Características morfológicas de las 26 cepas fúngicas aisladas de seis diferentes muestras de piel “cuero azul”. ....	51
<b>Tabla 9.</b> Identificación por MALDI-Biotyper™ de las cepas fúngicas aisladas de pieles “cuero azul” utilizando la base de datos de Bruker Daltonics .....	54
<b>Tabla 10.</b> Identificación por MALDI-Biotyper™ de los aislados fúngicos utilizándolo la base de datos local y la Bruker Daltonics.....	66

## RESUMEN

La industria del cuero conocida como curtiduría es una de las industrias más antigua creadas por el hombre ya que este material les sirvió en épocas antiguas para protegerse del clima, animales y ambientes de manera general posteriormente se refinaron las técnicas de obtención de pieles dando un mayor uso y aplicaciones a esta, desde revestimientos para muebles, aplicaciones en vehículos para dar sensación de comodidad, así como en el calzado y la moda.

De forma ordinaria, la piel se obtiene como producto secundario de la carne y el cuero es piel de origen animal a la cual se le dio un tratamiento químico, otorgándole características como maleabilidad y resistencia a la putrefacción; para realizarlo regularmente se usan pieles de origen bovino, aunque puede usarse otro tipo de pieles como de reptiles, aves y animales marinos, aunque con menor frecuencia.

Uno de los problemas que enfrenta la industria del cuero es el biodeterioro a causa de la actividad microbiana. afectando la apariencia debido a cambios en las características fisicoquímicas, manchas, problemas con el teñido e irregularidades de acabado de las pieles. La baja calidad del producto puede provocar pérdidas económicas significativas. Con el fin de evitar el biodeterioro de las pieles es necesario llevar un control adecuado enfocado en la prevención del crecimiento microbiano mediante el uso de biocidas en el proceso de fabricación y la identificación de microorganismos.

En este proyecto se tuvo como objetivo principal la identificación de microorganismos aislados de muestras de piel “cuero azul” mediante el sistema MALDI-TOF Biotyper™. Para ello, se obtuvieron seis muestras de piel “cuero azul” con notables signos de biodeterioro de los cuales se aislaron 20 cepas de bacterias y 26 hongos. Se lograron identificar 14 de las bacterias a nivel de especie y 5 a nivel

de género. Interesantemente, en todas las muestras de piel se encontró a *S. rubidaea*.

En resumen, se aislaron 20 bacterias de muestras de pieles “cuero azul” lográndose identificar 14 bacterias a nivel de especie y 5 bacterias a nivel de género, por lo tanto, MALDI-TOF Biotyper™ es una herramienta útil para la identificación de bacterias provenientes de pieles utilizando la base de datos proporcionada por el fabricante. Por otro lado, para la identificación de hongos filamentosos, es necesario llevar a cabo la ampliación de la librería y complementarla con la identificación molecular.

# 1. INTRODUCCIÓN

La fabricación de las pieles y cueros a partir del curtido de pellejos de los animales es una de los procesos de manufacturación más antiguos creadas por el hombre y que hasta hoy en día proporciona una amplia gama de bienes de consumo. La industria de la curtiduría, en conjunto con la del calzado y del vestir producen una amplia gama de artículos de uso personal como zapatos, cinturones, carteras, chaquetas, correas de reloj, bolsos y artículos de viaje. El cuero también puede emplearse en la fabricación de otros productos, como la tapicería para automóviles y muebles, etc.

A nivel Nacional, el estado de Guanajuato es el principal fabricante de cueros y de productos acabados de cuero y piel con un total del 76.4 % de la producción nacional y es el principal proveedor para la industria del calzado nacional [1]. Adicionalmente, en los últimos años debido al creciente desarrollo de la industria automotriz en la región, se ha incrementado significativamente la demanda en la producción de cuero para este sector. Tan solo en León, más del 60 % del producción de cuero es destinado a la industria automotriz [2].

Dentro de la industria de la curtiduría existen diferentes procesos de fabricación, que abarcan desde los procesos artesanales hasta el uso de tecnología de punta. Sin embargo, en ambos casos el proceso de fabricación sigue las etapas generales de pre-curtido o limpieza, curtido y post-curtido o acabado [3, 4]. Usualmente en esta industria se denomina “cuero” a las pieles provenientes de animales grandes (vacunos adultos y equinos), mientras que las “pieles” son las provienen de animales de menor tamaño (ovejas, cabras y terneros). No obstante, durante el proceso de curtido los términos pueden utilizarse de manera diferente, es decir, el término “piel” puede hacer referencia al material no curtido (putrescible), mientras que “cuero” hace referencia al material ya curtido (no deteriorable).

Antes y/o durante el proceso de fabricación, las pieles contienen gran cantidad de residuos y nutrientes disponibles (colágeno, carbohidratos, grasas y proteínas), lo que provee un medio perfecto para el rápido crecimiento microbiano, y si no se controla adecuadamente, puede provocar un producto final de mala calidad o inclusive afectar la salud de los trabajadores [5-9]. Con el fin de evitar daños permanentes en el cuero a causa del crecimiento o actividades microbianas, se recomienda inicialmente llevar a cabo la identificación de los microorganismos que causan el biodeterioro y la aplicación de biocidas para el control de crecimiento [6]. En la actualidad, un número relativamente pequeño de biocidas tienen una amplia aceptación debido a los altos costos y efecto adverso en el medio ambiente [3, 5, 9-11].

Las técnicas convencionales utilizadas para la identificación de microorganismos se basan en el cultivo de microorganismos y en la determinación de las características fenotípicas de los mismos. Sin embargo, estos métodos son laboriosos, requieren mucho tiempo (hasta tres días) y, a menudo, resultan inadecuados para la diferenciación fenotípica de especies similares, lo que culmina en una mala identificación o no identificación de los microorganismos. Cabe señalar que un buen estándar de identificación corresponde a los métodos moleculares como es la secuenciación de los genes ribosomales 16S (bacterias) o de regiones intergénicas ITS (hongos) o el análisis multilocus. Sin embargo, es necesario llevar algunos pasos previos como, extracción de DNA, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región de el(los) gen(es) de interés (por ejemplo, 16S o ITS), purificación del producto de amplificación y finalmente enviarlo a secuenciar [12, 13]. Una alternativa a los métodos tradicionales de identificación de microorganismos es el uso de espectrometría de masas (MS) con desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI) acoplada a un tiempo de vuelo (TOF) [14, 15].

Actualmente, MALDI-TOF MS es una herramienta usada en diferentes áreas de estudio y en aplicaciones rutinarias (por ejemplo, en diagnóstico clínico) para una

rápida, precisa y relativamente barata identificación y tipificación de bacterias y hongos de cultivos puros [16]. Esta estrategia se basa en la obtención de perfiles de las proteínas más abundantes (ribosomales) de células intactas o extractos crudos de los microorganismos; los cuales constituyen la “huella digital” del organismo y se compara con espectros de referencia presente en la base de datos [17]. Sin embargo, la identificación en muestras ambientales es aún limitada, ya que los espectros de referencias están constituidos principalmente por muestras de importancia clínica o alimentaria, por lo que en muchos casos aun es necesario llevar a cabo la ampliación de la librería de referencia mediante la generación de espectros principales de referencia [18].

En este proyecto se propone la identificación de aislados microbianos procedentes de muestras de “cuero azul” tratadas con antibióticos mediante la técnica MALDI-TOF MS. La identificación en primer lugar se pretende realizar utilizando la base de datos proporcionada por el proveedor (Bruker Daltonics) y el software Biotyper™. Para los aislados que no fueran identificados con dicha base de datos, se crearán los espectros principales para general una base de datos local. De acuerdo con la literatura [5-11, 19-33], se han reportado diferentes especies de bacterias y hongos presentes en los materiales de pieles y cuero (piel cruda, pre-curtida, curtida o producto terminado) o en el ambiente durante las diferentes etapas del proceso de curtido. Con la finalidad de ampliar esta información, a continuación, se describe la revisión bibliográfica del proceso general de curtido de las pieles, los principales organismos identificados, los métodos de control para evitar su proliferación y daño permanente a las pieles, así como las técnicas más comunes de identificación de microorganismos.

## **1.1 Proceso del curtido de pieles**

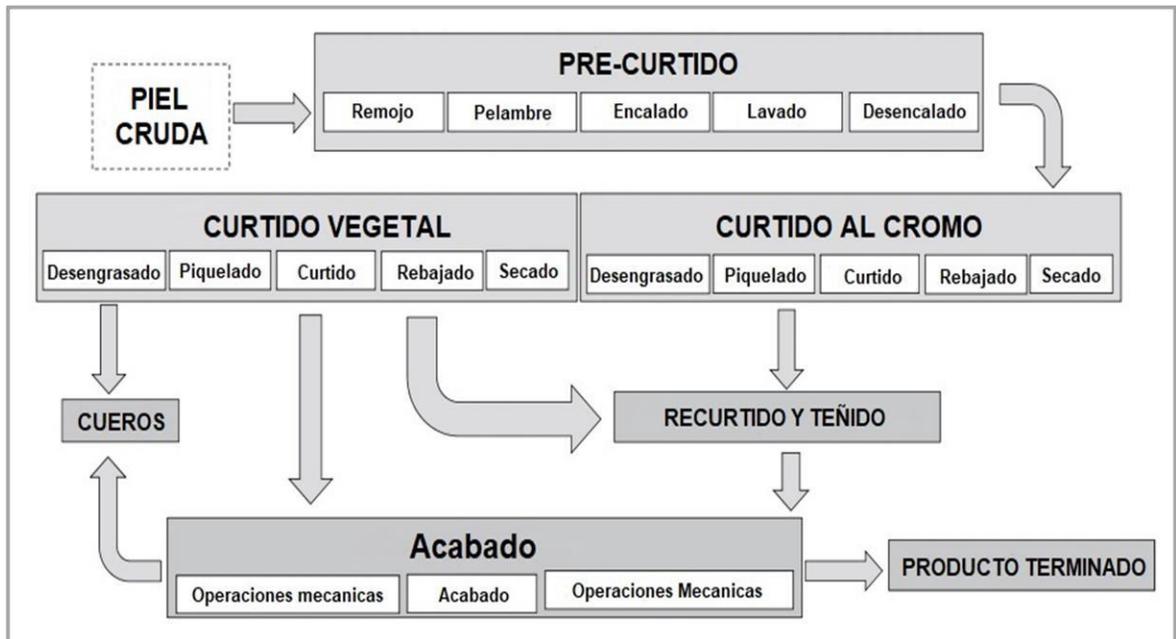
Las *pieles* de los animales en “crudo” son un valioso producto de la industria cárnica y la mayoría de esas pieles se convierten en *cuero*. Entre los animales destinados para la fabricación de cuero se encuentra principalmente las vacas,

cabras, ovejas, cocodrilos, etc. Después de que los animales son sacrificados, se obtiene las pieles en crudo, las cuales pueden llegar a poseer una gran cantidad de microorganismo y convertirse en un medio óptimo para su crecimiento. Para evitar esto, las pieles son inmediatamente refrigeradas o congeladas y tradicionalmente “curadas” principalmente con NaCl para su preservación por más tiempo. Con este proceso se elimina el agua de la piel y se reduce la actividad del agua de la humedad restante, lo que evita no solo el crecimiento de los microorganismos, sino también las posibles actividades enzimáticas que puedan causar el biodeterioro de la pieles antes de ser transformadas a cueros [3, 4, 34].

Una vez que las pieles en bruto han sido curadas, las pieles son transportadas a la curtiduría donde se llevan a cabo el proceso de “pre-curtido”, también conocido como limpieza o “Rivera” llamado así debido a que se solía realizar cerca de riachuelos. Las etapas de este proceso consisten en el remojo, pelambre, encalado, lavado y desencalado de las pieles (Figura 1) y consiste en la eliminación de la grasa y carnaza unidas todavía a la parte interna de la piel. Para ello, la piel se remoja en presencia de hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, detergentes o preparaciones enzimáticas para eliminar la sales, sangre y suciedad en general. Posteriormente, el pelo es eliminado con sulfuro de sodio y cal, lo que ocasiona que la piel se hinche y se abran sus fibras permitiendo el ingreso de los productos químicos usados en etapas posteriores. La cal y el sulfuro de sodio se eliminan y se procede al descarnado mecánico de la grasa natural, así como el empleo de desengrasantes químicos y enzimáticos. Finalmente, la piel se prepara para la etapa del curtido, mediante la utilización de principalmente ácido fórmico y sulfúrico (aporte de protones y unión con grupos carboxílicos), permitiendo la difusión del curtiente hacia el interior de la piel sin que se fije en las capas externas del colágeno [3, 35].

La segunda etapa es el “Curtido” propiamente dicho, en este proceso se logra impartir estabilidad química y física a la piel evitando su putrefacción y haciéndola resistente a cambios de temperatura, humedad y a la degradación de

microorganismos. En general, dependiendo de la aplicación final del cuero, se utilizan dos métodos de curtido; cromado o curtido vegetal, en ambos se llevan los pasos de desengrasado, piquelado, curtido, rebajado y secado (Figura 1).



**Figura 1. Diagrama de flujo de un proceso típico en la industria del curtido (Tomado de [3]).**

En el proceso de curtido vegetal se emplean diversos taninos orgánicos como aldehídos, aminoácidos o vegetales de alto peso molecular y generalmente requiere de tres semanas para que el tinte penetre a la piel. Además, las pieles se sumergen en bicarbonato de sodio o tambores de ácido sulfúrico para la decoloración y para la eliminación de los taninos unidos a la superficie. Antes de secarse, se pueden agregar lignosulfonato, azúcar de maíz y aceites al cuero. Y luego se someten a más pasos de acabado [36]. Alternativamente, en el proceso de curtido al cromo se utilizan sales inorgánicas, especialmente sales de cromo trivalente ( $Cr^{+3}$ ) y la piel curtida por este procedimiento se denomina “**cuero azul**” o con el término inglés “Wet blue” el cual es clasificado según su grosor y calidad para su proceso de acabado. El pH del cuero curtido al cromo finaliza entre 3.8 y 4.2. Antes de pasar a la etapa de acabado, se procede a realizar una operación mecánica quitando gran

parte de la humedad, realizando también operaciones de recurtido y teñido [2, 3, 35].

El producto obtenido por este proceso generalmente es de calidad superior al obtenido por curtido con vegetales debido a su suavidad, alta estabilidad térmica y al agua, en un tiempo menor. Sin embargo, tiene un fuerte impacto en el medio ambiente debido a la contaminación de aguas residuales y la dificultad para deshacerse de los sólidos [35]. Cabe señalar que el curtido vegetal tampoco es un proceso libre de contaminación, ya que las aguas residuales generadas también son difíciles de tratar [31, 37].

Por último, el tercer paso consistió en el “Acabado” del cuero y reside en la aplicación de diversas operaciones mecánicas con la aplicación de anilinas o pigmentos dispersos, lacas de nitrocelulosa o poliuretanos, esto imparte al cuero características para cada tipo de producto final (gamuza, charol etc.) [3, 35].

Una preocupación adicional a la problemática de contaminación generadas por los residuos durante el proceso de producción del cuero en la Industria [35], está relacionada la calidad de las pieles y biodeterioro a causa de la proliferación de los microorganismos que pueden llegar a resistir condiciones extremas de acidez y alcalinidad durante la fabricación del cuero. En general, dependiendo del pH, el suministro de nutrientes y el contenido de agua, los microorganismos pueden crecer y causar daños en las pieles sin procesar o durante las diferentes etapas del proceso de curtido y, en consecuencia, las materias primas degradadas pueden producir cuero de calidad inferior e incluso afectar la salud de los trabajadores o ser transmitidos a los humanos en el producto final. Por ello, es muy importante evitar el crecimiento y proliferación de microorganismos, inicialmente mediante la identificación de los microorganismos y el uso de biocidas específicos [5].

## 1.2. Principales microorganismos presentes en las pieles durante el proceso de curtido

Existe diversos microbios que residen en la piel de humanos y animales. En la piel de humano se ha encontrado alrededor de 1000 especies diferentes de bacterias, hongos, virus y otros microbios [38]. La mayoría de ellos son inofensivos e incluso beneficiosos para los huéspedes humanos y animales. La colonización microbiana de la piel es variable y se basa en factores del hospedador endógeno, ubicación topográfica y factores ambientales exógenos. Por lo tanto, las pieles de animales que se utiliza para la fabricación del cuero contienen una gran variedad de microorganismos derivados del aire, el agua, el suelo, suciedad entre otros factores. Cuando el animal aún está vivo, la mayoría de estos tienen poco efecto sobre la piel, pero después de ser sacrificado el animal, la piel puede ser descompuesta por no preservarla en condiciones adecuadas e incluso la “curada” puede ser almacenada por largo tiempo y se propicia el crecimiento de bacterias principalmente del tipo halófilas (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Stomatococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, entre otras ) [19, 22, 34]. La proliferación de bacterias halófilas se caracteriza por la producción de una gama de pigmentos que dan manchas rojas y violetas y se han aislado con mayor frecuencia *M. roseus*, *M. luteus* y *M. morrhuae*. Algunos hongos halotolerantes también se han aislado de pieles de oveja salada (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium restrictum*, *P. citrinum*, *Altemia spp.* y *Cladosporium spp.*) [21].

Por otra parte, cuando las pieles curadas llegan a la etapa para la fabricación del cuero, en la etapa de pre-curtido las pieles pueden ser almacenadas por un periodo largo en condiciones de alta humedad, lo que proporciona un medio favorable para el crecimiento de microorganismos provenientes ya sea de la misma piel del animal, de la misma agua utilizada durante el lavado de sales o del ambiente de la curtiduría. Entre los microorganismos detectados en esta etapa se encuentran principalmente las bacterias, con actividades proteolíticas y lipolíticas, cuyo signo inicial de crecimiento es el mal olor en la piel y más tarde en el vello, además de que este deterioro puede ocasionar una pérdida considerable de sustancias

naturales como aceites, granos sueltos (en pieles de reptiles) y agujeros, e inclusive los microorganismos presentes pueden llegar a comprometer la salud de los trabajadores [6, 29, 39].

Entre los microorganismos reportados presentes en la piel cruda o en la etapa de pre-curtido se encuentran bacterias pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Nocardiopsis*. Mientras que en el aire de la tenerías se han reportado especies como: *Acinetobacter johnsonii*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *P. putida*, *Staphylococcus gallinarum*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Corynebacterium lubricantis*, así como especies de hongos filamentosos: *Cladosporium cladosporioides*, *P. commune*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, entre otros [6, 26]. El control microbiológico en los procesos de pre-curtido es muy importante en la fabricación de cueros, ya que la buena calidad de este puede ser afectada antes de llegar a los procesos posteriores.

El biodeterioro de las pieles durante el curtido y los procesos posteriores resulta principalmente por actividades de hongos filamentosos generando diferentes pigmentaciones, lixiviación de aceites y malos olores en los lugares donde se encuentran [6]. La presencia de sales de amonio, fosfatos, tensos activos, agentes engrasantes u otros agentes orgánicos favorece la formación de moho en el cuero. El cuero curtido al cromo proporciona una mayor resistencia biológica principalmente contra el ataque de bacterias. Esto se debe al bajo pH, baja cantidad de agua, más del 90% de colágeno y 2-4% de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (en el peso seco), lo que lo hace más resistentes a las enzimas proteolíticas (excepto la colagenasa), por lo que el biodeterioro del “cuero azul” resulta principalmente debido al ataque de hongos filamentosos o moho. La actividad de los hongos filamentosos puede causar una descomposición de la grasa y el aflojamiento de las fibras de la piel, y crear manchas de diferentes colores. Las manchas en tonos verdes, amarillo, marrón y gris, están asociadas con algunos hongos del género *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*), *Penicillium* (*P. rugulosum*, *P. funiculosum*, *P. variotii*, *P. commune*, *P. glaucum*), *Trichoderma viride*, los cuales se caracterizan por atacar

sustratos con alto contenido de grasa. Las especies de microorganismos reportadas que causan manchas de color rojo en los cueros curtidos se identificaron como *Paecilomyces ehrlichii*, *P. aculeatum*, *P. purpurogenum* and *P. roseopurpureum* [32]. También se han reportado otros hongos en cueros en el curtido que corresponden al género *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces variotti*, *Rhizopus nigricans* así como actinomicetos del género *Streptomyces* [25].

Durante el secado de las pieles acabadas, también pueden desarrollarse mohos debido a humedades y temperaturas favorables dentro de las salas de secado. Algunos hongos y bacterias mencionados en el párrafo anterior persisten en las superficies de las soluciones de curtido vegetal, incluso en el cuero terminado [33]. Como ejemplo, uno de los productos finales más susceptibles al ataque de microorganismos es el calzado, especialmente los que se usan a menudo e intensamente, ya que dichas condiciones proporcionan un ambiente ideal para el crecimiento microbiano [27]. También se ha reportado el deterioro por mohos de los materiales bibliotecarios históricos [40]. Un aspecto adicional a considerar es el entorno laboral de las tenerías y los posibles riesgos a la salud de los trabajadores debido a infecciones causadas por microorganismos patógenos presentes [8, 21, 26-29]. La concentración de bacterias y hongos en casi todos los casos reportados ha excedido los niveles aceptables de microorganismos según lo dictado por los valores límite propuestos por la Asociación Americana de Higiene Industrial.

Entre los microorganismos identificados en el ambiente de las tenerías se encuentran los que pertenecen a familias de *Bacillaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae*. Algunos patógenos identificados corresponden al género de *Acinetobacter*, *Nocardiopsis*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. Además de hongos filamentosos del género como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, etc., así como levaduras: *Candida krusei*, *C. glabrata*, *Cryptococcus*, *Kodamaea* y *Pichia* [8, 21, 26, 28, 29].

Por todo lo anterior, con el fin de mantener la calidad del cuero y, además, evitar el crecimiento sobre todo microorganismos patógenos que puedan comprometer la salud de los trabajadores o del consumidor, especialmente personas con un sistema inmunitario débil o si la piel está herida [27, 29, 38, 41], es muy importante llevar el control adecuado para prevenir el crecimiento de los microorganismos desde la materia prima inicial o “piel de cruda”, durante todo el proceso de producción, hasta el producto final.

### **1.3 Control del crecimiento de microorganismos en cueros**

Debido a que la piel y el cuero pueden ser susceptibles a la biodegradación por actividades microbianas. En este sentido, se suelen utilizar diversos biocidas de amplio espectro para eliminar a la mayoría de los microorganismos, los cuales son adicionados principalmente en el tambor donde se encuentran sumergidos los cueros ya sea curtidos al cromo o vegetal [4-8, 30, 42]. Sin embargo, si el microorganismo prolifera, el daño que causa a la piel ya no se puede ocultar, inclusive en cueros que no presentan signos evidentes de daño, pero que fueron infectados por hongos o bacterias, llega a presentar alteración en las propiedades físicas y mecánicas ocasionando un detrimento en la calidad del producto final. Por lo tanto, es fundamental llevar a cabo un buen control para prevenir el crecimiento microbiano durante todas las etapas.

En general la palabra “biocida” es un término que se refiere tanto a los bactericidas (efectivos contra las bacterias) como a los fungicidas (eficaces contra los hongos). Un buen biocida de cuero deber cumplir ciertas características como: tener una alta actividad y un amplio espectro antimicrobiano, no debe de entrar en conflicto con el cuero o los productos químicos durante el procesamiento, ser estable en el cuero, no lixiviar los colores, ser aceptable desde el punto de vista ambiental, ser de baja toxicidad para las personas, y tener un precio razonable. Aunque se conoce un gran número de sustancias activas para la protección del

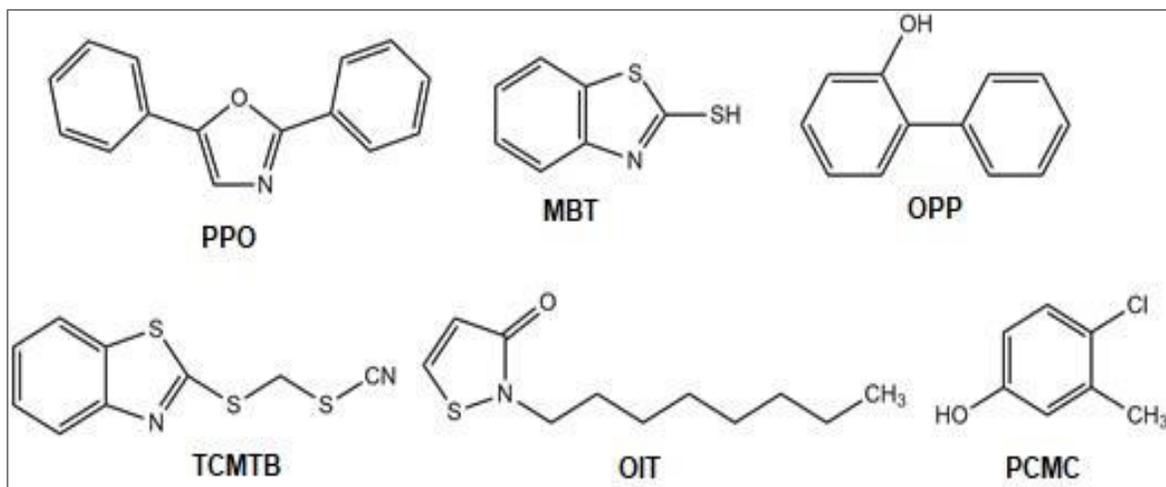
cuero frente al crecimiento microorganismos, un número relativamente pequeño de biocidas ha recibido una amplia aceptación debido a los altos costos y efecto adverso en el medio ambiente [5, 11, 31].

La conservación de la piel cruda se realiza principalmente con sales de sodio y biocidas [4, 43-45], mientras que para la protección contra el biodeterioro causado por los microorganismos en el material semi elaborado y/o producto final, se emplean una amplia gama de compuestos químicos de diversa naturaleza (por ejemplo, compuestos heterocíclicos o derivados del fenol o productos de origen natural). Sin embargo, muchos de ellos presentan características poco favorables como baja solubilidad en agua, cambio en las propiedades del cuero u tóxicos para seres vivos y el ambiente, además de posible resistencia por los microorganismos [5, 6, 9, 19].

El modo de acción de los fungicidas industriales va dirigido principalmente a la pared celular fúngica, compuesta por quitina y complejo de glucanos. Otra diana importante es la membrana celular, donde se cree que las enzimas de biosíntesis de esteroides son afectadas, lo que eventualmente provoca la disminución de ergosterol [46]. La acción fungicida de los biocidas comerciales utilizados en la industria se debe principalmente a sus grupos funcionales activos tales como triazoles, tiocarbamatos, fenólicos y propionamidas. Hoy en día, la industria del cuero utiliza preferentemente biocidas químicos conformados por dos amplias familias químicas que en general son menos tóxicos y más efectivos a concentraciones muy bajas ( $10^{-11}$  M); entre los compuestos fenólicos se incluyen PCMC (4-cloro-3 metil- fenol) y OPP (orto-fenil-fenol); y entre los compuestos heterocíclicos se incluyen TCMTB (2-tiocianometil-tio-benzotiazol), MBT (2-mercaptobenzotiazol), OIT (n-octil-isotiazolinona), BMC (2-benzimidazol-ilmetil-carbamato), dimetilditiocarbamato de potasio (KDDC) o 2,2-dibromo-3-nitripropionamida (DBNP) [4, 11, 47].

Una de las grandes desventajas de estos biocidas es que presentan cierta toxicidad para los humanos y el medio ambiente. De hecho, los compuestos organometálicos como acetato de fenil mercurio (PMA) y fenoles clorados como pentaclorofenol (PCP) han sido ya eliminados debido a su toxicidad y pobre biodegradabilidad [11]. Entre los nuevos fungicidas alternativos están la diyodometil-p-tolilsulfona (DIMTS) y el 3-yodo-2-propinil-N-butilcarbamato (IPBC). Alternativamente se han descrito materiales el uso de nanopartículas de plata [48] o compuestos bioactivos de origen natural, como extractos de plantas, aceites esenciales, quitosano y sus derivados, sin embargo, en algunos casos su rango de efectividad es limitado [20, 23, 24, 44]. Cabe aclarar que los diferentes biocidas no tienen el mismo efecto en todas las especies de microorganismos y la resistencia a factores biológicos puede aumentarse a través de tratamientos de acabado y mantenimiento para cuero y productos de cuero.

Otro factor importante por considerar en la efectividad del control microbiano por los biocidas es la posible inactividad de los ingredientes activos a causa de reacciones con compuestos utilizados en el proceso de producción o condiciones ambientales. Por ejemplo, el TCMTB puede ser absorbido por las grasas, disminuyendo su dosis de acción frente a los microorganismos o también puede ser degradado fácilmente a MBT en condiciones alcalinas, altas temperaturas, presencia de sulfuro y bisulfito o cuando se expone a la luz solar. Para evitar esto, usualmente se aplican varias dosis de biocidas. Además, la captación y distribución pueden ser desiguales e influir en el nivel de protección de las pieles dentro de un lote o de lote a lote, por lo que es importante llevar a cabo el análisis de biocidas en las pieles. En la Figura 2, se presenta las estructuras de biocidas comúnmente utilizados para prevenir el crecimiento de microorganismos en la industria local de León, Guanajuato.



**Figura 2. Estructuras químicas de biocidas comúnmente utilizados en la industria para prevenir el crecimiento de microorganismos en el cuero.** PPO (2,5-Difeniloxazol), PCMC (4-cloro-3 metilfenol), OPP (orto-fenil-fenol), TCMTB (2-tiocianometil-tio-benzotiazol), OIT (n-octil-isotiazolinona), MBT (2-mercaptobenzotiazol).

Algunos microorganismos pueden desarrollar resistencia a los microbicidas como resultado de errores de aplicación, como el uso de un biocida inapropiado o una cantidad insuficiente de biocida de lo necesario. Por ello, es importante llevar la identificación de microorganismos que causa el biodeterioro y correlacionarlo con el mejor biocida para su control. Como se mencionó anteriormente, en este proyecto se propone identificar a microorganismos aislados de muestras de piel “cuero azul” proporcionadas por la industria de cuero local, por lo que se dará una breve descripción general de los métodos más comúnmente utilizados para la identificación de microorganismos.

#### 1.4 Métodos de identificación de microorganismos

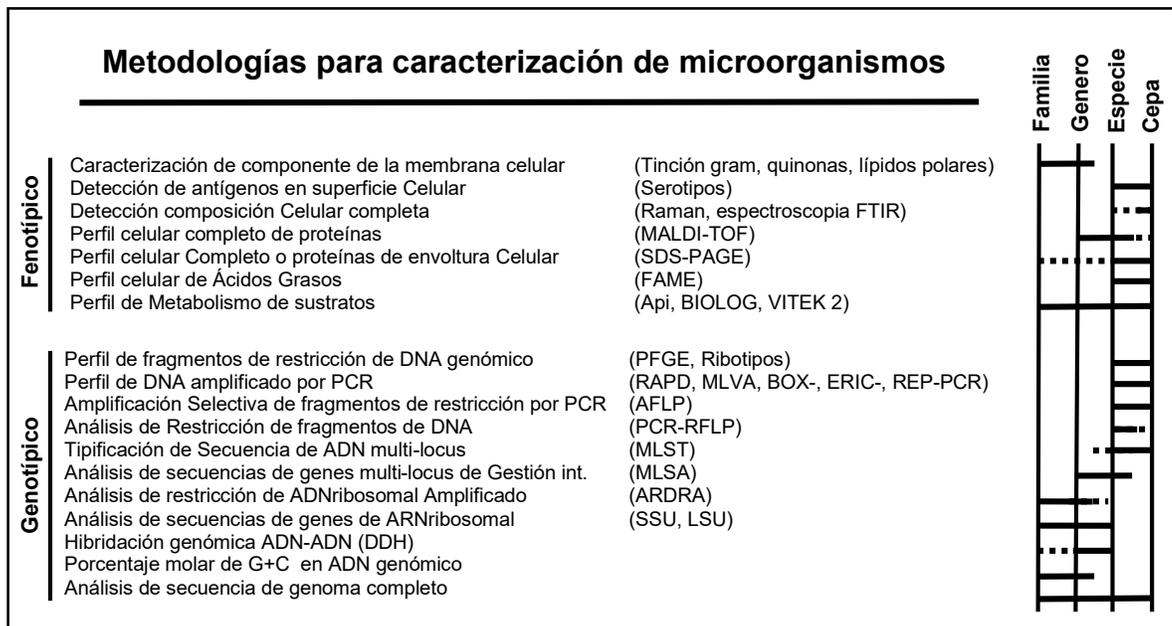
La identificación microbiana permite el diagnóstico clínico, la comprensión de su impacto en las actividades ambientales y las perspectivas en aplicaciones biotecnológicas [49]. En la industria del curtido es necesario conocer los tipos de microorganismos presente en los materiales, así como en los distintos procesos del cuero, para poder llevar a cabo el control adecuado de ellos.

Se entiende por identificación de microorganismos al conjunto de técnicas y procedimientos por los cuales se establece la identificación de estos. La identificación se basa en la caracterización de las cepas, con el objetivo de reconocer las similitudes fenotípicas y genotípicas, lo que permite la asignación de una cepa a una especie dada. Por lo tanto, la identificación depende necesariamente de una taxonomía establecida y una nomenclatura estable. La taxonomía consta de tres partes principales: clasificación (disposición de los organismos basado en la similitud), nomenclatura (denominación de los organismos) e identificación (determinar si un organismo pertenece al grupo bajo el cual se clasifica y nombra) [50]. Si bien todos los rangos taxonómicos (Dominio, filo o división, clase, orden, familia, género, especie) generan un marco sistemático para comprender la relación existente entre los microorganismos, la “especie”, asignada a un “género”, en una combinación binomial, que constituye la unidad básica de la taxonomía microbiana que permite la identificación de organismos que comparten propiedades comunes [51, 52]. Por otra parte, para la clasificación de cepas a nivel de sub-especie, es necesario llevar a cabo la tipificación de microorganismos usando las propiedades diferenciales (fenotipo, morfotipo, serotipo, patotipo, genotipo, etc.). Por lo que, adjuntar un nombre a una cepa microbiana conlleva suposiciones e implicaciones benéficas o patogénicas asociadas con ese organismo en particular [50, 53].

Existen varios métodos para la clasificación e identificación de microorganismos y comprende la valoración de características fenotípicas o genotípicas, lo que permite la resolución a diferente grado taxonómico. En la Figura 3, se presenta un esquema general de los métodos fenotípicos y genotípicos comúnmente utilizados para la tipificación de microorganismos con los alcances de resolución esperados para cada método. Con los métodos fenotípicos clásicos se inicia con la caracterización por medio de la determinación de la forma de la célula al microscopio (coco, bacillus, etc.) o de la colonia en la placa, caracterizar los componentes de la membrana celular (tinción Gram), determinar los perfiles de

ácidos grasos (FAMEs), antígenos en la superficie celular (serotipo), o llevar a cabo pruebas bioquímicas (asimilación de fuentes de carbono, ensayos enzimáticos, etc.). En estas últimas se han desarrollado kits y códigos para la terminación de las pruebas bioquímicas en baja escala, lo que permite llevar a cabo el perfil metabólico de manera automatizada (API, VITEK 2) y posterior identificación semi automática. Cabe señalar que estas pruebas en general son complejas, requieren mucho tiempo y trabajo, además de personal especializado para la interpretación y solo capturan algunos aspectos de las especies de los microorganismos, por lo que su identificación es poco precisa y generalmente solo son útiles como pruebas iniciales de clasificación. La principal desventaja en cuanto a la identificación de estas metodologías es que no todas las cepas de una misma especie presentan características homogéneas, sin embargo, tiene una ventaja, ya que esto puede servir para diferenciar a nivel de subespecies, por lo cual siguen estando vigentes.

Recientemente en los métodos fenotípicos se ha incluido el análisis de microorganismos por espectroscopia Raman en el cual se detecta la composición celular completa o por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) que analiza el perfil completo de las proteínas mayoritarias. Esta técnica en conjunto con el uso de métodos quimiométricos ayudan a identificación y clasificación taxonómica de manera fácil, rápida y confiable. En este estudio, se utilizará la técnica MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos, por lo que se describirá los alcances y limitaciones más adelante.



**Figura 3. Esquema general de los métodos comúnmente utilizados para la tipificación microbiana, con estimaciones de los niveles de resolución esperados para cada método.** Las barras horizontales indican el nivel de resolución cubierto por la metodología. MALDI-TOF MS puede diferenciar los microorganismos en los niveles de especies o subespecies (tomado de [53]).

Por otra parte, la identificación y clasificación por técnicas moleculares se basa en el análisis del genotipo y presentan diferente grado de complejidad tanto para la ejecución como para la interpretación. Una ventaja importante con respecto a los métodos fenotípicos es que las condiciones de incubación o el medio de cultivo no son factores determinantes para la identificación. Los métodos más simples y utilizados consisten en amplificación genómica y secuenciación de los genes o fragmentos de ellos, siendo el estándar de “oro” para la identificación de microorganismos la secuenciación de genes ribosomales o bien el análisis de secuencias de ADN multilocus (MLSA). En general la identificación de un organismo se inicia con la secuenciación parcial de genes que codifican proteínas funciones conservadas por ejemplo de genes ribosomales 16S (bacterias) o de regiones intergénicas (ITS, para hongos), los cuales contienen regiones altamente conservadas, variables e hipervariables. Otros genes ribosomales también utilizados son *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*, genes involucrados en mecanismos de

reparación de ADN como recA y recN, entre otros específicos para una especie de microorganismos dada [50, 54].

La gran cantidad de secuencias de diferentes organismos depositadas en la base de datos, permiten llevar el análisis de manera sencilla y confiable. En el esquema MLSA se identifican secuencias de nucleótidos internas de aproximadamente 400 a 500 pb en múltiples genes. Las secuencias únicas (alelos) se asignan como un número entero aleatorio y una combinación única de alelos en cada locus. Esto se designa como un "perfil alélico" que especifica el tipo de secuencia. Sin embargo, esta técnica también tiene sus desventajas, ya la resolución a nivel de especie de los genes 16S rRNA puede ser baja, además de que es necesario llevar algunos pasos previos como extracción de ADN, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región o del(los) gen(es) de interés, purificación del producto de amplificación y finalmente enviarlo a secuenciar, impactando en el tiempo y costo para la obtención de resultados.

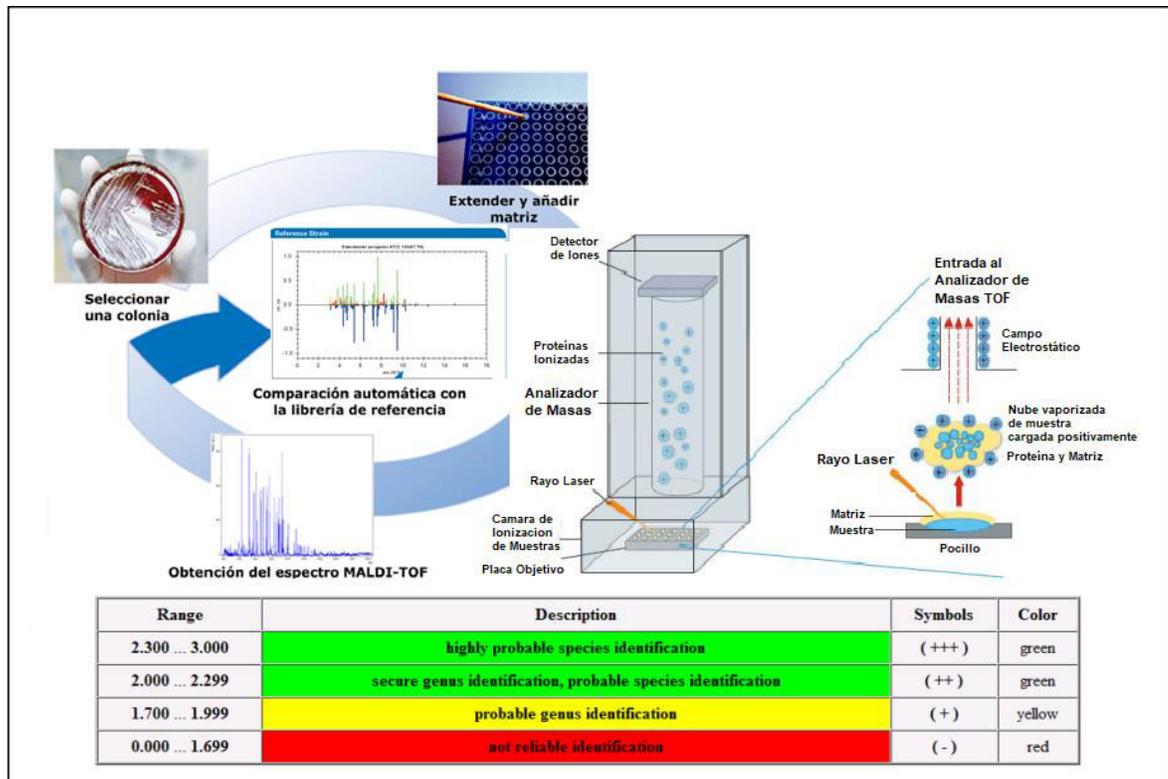
#### **1.4.1 Identificación de microorganismo por MALDI-TOF MS y uso del sistema Biotyper™**

El uso de espectrometría de masas para caracterizar bacterias comenzó desde 1975, los primeros resultados fueron obtenidos mediante espectrometría de masas mediante pirolisis de los productos de fosfolípidos y ubiquinonas [55]. Sin embargo, el punto clave para su utilización en análisis de rutina en la identificación fue la introducción al análisis de perfiles de proteínas tomadas directamente de células intactas mediante MALDI-TOF MS [14, 56, 57].

En los últimos años, MALDI-TOF MS ha revolucionado en la identificación de microorganismos consolidándose como un método rápido, selectivo, sensible y de bajo costo en la identificación y clasificación taxonómica de bacterias, levaduras y hongos, principalmente de ámbito clínico [17, 58-64]. Su éxito radica principalmente en que se puede llevar a cabo la identificación directamente en células intactas o en extractos crudos de manera muy simple, mediante la obtención del perfil de las

proteínas más abundantes (ribosomales). Como este perfil es único para cada organismo, se puede considerar como su “huella digital” y lograr con ello la identificación a nivel de género y especie [58]. El protocolo en general consiste en tomar la muestra y mezclarla con una matriz hasta su cristalización para posteriormente colocarla en una placa metálica, la cual se introduce al equipo a alto vacío, en donde con la ayuda del láser, se obtiene la desorción de las moléculas en fase gaseosa. Estos iones son acelerados y transferidos a un analizador (tiempo de vuelo, TOF), donde son separados y posteriormente detectados en base a su relación masa-carga ( $m/z$ ). Dado que es una técnica de ionización suave, los espectros de masas contienen principalmente iones de moléculas no fragmentadas, adquiridos generalmente en el rango de 2 – 20 KDa en condiciones de alta resolución y con pocas interferencias de matriz por parte de la muestra. Los espectros de masas generados son analizados mediante el uso de Software especializado que lleva a cabo la comparación de los espectros de masas [65].

Una de las herramientas disponibles en nuestro laboratorio para la identificación de microorganismos es el espectrómetro de masas MALDI-TOF MS modelo Autoflex Speed (Bruker Daltonics) en conjunto con el paquete de Software Biotyper™ Compass 4.1 y la base de datos BDAL versión 3.3.1.0. En cuanto a los criterios de interpretación, el Biotyper™ evalúa la concordancia entre espectro experimental y el espectro de bases de datos tomando en cuenta tres factores: los valores de  $m/z$ , intensidades de las señales y frecuencia de estas; Usando un algoritmo calcula la probabilidad de que estos espectros pertenezcan al mismo organismo. El resultado se reporta en unidades arbitrarias en escala logarítmica (log score) con valores en intervalos de 0 – 3 [66]. Típicamente, los valores  $\geq 2.0$  permiten la asignación probablemente a nivel de especie, los valores entre 1.7 y 2.0 se consideran suficientes para identificación a nivel de género, mientras que los valores  $\leq 1.7$  no permiten una asignación confiable. Otro criterio de consistencia en identificación se expresa en letras A, B, y C, donde A corresponde a confiabilidad a nivel de especie, B a nivel de género y C indica falta de confiabilidad [67, 68]. Las etapas de análisis se presentan esquemáticamente en la Figura 4.



**Figura 4. Etapas de identificación de microorganismos por MALDI-TOFMS con Biotyper™ [69].**

La identificación precisa depende de dos factores: calidad de espectro adecuada y concordancias con las referencias de la base de datos [69]. El primer punto, está relacionado con el método de preparación de muestra, un área en desarrollo metodológico actualmente importante, sobre todo con organismos que contienen pared celular como hongos filamentosos. Mientras que para el segundo punto es importante señalar que las bases de datos son aún limitadas en el número de espectros de masas, y constituidas principalmente por muestra de importancia clínico y alimentaria. Por lo que, para la identificación de microorganismo en muestras ambientales, generalmente es necesario llevar a cabo la ampliación de las bases de datos por los usuarios, mediante la creación de espectros principales y validados por métodos de identificación molecular. En particular, nosotros contamos con una librería que contienen aproximadamente 6500 espectros de referencia (MBT-BDAL-5989 MSP Library suplementado con Filamentous Fungi Library v1.0), de los cuales 5900 corresponde principalmente a bacterias de origen clínico.

En nuestra experiencia, cuando hemos llevado a cabo la identificación de microorganismos aislados de muestras ambientales utilizando el sistema MALDI Biotyper™ hemos tenido resultados ambiguos. Por ejemplo, hemos logrado gran porcentaje en identificación para bacterias (aproximadamente del 60-90 %, dependiendo del origen), sin embargo, para el caso de hongos filamentosos aislados el porcentaje de identificación ha sido muy bajo (menos de 10 %). Una ventaja que presenta el sistema a utilizar es que el software permite la creación de base de datos “locales” mediante la generación de espectros principales e identificación complementaria de los microorganismos [63, 70-72]. Adicionalmente, está técnica permite la detección de posibles proteínas implicadas en resistencia bacteriana y en la detección de factores de patogenicidad, siendo una importante ventaja en la caracterización [73] .

Por todo lo anterior, en este proyecto se pretende llevar a cabo la identificación de aislados microbianos procedentes de diversas fuentes ambientales por el sistema MALDI Biotyper™ mediante el diseño e implementación de una base de datos complementaria a la proporcionada por el proveedor (Bruker, Daltonics).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En este proyecto se propone aislar e identificar la diversidad microbiana endémicas de muestras de pieles bovinas (cuero azul) procedentes de la industria de curtiduría mediante espectrometría de masas por medio de la técnica MALDI-TOF MS.

La identificación en primer lugar se pretende realizar utilizando la base de datos proporcionada por el proveedor (Bruker Daltonics). Para los aislados que no fueran identificados con dicha base de datos, se propone generar una base de datos local con perfil proteínico de los espectros de masas generados por MALDI-TOF MS.

La implementación de MALDI-TOF MS como una herramienta de análisis (ya sea con la librería proporcionada por el proveedor o por la desarrollada complementariamente en este proyecto), permitirá caracterizar la diversidad microbiana endémicas de pieles bovinas tratadas con antibióticos procedentes de la industria de curtiduría con mínimo tratamiento y de manera rápida, sensible, selectiva y de bajo costo.

### **3. HIPÓTESIS**

El desarrollo y la aplicación de procedimientos analíticos para la identificación de microorganismos por espectrometría de masas, permitirá la identificación de bacterias y hongos presentes en las muestras de las pieles bovinas (cuero azul) procedentes de tenerías de la región de una manera sencilla, eficaz, rápida y económica.

La identificación de los microorganismos permitirá contribuir al mejor entendimiento sobre la diversidad microbiana endémica que afectan a la industria de la curtiduría y sugerir la utilización específica de biocidas particulares con base en los microorganismos encontrados.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Caracterizar la diversidad microbiana endémicas de pieles bovinas tratadas con antibióticos y procedentes de la industria de la curtiduría, mediante el desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).

### 4.2 Específicos

- Evaluar el tipo y concentración de biocidas en muestras líquidas comerciales y muestras de pieles bovinas “cuero azul” obtenidas de diferentes tenerías de la región.
- Aislar microorganismos de muestras de pieles bovinas “cuero azul” obtenidas de diferentes tenerías de la región
- Caracterizar por MALDI-Biotyper™ los aislados obtenidos por medio de:
  - Identificar con el uso de la base de datos incluida en el software\_MBT Compass Explorer 4.1
  - Crear los espectros principales de los aislados no identificados.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras

- Seis muestras de pieles “cuero azul” con notable signos de biodeterioro fueron proporcionadas amablemente por empresa de la región Productos Curtientes

### 5.2 Reactivos

#### 5.2.1. Medios de cultivo para el aislamiento, crecimiento y preservación de microorganismos

- Agar Papa Dextrosa (Difco/BD Bioxon)
- Medio Luria-Bertani
  - Peptona biotriptasa (BD Bioxon)
  - Extracto de levadura (BD Bioxon)
  - Cloruro de Sodio (Karal)
  - Agar Bacteriológico (cuando es sólido) (BD Bioxon)
- Medio líquido Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon)
- Caldo Papa Dextrosa (natural)
  - Infusión de 200 g de papa
  - Dextrosa (20g)
- Glicerol 30%(v/v) (MALLINCKROOT)

#### 5.2.2. Reactivos y material para determinaciones analíticas.

- **Para extracción de proteínas y determinación por MALDI-TOF MS**
  - Tubos de 2mL con perlas de zirconio (0.5 y 1.0 mm).
  - Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF).
  - Etanol al 70 %.

- Acetonitrilo (MeCN).
  - Ácido fórmico.
  - Matriz: ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinámico (HCCA).
  - Estándar de calibración BTS (extracto proteico de *Escherichia coli*  $\alpha$  DH5 y proteínas adicionales).
  - Placa de acero pulido de 386 pocillos.
- **Determinación de Biocidas en muestras líquidas comerciales y pieles**
    - Los estándares auténticos fueron adquiridos de sigma aldrich [ PCMF, OPP, TCMTB, y OIT; y dos estándares internos (ISTD): 2-BPB y PPO].
    - Biocidas comerciales: T33, M3, M1C21, ECOSOF y Preventol.
    - Acetonitrilo (MeCN).
    - Ácido fórmico.

### 5.3. Equipo de laboratorio

#### 5.3.1. Equipo utilizado en el procesamiento de muestras o preparación de los reactivos

- |                              |                                       |
|------------------------------|---------------------------------------|
| ● Autoclave                  | (modelo 50x, All American)            |
| ● Balanza analítica          | (modelo CX220, Citizen)               |
| ● Centrifuga                 | (modelo 236HK, HermLet Labortechnick) |
| ● Homogeneizador             | (modelo D1030, Bead Bug)              |
| ● Incubadora                 | (modelo 211Labnet)                    |
| ● Micropipetas               | (modelo Eppendor, Labnet)             |
| ● Potenciómetro              | (modelo 320p, Agilent Technologies)   |
| ● Purificador de Agua MilliQ | (modelo Water PRO-PS, Labconco)       |
| ● Secador de Muestras        | (modelo Speed Vac 5310, Eppendor)     |
| ● Vórtex                     | (modelo Genie 2)                      |

### 5.3.2. Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de líquido de alta resolución modelo Agilent Technologies series 1200 equipado con automuestreador, detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y fluorimétrico.
- Espectrómetro de Masas: MALDI-TOF MS modelo Autoflex Speed (Bruker Daltonics).

### 5.4. Programas para análisis de datos

- Microsoft Office Professional Plus 2016. (versión 16.0.4)
- MBT Compass Explorer. (Bruker Daltonics) (versión 4.1)
- FlexAnalysis. (Bruker Daltonics) (versión 3.4)
- Flex Control (Bruker Daltonics) (versión 3.4)
- ChemStration (Agilent Technologies) (versión 4.0.3)
- Biotyper™ Reference database BDAL (Bruker Daltonics) (versión 3.3.1.0)
- Filamentous Fungi Library (Bruker Daltonics). (versión 1.0)

## **5.5. Parte experimental**

### **5.5.1. Evaluación del aspecto físico de las pieles**

Las muestras de pieles “cuero azul” fueron nombradas con las letras del alfabeto siendo de la A hasta la F registrándose características como color, textura, maleabilidad, manchas (aspecto y color) o daños visibles para cada una de las muestras.

### **5.5.2. Preparación de soluciones estándares de biocidas**

Los típicos biocidas utilizados en la industria de la curtiduría regional son: PCMC, OPP, TCMTB y OIT. En este trabajo se lleva a cabo la determinación biocidas en las muestras líquidas comerciales de los biocidas de acuerdo a la metodología reportada Font y col., [74] con algunas modificaciones realizadas en el grupo de trabajo (manuscrito en preparación). Para ello, se prepararon de una mezcla estándares auténticos a  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  diluido en MeCN: PCMC, OPP, TCMTB y OIT y se analizaron por medio del HPLC con las condiciones descritas en la Tabla 1. La fase móvil fue una mezcla de (A) MeCN, (B) agua y (C) solución de ácido fórmico al 0.1 % pH 3.5 ajustado con trietilamina. El flujo de la fase móvil fue  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ . La composición de la fase móvil fue: inicio (0.0 min) A:B:C; 30:60:10, gradiente a los 10.0 minutos con A:B:C; 90:0:10, a 10.2 min se regresó a las condiciones iniciales y el tiempo de total de la corrida cromatografía fue de 10.5 min. La detección espectrofotométrica se efectuó a 287 nm (PCMF, ISTD:2-BPB, OPP, TCMTB y OIT) y a 320 nm (MBT y ISTD: PPO).

**Tabla 1. Condiciones utilizadas para el análisis de biocidas mediante HPLC**

<b>Parámetros</b>	<b>Condición</b>
Columna	Hypersil-Keystone 150x3 mm
Tamaño de partícula	3 $\mu\text{m}$
Temperatura de Columna	40°C
Fase móvil	MeCN + H <sub>2</sub> O + Acido fórmico al 0.1% pH 3.5
Flujo de fase móvil	0.6 mL min <sup>-1</sup>
Volumen de inyección	0.5 $\mu\text{l}$
Presión	180 - 90 Bar
Longitud de onda	287 y 320 nm
Tiempo de corrida	10.5 minutos

### **5.5.3. Determinación de concentración de PCMC, OPP, TCMTB y OIT en muestras comerciales de biocidas**

Se preparó en un tubo falcón una mezcla de MeCN con agua en una proporción 1:1, en un tubo de 2mL se añadió 100  $\mu\text{L}$  del biocida (Ecosoft) y 900 $\mu\text{L}$  de solución de MeCN al 50 %, mezclando en vórtex por 1 minuto, después de esta dilución del biocida se tomaron 20 $\mu\text{L}$  y se depositaron en otro tubo de 2mL limpio, agregando a este mismo tubo 980 $\mu\text{L}$  de la mezcla MeCN al 50%. Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las muestras de biocidas (M1C21, M3, T3 y Preventol). Por último, se procedió a analizar mediante HPLC-DAD cada uno de los biocidas diluido 500 veces.

### **5.5.4. Determinación de la concentración de biocidas en las muestras de pieles**

Se pesó 1g de muestra (pieles) en un tubo de 50mL y se añadió 1mL de una solución que contenía los dos ISTD: 2-BPB PPO preparados cada uno a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en MeCN y se aforó a 20mL con MeCN incubando por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló 500 $\mu\text{L}$  del extracto obtenido con el mismo volumen de agua desionizada (concentración final de cada ISTD fue 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y la muestra fue centrifugada a 10000 x g durante 10 minutos. Se recolectó el

sobrenadante y se introdujeron 5  $\mu$ L al cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC-DAD) para su análisis.

## **5.6. Aislamiento de microorganismos en pieles “cuero azul”**

De cada una de las seis muestras de piel “cuero azul” se cortó con tijeras y pinzas estériles un trozo de aproximadamente de dos gramos, el cual fue seleccionado de las zonas con mayor deterioro. La muestra fue colocada en un tubo falcón con 20mL de solución salina al 0.9% estéril, y se dejó reposar por una hora, después de la espera, se agitó cada muestra con vórtex por un minuto aproximadamente. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  en tubos Eppendorf rotulándolos con la letra correspondiente a la muestra y la dilución a cada tubo. Se inoculó en medio sólido, esparciendo con un asa de drigalsk un volumen aproximado de 200  $\mu$ L en cajas Petri de 90 mm x 100 mm con medio LB o medio PDA. Las placas fueron incubadas a 37°C y 28 °C hasta la aparición de colonias. De las placas con los medios LB y PDA se obtuvieron bacterias y hongos filamentosos, respectivamente.

De las diferentes colonias bacterianas obtenidas en medio LB, fueron re aisladas en placas nuevas repitiendo el procedimiento hasta obtener cultivos axénico. Una vez obtenidas los cultivos axénico para cada aislado, este fue conservado en glicerol al 30 % y almacenado a -20°C. De la misma manera, las colonias de hongo cultivadas en medio PDA se sembraron por estriado a 28°C en cajas individuales por un tiempo de cinco días, repitiendo el procedimiento varias veces hasta obtener cultivos monospóricos y almacenados a -20 °C en glicerol al 30 %.

### **5.6.1. Obtención de esporas**

La obtención de esporas frescas de los hongos se realizó de la siguiente manera. En la caja de Petri que contenía microorganismos ya aislados y esporas

visibles (7 días de incubación a 28 °C), se agregó 20mL de agua destilada estéril y con la ayuda de una asa de drigalski se hizo un raspado en la superficie, la mezcla restante se depositó en un tubo falcón de 50mL estéril usando un embudo cónico con una tela “magiltel®” ambas estéril para posteriormente centrifugar a 2 000 x g por 5 minutos, eliminado el sobrenadante y agregando un volumen de 15mL de agua destilada estéril para hacer un lavado, y volver a centrifugar repitiendo el procedimiento tres veces, en el último centrifugado se eliminó el sobrenadante dejando la pastilla la cual se re-suspendió con 3mL.de glicerol. Se contó el número de esporas en una cámara de Neubauer.

### **5.6.2. Caracterización morfológica de los microorganismos**

Para la caracterización se depositó 5 µL esporas en el centro de una caja de Petri de 9 x 11 mm con medio PDA y se dejó crecer durante cinco días a 28°C hasta observar crecimiento de colonia, tomando en cuenta las características como tamaño, aspecto, textura y color de ambas caras y producción de pigmento.[75].

## **5.7. Crecimiento de microorganismos en medio líquido para la identificación por MALDI-TOF**

### **5.7.1. Cultivo de aislados bacterianos y extracción de proteínas**

Dependiendo de la bacteria, la identificación por MALDI-TOF se llevó a cabo directamente en medio sólido o mediante extracción de proteínas del cultivo en medio líquido. Para el caso del medio sólido, la muestra fue tomada de una placa LB de un cultivo máximo de 24 h y depositada directamente en la placa de MALDI. Alternativamente, las bacterias se crecieron previamente en una caja de Petri con agar LB agregando 2 µL de muestra y dejando incubar a 37 ° C por 24 h. Posteriormente se hicieron crecer en tubos de ensaye de 13 mm con 2 mL del mismo medio y tomando una asada de colonia con un palillo de dientes estéril y depositándolo en el tubo con el medio, dejando incubar a 37 ° C a 160 x g por 24

horas. Posteriormente, se tomó una alícuota de 800  $\mu$ L y se centrifugó a 10000 x g por un min, desechando el sobrenadante y haciendo tres lavados de la pastilla con agua destilada.

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante [76]. En el tubo que contenía la pastilla obtenida de las bacterias se le dio un lavado con 800  $\mu$ L de etanol al 70 %, mezclándolo por vórtex durante un min, centrifugando a 10000 x g durante un minuto. Se repitió el lavado dos veces más y dejó secar la pastilla totalmente. Después se agregó de 40 a 80  $\mu$ L de ácido fórmico al 70% (según el tamaño de la pastilla), se agitó por vórtex durante un minuto. Por último, se agregó el mismo volumen de MeCN mezclado con PMSF 2mM agitándolo por un minuto con vórtex después se centrifugó a 10 000 x g durante un minuto. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo antes de su análisis por MALDI-TOF MS.

### **5.7.2. Cultivo de aislados fúngicos y extracción de proteínas**

En el caso de los hongos filamentosos, inicialmente se siguió el protocolo propuesto por el fabricante, cultivando los hongos en medio PD de 24-48 h y siguiendo el protocolo de extracción similar al de las bacterias. Posteriormente se estandarizaron las condiciones de cultivo y extracción. Para ello, los aislados se hicieron crecer en matraces de 50 mL con 10 mL de medio líquido Dextrosa Sabouraud (o PD) inoculando en ellos un volumen de 80  $\mu$ L de muestra y dejando incubar a 150 x g en un tiempo no mayor a 24 horas. Después de 24 horas, la biomasa obtenida se filtró en un embudo con papel filtro y se lavó con abundante agua destilada para posteriormente recolectar el micelio obtenido en un tubo eppendorf. Del micelio obtenido, se tomó de 50 a 250 mg depositándolo en otro tubo eppendorf dando un lavado con 800  $\mu$ L de etanol al 70 %, mezclándolo por vórtex durante un minuto, centrifugando a 10 000 x g durante un minuto. Se repitió el lavado dos veces más y dejando secar totalmente. Después se agregó de 40 a 100  $\mu$ L de ácido fórmico al 70%, agitando por vórtex durante un minuto, por último, se agregó el mismo volumen de MeCN mezclado con PMSF 2 mM agitándolo por un minuto

con vórtex. Posteriormente, 1  $\mu$ L de sobrenadante fue depositado en la placa de acero pulido para su análisis por MALDI-TOF MS. Para algunos hongos, se llevó a cabo el cultivo en PD y se realizó un rompimiento con perlas de zirconio antes de llevar a cabo la extracción.

### 5.8. Identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS BIOTYPER™

Antes de iniciar cualquier procedimiento de identificación, lo primero que se realizó fue la calibración con BTS. Para ello, se tomó 1  $\mu$ L del calibrante (BTS) colocándolo en un pocillo de la placa para MALDI-TOF MS dejando secar, posteriormente, se colocó 1  $\mu$ L de la matriz (HCCA) sobre el calibrante y se dejó secar en la placa. Se hizo lo mismo para las muestras extraídas en los pasos 5.7.1. y 5.7.2. La placa fue introducida al equipo MALDI-TOF MS para su análisis. Entonces, el equipo fue calibrando con el estándar de test bacteriano (BTS) con los rangos descritos en la Tabla 2 [77].

**Tabla 2. Valores de rango de masas del calibrante obtenidos contra rango de masas de referencia**

Proteína	Referencia (Da)	Rango $\pm$ 300ppm (Da)
RL29 [M+2H]2+	3637.8	3636.7 – 3638.8
RS32 [M+H] +	5096.8	5095.3 – 5098.3
RS34 [M+H] +	5381.4	5379.8 – 5383.0
RS33meth [M+H] +	6255.4	6253.5 – 6257.3
RL29 [M+H]+	7274.5	7272.3 – 7276.7
RS19 [M+H]+	10300.1	10297.0 – 10303.2
RNAse A [M+H] +	13683.2	13679.1 – 13687.3
Myoglobina [M+H] +	16952.3	16947.2 – 16957.4

Los espectros obtenidos fueron analizados por el software MALDI-TOF MS Biotyper™ Compass 4.1, que cuenta con la base datos Biotyper™ Reference database BDAL (versión 3.3.1.0) de Bruker Daltonics. Para los microorganismos no identificados; se procedió a crear una base de datos con los espectros de masas.

## 5.9. Creación de base de datos

### 5.9.1. obtención de espectros de masas

Previo a la creación de espectros, se procedió a hacer los pasos descritos en el punto 5.7.2. Apoyándonos del software *Flexcontrol*, *FlexAnalysis* y *Compass Explorer* para la creación de la biblioteca, Se colocó de cada muestra un volumen de 1  $\mu$ L sobre 12 pocillos en la placa para MALDI-TOF MS dejando secar, después se agregó 1  $\mu$ L de HCCA sobre cada muestra dejando secar, se realizaron los pasos anteriores, pero solo colocando en un solo pocillo el calibrante (BTS) y posteriormente se pasó la placa a leer en el equipo MALDI-TOF MS usando el programa *Flexcontrol*. Dentro del programa se programa una metodología con los parámetros descritos en la tabla 3

**Tabla 3. parámetros usados en el equipo MALDI-TOF MS**

<b>Rango de masa</b>	2000 - 20000 Da
<b>Fuente de ion 1</b>	19.59 kV
<b>Fuente de ion 2</b>	18.31 kV
<b>Lente</b>	6.65 Kv
<b>Potencia del laser</b>	35 al 45 %
<b>Tolerancia máxima</b>	300 ppm

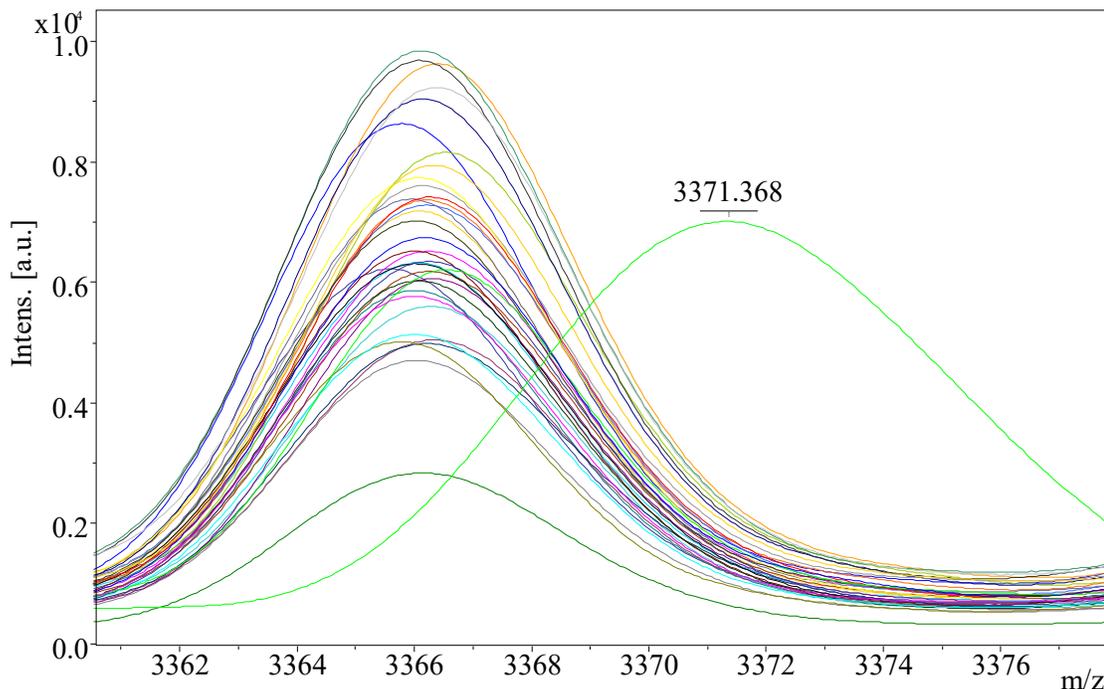
El primer paso realizado fue calibrar el equipo con el estándar bacteriano (BTS), una vez aceptada la calibración; se procedió a hacer la lectura de las muestras; para esto se realizó la lectura de los 12 pocillos de cada muestra por triplicado para obtener 36 lecturas. La creación de la librería se realiza en el programa *FlexAnalysis* (3.4 Bruker Daltonic). Para ello, se selecciona la metodología (MBT) y se procede a realizar la calibración interna con el espectro de masas del BTS.

Una vez calibrado el método se procedió a cagar los 36 espectros de masas de cada muestra, aplicando a ellos una sustracción de línea base (Algoritmo “*Median*”) y un “suavizado” (algoritmo *Savitzky-Golay*) para obtener una mejor

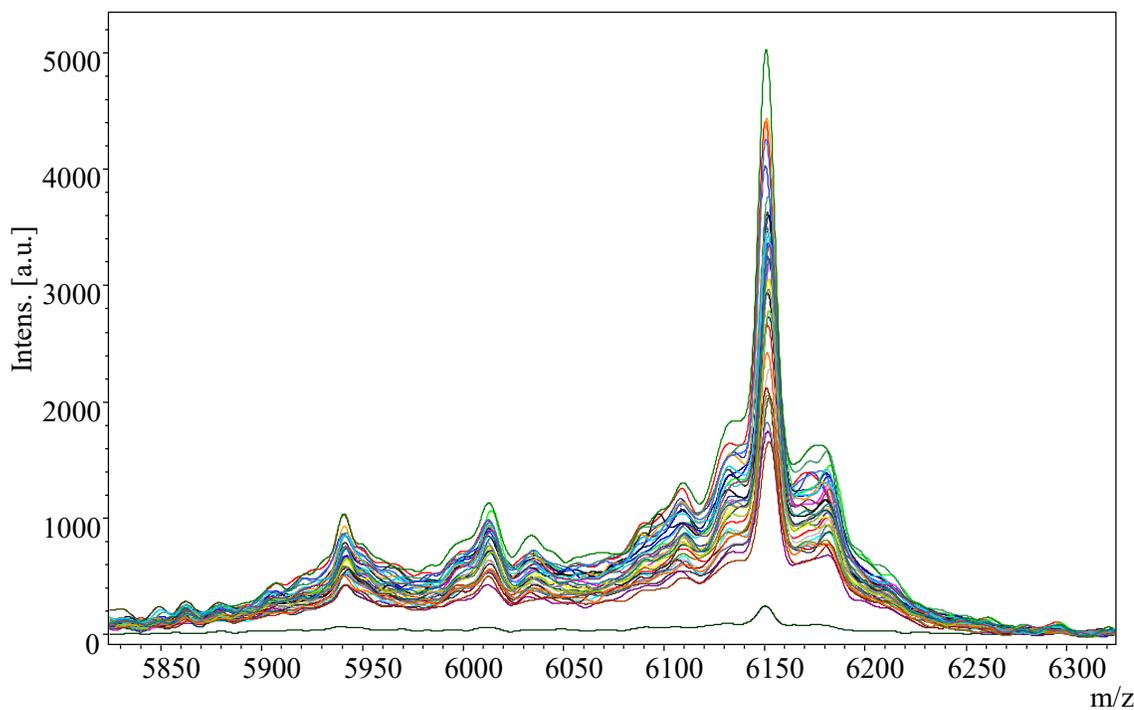
aparición de los espectros. Descartando aquellos que tuvieran un pico con rango de masas diferente a un grupo característico de espectros de masas (Figura 5), o aquello que fueran planos, nulos o con baja intensidad (Figura 6).

Por último, se hizo un cálculo de error de masas tomando como referencia el valor que más se repitiera entre los picos de un espectro; a este se le aplicó una diferencia de  $\pm 300$ ppm y todo aquel pico que saliera de este rango; fue descartado. Con los espectros restantes de cada muestra se procedió a crear el espectro principal de cada muestra usando el programa *MBT Compass Explorer*.

Para crearlos, se permitió un error máximo de masa por espectro de 2,000, error de masa deseado por cada MSP de 200, una frecuencia mínima de picos deseados (%) de 20 y el máximo número de picos deseados por menos fue de 20 [78]



**Figura 5. Ejemplo de espectro de masas con diferentes rangos de masas.** Se aprecia en la gráfica un espectro de masas de color verde (3371.36 m/z) el cual difiere notoriamente a los espectros que están entre el rango de 3365 y 3667 m/z.



**Figura 6. Ejemplo de espectro de masas con baja intensidad.** en el grafico se aprecia un espectro el cual tiene una intensidad muy baja de color verde olivo (menor a 500 a.u.) en un rango de masa de 6150 m/z.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, una de las principales actividades económicas de la región del bajo es la industria de la Curtiduría, la cual se encarga de la obtención y tratamiento de cueros para la posterior producción de todo tipo de artículos fabricados con dicho material. La calidad y producción del cuero puede verse disminuida por el biodeterioro causado por las actividades microbianas. Por lo que es necesario llevar un control adecuado para prevenir el crecimiento microbiano mediante el uso de biocidas en el proceso de fabricación. Sin embargo, ciertas bacterias y/o hongos pueden llegar a desarrollar resistencia a dichos compuestos y crecer en los cueros tratados con biocidas. La identificación de microorganismos resistentes podría contribuir a evaluar la mejor estrategia para el control de crecimiento con el uso de biocidas específicos.

El proyecto tiene como objetivo principal la identificación de microorganismos aislados de muestras de piel “cuero azul” con diferentes signos de biodeterioro obtenidas de diferentes tannerías de la región. Inicialmente, para conocer el tipo y concentración de biocida presente en las muestras de “cuero azul” de donde se aislaron los microorganismos, se realizó la determinación por HPLC-DAD de los típicos biocidas utilizados en la industria local (TCMTB, MBT, OIT, PCMC y OPP). Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación de los biocidas en muestras líquidas de presentaciones comerciales que son utilizados por la industria local para tratar los cueros. Las bacterias y hongos aislados fueron identificados inicialmente por MALDI-Biotyper™ utilizando las entradas de la base de datos. Para los organismos que no fueron identificados se crearon los espectros principales y caracterizaron fenotípicamente.

A continuación, se describen los resultados obtenidos de acuerdo con los objetivos planteados iniciando con la evaluación del aspecto físico de las pieles y la determinación de la concentración de biocidas en las pieles.

## 6.1. Análisis de pieles “cuero azul”

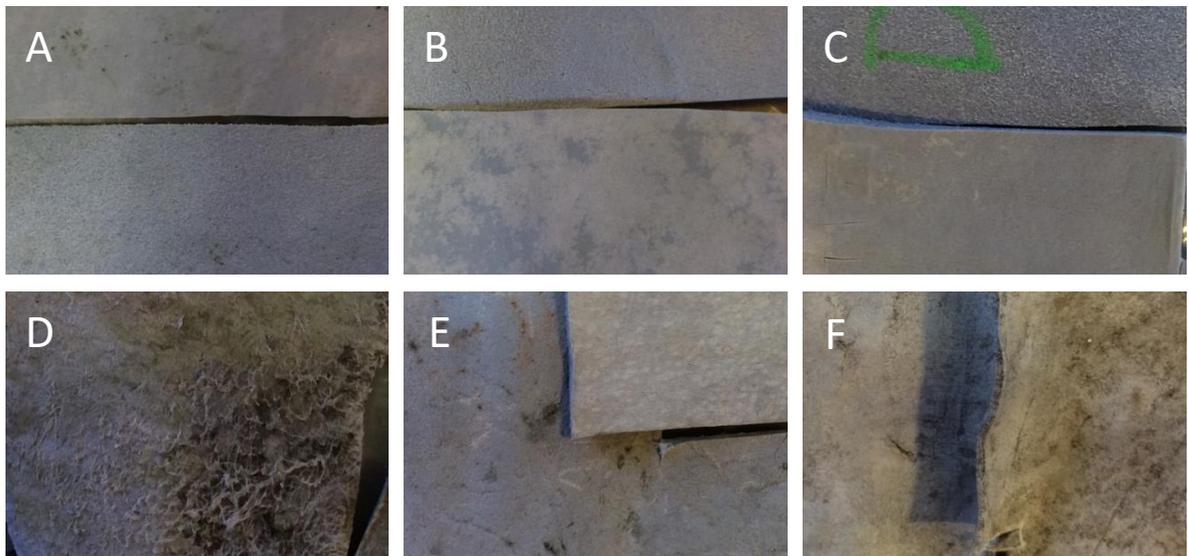
Las bacterias, levaduras y los hongos filamentosos segregan enzimas capaces de degradar macromoléculas como proteínas, grasas y carbohidratos de las pieles y servir como nutriente. Las manchas, problemas con el teñido y las irregularidades de acabado de las pieles son el resultado principalmente por actividades microbianas. El primer signo de esto es el mal olor, más tarde en el deslizamiento del cabello, debido al ataque bacteriano del folículo piloso. La putrefacción causada principalmente por las bacterias al inicio del proceso de curtido puede provocar una pérdida considerable de sustancia, grano suelto y agujeros. Mientras el biodeterioro causado por el ataque de hongos se hace visible como manchas de varios tamaños en tonos-rojizo, verde, amarillo-marrón, marrón oscuro, gris, y marrón-verde, etc.

Los biocidas adecuados presentan propiedades químicas y físicas que les permiten penetrar al cuero y resistir la lixiviación en los procesos de lavado posteriores, para que el principio activo siempre se encuentre disponible y eficaz sobre la superficie del cuero. La elección del tipo de biocida adecuado en el tratamiento de pieles está influenciada por una serie de factores fisicoquímicos. Por ejemplo, algunos son absorbidos rápidamente al contacto con la piel (hidrófobos). Por otra parte, la captación y distribución puede ser desigual e influir en el nivel de protección de las pieles dentro de un lote.

Es importante considerar que generalmente estos compuestos se aplican a concentraciones muy bajas (menos de 0.2 %), por lo que la interacción con otros compuestos puede causar la inactivación de los ingredientes activos. El tiempo de aplicación es un factor muy importante que mejora la penetración del fungicida en el cuero, por lo que la aplicación de los microbicidas en varias dosis e incluso combinando dos o más biocidas; puede extender el efecto contra las diferentes especies de hongos. Por lo que regularmente se aplican junto con el TCMTB otros compuestos heterocíclicos como OIT. Por lo general, esos biocidas se agregan al

inicio de curtido en una cantidad que va desde la mitad a dos tercios y el resto se agrega antes del final del proceso de curtido. Según algunos reportes, OIT y TCMTB son más efectivos cuando se añaden al inicio del proceso, mientras que para PCMC y OPP el tiempo de aplicación es después de agregar el agente de alcalinización.

En este trabajo, se obtuvieron 6 muestras de pieles “cuero azul” proporcionadas amablemente por la empresa “Productos curtientes” para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos. Adicionalmente, se les realizó el análisis de contenido de biocidas por HPLC-DAD. Antes de ello, se inició con la caracterización física de las muestras de cueros las cuales fueron nombradas de la letra “A” hasta “F” y se describieron las características físicas como color, textura, presencia de manchas, aspecto de ellas (Figura 7, Tabla 4). Todas las muestras presentaban el color azul característico del tratamiento con sales de cromo; las muestras A, B, C y E eran suaves y maleables, mientras que las muestras “D” y “F” presentaron un aspecto “viejo”, rígidas, ásperas y deterioradas. Todas las muestras presentaban manchas puntuales de color blanco, verde, café y/o rojizo con diferentes tonalidades. La presencia de las manchas de diferente color sugiere la presencia de microorganismos.



**Figura 7. Apariencia de las distintas muestras de piel “cuero azul” analizadas.** Las muestras fueron proporcionadas amablemente por la empresa “Productos Curtientes”, fueron nombradas de la A hasta la F.

**Tabla 4. Descripción del aspecto físico de las muestras de piel “cuero azul” evaluadas y lista general de bacterias y hongos aislados**

Piel	Aspecto físico de las muestras de pieles	Microorganismos aislados	
		Bacterias	Hongos
A	Maleable, suave, con muchas manchas verdes oscuras y café	A1A, A2W	A1, A2
B	Maleable, suave, con pocas manchas verdes y café	BB, BC, BIA	B22, B23
C	Maleable, muy suave, con pequeñas manchas verdes, café y blancas	CIA, CIC	C1B, C11, C21, C221, C23
D	Poco maleables, de aspecto viejo, con muchas manchas café, verdes	DA, DIA, D2B	D111, D121, D121A, D12, D213 D221, D222, D224
E	Algo maleable, ligeramente suave, con manchas café rojizas y verde	E1A, E1B, E1C, E12.1	E1, E2
F	Duro, de aspecto viejo, con manchas verde oscuro y café	FA, FB, FC, FD, F1B, F2B	F11, F131, F132, F21, F21A, F22, F241

Una vez llevado el registró de las características físicas de las piles se procedió por un lado a llevar a cabo el aislamiento de microorganismos como se describió en la parte de materiales y métodos (sección 5.6). En todas las muestras de cuero se obtuvieron aislados tanto de bacterias y hongos filamentosos, y solo una levadura (muestra de piel C). El número de los aislados obtenidos para las diferentes muestras fueron: para la muestra “A” dos bacterias y dos hongos, muestra “B” tres bacterias y dos hongos, muestra “C” dos bacterias y cinco hongos; muestra “D” tres bacterias y ocho hongos; muestra “E” cuatro bacterias y dos hongos; muestra “F” cinco bacterias y seis hongos. Es importante señalar que algunos de los aislados obtenidos de las diferentes pieles, presentaban características fenotípicas similares. El criterio de selección para los aislados fue que, entre la misma muestra de piel, cada aislado presentara características fenotípicas diferente. En total, se aislaron 20 cepas de bacterias y 26 cepas hongos. Como se puede apreciar en la Figura 7 y en la Tabla 4, las muestras D y F, además de presentar un aspecto físico más deteriorado presenta mayor diversidad de microorganismos.

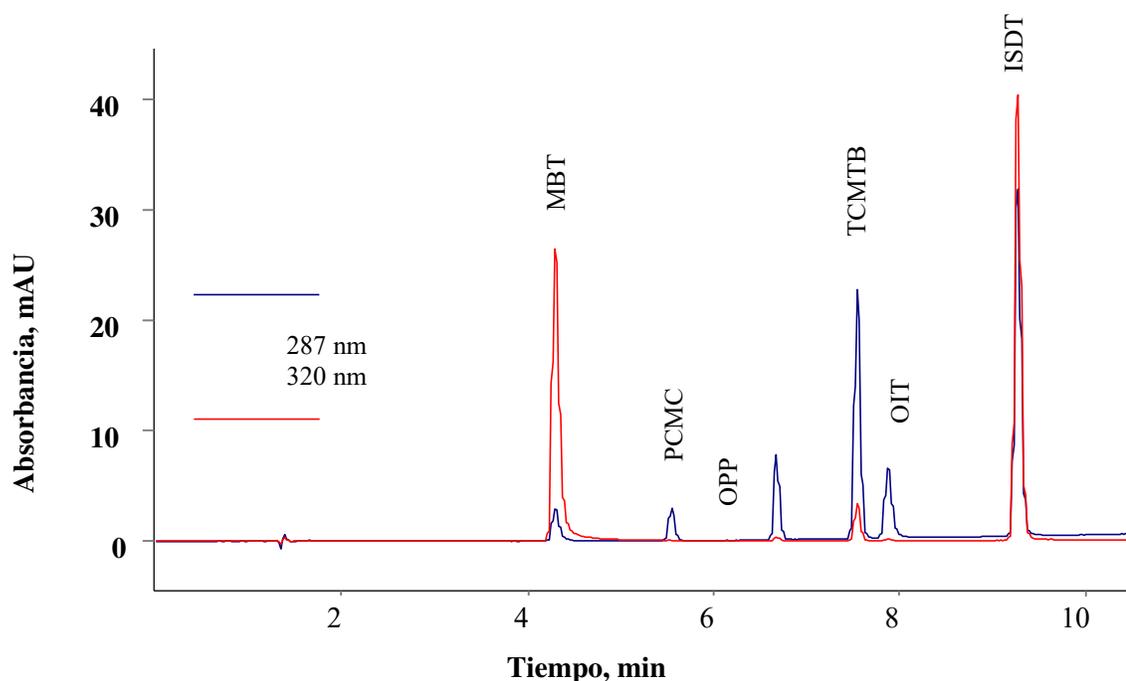
Debido a la diferencia en el número de aislado en cada una de las muestras de piel y con la finalidad de saber el tipo y concentración de biocida utilizado para el

tratamiento de dichas pieles, procedimos a realizar la determinación de biocidas comúnmente utilizados en la industria por HPLC-DAD.

## **6.2 Análisis de biocidas utilizados en la industria de la curtiduría**

De acuerdo con la información proporcionada por la empresa de la región “Productos curtientes”, los principales biocidas actualmente utilizados en el proceso de curtiduría son TCMTB, OIT, PCMC o OPP. Las formulaciones comerciales disponibles pueden contener a los biocidas de manera individual o en mezcla de ellos, con el fin de mejorar su rango de acción. Por lo anterior, se determinó la concentración de PCMC, OPP, TCMTB y OIT por HPLC-DAD en cinco muestras de biocidas proporcionadas por la industria de la curtiduría estas fueron: T33, M1C21, M3, Ecosoft y Preventol.

El análisis se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en la sección 5.4.2 de materiales y métodos. En la Figura 8 se presentan un ejemplo de cromatograma obtenido de una mezcla de estándares que contenía  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada uno de los estándares auténticos: PCMC, OPP, TCMTB, OIT y ISDT. El tiempo de retención asignado para cada estándar del min 4.318, 5.565, 6.699, 7.569, 7.893 y 9.231 para MBT, PCMC, OPP, TCMTB, OIT y ISTD, respectivamente. Como ejemplo del análisis en la muestra de biocidas comerciales, se presenta el cromatograma obtenido para la muestra del biocida “Ecosoft” (Figura 9).



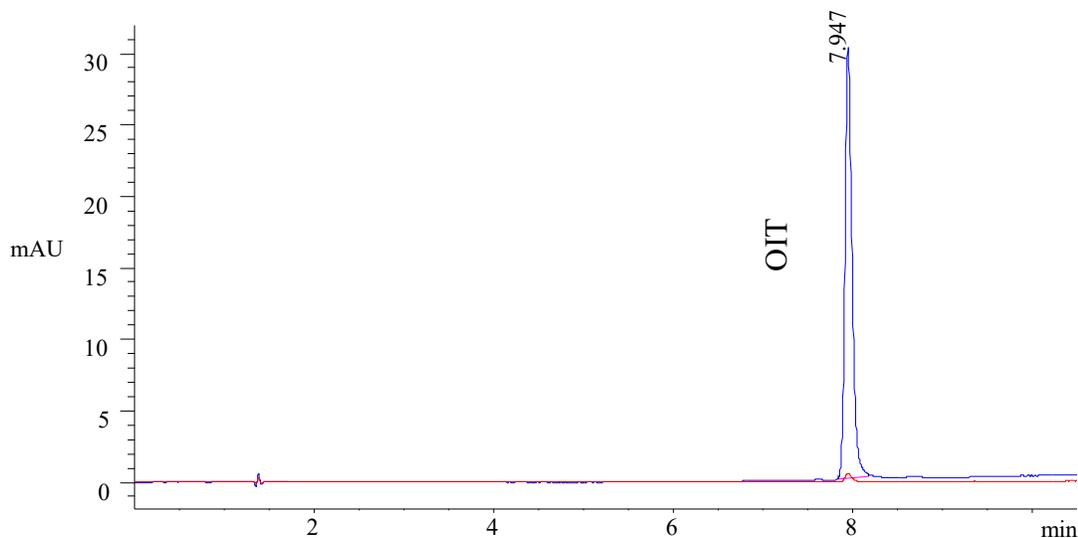
**Figura 8. Típicos cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC de una solución preparada que contenía los estándares auténticos.** Los estándares fueron de: 2-BNP, MBT, PCMC, OPP, TCMTB, OIT y los estándar interno y PPO (6 µg/mL). La detección espectrofotométrica se efectuó 287nm (4-CMF, ISTD:2-BPB, 2-PPO, TCMTB y OIT) y 320nm (MBT y ISTD: PPO).

Los resultados de la determinación de la concentración de los biocidas evaluados son presentados en la Tabla 5. Ecosof contiene un 4.3 % de OIT; M1C21 un 5.3 % de OIT. M3 está compuesto por una mezcla de 2.8 % de *TCMTB* y 1.2 % de OIT. T3 contiene 10.1% de *TCMTB* y preventol está formulado por 30 % de PCMC y 11.9 % de OPP.

**Tabla 5. Concentración de biocidas en muestras líquidas de biocidas comerciales determinadas por HPLC-DAD**

Muestra de biocida	Antibiótico (% v/v)			
	PCMC	OPP	<i>TCMTB</i>	OIT
Ecosof	ND	ND	ND	4.3 ± 0.0
M1C2	ND	ND	ND	5.3 ± 0.0
Biocida M3	ND	ND	2.8 ± 0.0	1.2 ± 0.0
Fungicida T3	ND	ND	10.1 ± 0.0	ND
Preventol	30.0 ± 0.2	11.9 ± 0.0	ND	ND

ND = No detectado



**Figura 9. Cromatograma obtenido de análisis por HPLC del biocida Ecosoft.** revelando OIT (7.947 minutos) a 287nm (azul) y 320nm (rojo).

Posteriormente, se llevó a cabo la determinación del biocida presente en cada una de las muestras de “cuero azul” de donde se aislaron los microorganismos. En la Tabla 6, se puede apreciar que las muestras A y C fueron tratadas con OPP, TCMTB y OIT. La muestra B, fue tratada con PCMC, TCMTB y OIT. La muestra F, solo con TCMTB. Cabe señalar que se encontró presencia de MBT en A, B, C y F, posiblemente como producto de la degradación de TCMTB. En las muestras D y E, no se encontraron residuos de ningún biocida, lo cual sugiere, que estas muestras no fueron tratadas previamente con biocidas.

De acuerdo con los datos de la Tabla 6, el mejor control en cuanto al número de aislados diferentes lo presentan los cueros A y B, las cuales mostraron una concentración superior de  $96.6 \mu\text{g g}^{-1}$  de OIT en combinación con *TCMTB*. Además, se observó un mayor número de diferentes aislados fúngicos cuando la concentración en los cueros fue inferior a  $42.1 \mu\text{g g}^{-1}$  (muestras C, F). La muestra que presentó un mayor número de diferentes aislados fúngicos fue la D, lo cual concuerda con la nula presencia de biocidas detectados. Curiosamente, la muestra F presenta gran cantidad de aislados tanto bacterianos como fúngicos, lo que sugiere que la protección solo con *TCMTB* no fue suficiente para evitar el

crecimiento de los microorganismos o incluso los aislados pueden presentar resistencia a *TCMTB*.

**Tabla 6. Determinación de la concentración de PCMC, OPP, *TCMTB* y OIT en muestras de piel “cuero azul” utilizadas en este estudio**

Muestra de piel	Antibióticos $\mu\text{g g}^{-1}$				
	MBT	PCMC	OPP	<i>TCMTB</i>	OIT
A	$53.5 \pm 0.2$	ND	$16.8 \pm 0.1$	$12.1 \pm 0.1$	$283 \pm 1$
B	$38.3 \pm 1.0$	$16.4 \pm 0.1$	ND	$16.7 \pm 0.1$	$96.6 \pm 0.8$
C	$42.0 \pm 0.1$	ND	$12.9 \pm 0.1$	$13.7 \pm 0.1$	$42.1 \pm 0.1$
D	ND	ND	ND	ND	ND
E	ND	ND	ND	ND	ND
F	$112 \pm 0.1$	ND	ND	$33.7 \pm 0.3$	ND

ND = No detectado

Para una protección efectiva en caso de almacenamiento a largo plazo, el cuero azul tratado con fungicidas debe contener *TCMTB* en un rango de 250–300  $\text{mg L}^{-1}$  y de 100 a 150  $\text{mg L}^{-1}$  de OIT o combinación de 580/280  $\text{mg L}^{-1}$  de PCMC / OPP, respectivamente [5]. La aplicación de los biocidas de la manera antes descrita generalmente permite llevar a cabo un buen control de microorganismos, sin embargo, se puede presentar crecimiento debido a resistencia a los biocidas por los microorganismos.

### 6.3. Identificación de microorganismos aislados de muestras de cuero azul

El cuero curtido es un material importante para la fabricación de una gran cantidad de productos utilizados por el hombre. El supuesto es que los procesos de curtido de cuero evitan el deterioro biológico y previenen la transmisión de microbios de la piel animal a los humanos. No obstante, algunos microorganismos resisten la extrema acidez y alcalinidad de la fabricación del cuero, que además de afectar la calidad del cuero puede incluso representar un riesgo para la salud humana. Por lo tanto, es importante identificar a los microorganismos para llevar a cabo un control adecuado.

### 6.3.1 Bacterias aisladas en pieles

Los aislados obtenidos de cada muestra de cuero fueron caracterizados inicialmente con base en su aspecto macroscópico evaluando el tamaño, forma, borde, color, superficie, tonalidad de la colonia en medio LB sólido (Tabla 7). Cabe señalar que algunos aislados de las diferentes pieles presentaron características fenotípicas similares, por ejemplo, los aislados A1A, B1B, C1A, D1A, E1A y F2B, presentan colonias medianas de forma circular bordes redondeados, brillantes y un color rojo intenso, lo que sugiere que se trataban de la misma bacteria que ataca a todas las pieles. Mientras que otras solo se presentaron en común en algunas pieles; como ejemplo, los aislados A2W y E1B provienen de la piel A y E, respectivamente, como colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color crema. En resumen, algunos aislados son común en todas las pieles, mientras que otras son específicas de una piel en particular. Por lo que los datos de identificación en conjunto con la determinación de los biocidas en cada piel nos podrían sugerir cual podría favorecer a inhibir el crecimiento o la concentración que inhibe su crecimiento.

Para la identificación por MALDI-Biotyper™, se siguió el procedimiento descrito la sección 5.6.1. y 5.7 pero inoculando por triplicado (Figura 10). Aunque el análisis directo de la colonia es muy rápido y sencillo, no en todos los casos se obtuvo un alto valor de score: En algunos casos, para mejorar el score en estos aislado, se procedió a realizar extracción de proteínas. Para ello, se cultivaron los aislados en 2 mL de medio LB y se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.6.1. Los resultados de identificación por MALDI-TOF-Biotyper™ son presentados en la Tabla 7.



**Figura 10. caja de Petri con distintas muestras bacterianas hechas por triplicado.**

De acuerdo con los criterios de identificación del sistema MALDI-Biotyper™, 25 % (5/20) fueron identificados a nivel de género y 70 % (14/20) de los aislados fueron identificados a nivel de especie. Curiosamente, en todas las muestras de piel se aisló a *Serratia rubidaea* (A1A, B1A, C1A, D1A, E1A y F2B; Figura 11) y todos los aislados presentaron un score  $\geq 2.17$  (Tabla 7). Los aislados AW1 y E1B fueron identificados como *Serratia marcescens* con score  $\geq 2.23$ . Se logró distinguir a nivel de especie a los aislados del género *Arthrobacter*: *A. globiformis* (BB), *A. gandavensis* (DA) y *A. sulfonivorans* (BC y FB); todos estos aislados presentaron score  $\geq 2.0$ , excepto el aislado FB (score 1.84). El género de *Kocuria* estuvo representado por los aislados CIC (score 2.16) y FA (score 1.79), identificadas como *K. rhizophila* y *K. rosae*, respectivamente. *R. corynebacterioides* fue aislado de las muestras de pieles D y F; sin embargo, presentaron diferente score; 2.2 para el aislado DB2 y 1.91 para el aislado FD. Tres aislados del género de *Bacillus* fueron identificados: dos corresponden a *B. megaterium* (E1C y FC) y otro identificado como *Bacillus sp.* (F1B); cabe señalar que solo el aislado E1C presentó un score  $\geq 2.0$ . Finalmente, la única cepa que no se pudo identificar correspondió al aislado E1.21.

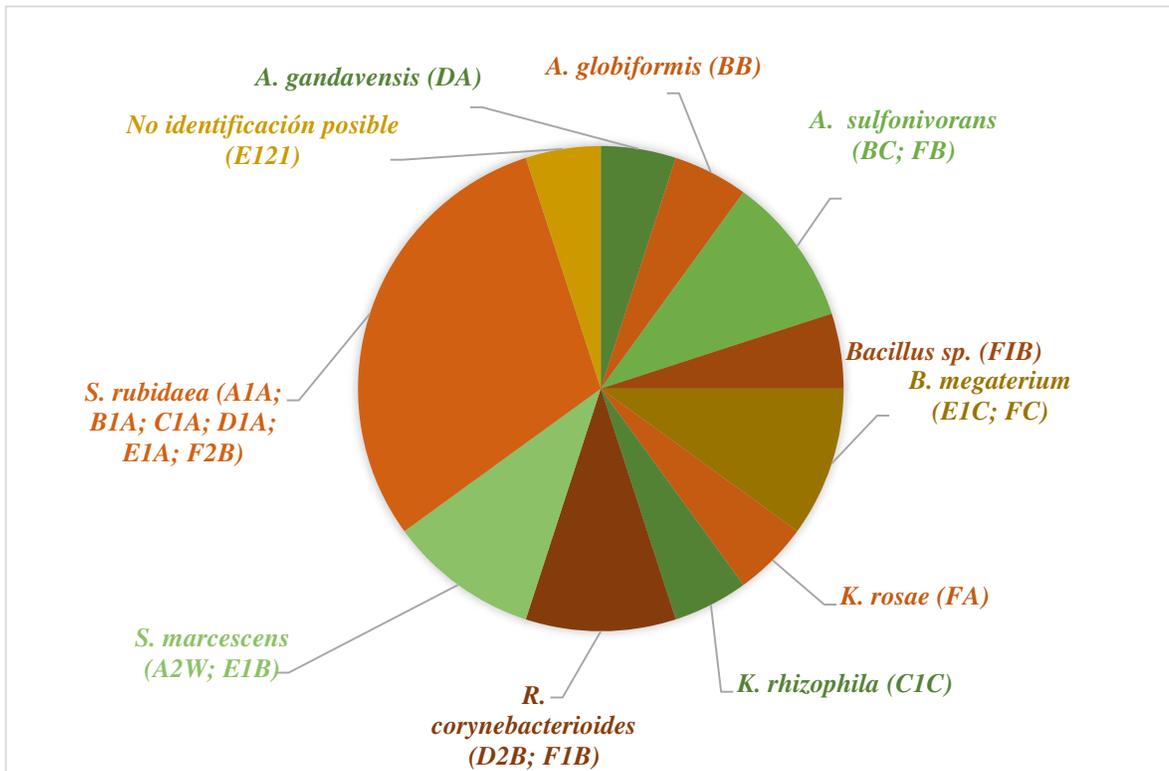
**Tabla 7. Descripción de características macroscópicas e identificación por MALDI-Biotyper™ de las cepas bacterianas aisladas de pieles “cuero azul”**

Aislado <sup>1</sup>	Observaciones macroscópicas <sup>2</sup>	MALDI-Biotyper™	
		Identificación	Score <sup>3</sup>
A1A	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo vino	<i>Serratia rubidaea</i>	2.17
A2W	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color crema	<i>Serratia marcescens</i>	2.23
B1A	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo vino	<i>Serratia rubidaea</i>	2.17
BB	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, semi brillantes, convexas de color crema amarilla	<i>Arthrobacter globiformis</i>	1.99
BC	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, semi brillantes, convexas de color amarillo	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	2.40
C1A	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo vino	<i>Serratia rubidaea</i>	2.26
C1C	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, semi brillantes, plana de color amarillo	<i>Kocuria rhizophila</i>	2.16
DA	Colonias medianas de forma circular y bordes granular, semi brillantes, convexas de color amarillo	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	2.29
D1A	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo intenso	<i>Serratia rubidaea</i>	2.23
D2B	Colonias medianas de forma granular y bordes ondulados, semi brillantes, convexas de color salmón	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	2.20
E1A	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo intenso	<i>Serratia rubidaea</i>	2.14
E1B	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color crema	<i>Serratia marcescens</i>	2.34
E1C	Colonias grandes de forma circular y bordes redondeados, semi mate, convexas de color beige	<i>Bacillus megaterium</i>	2.13
E1.21	Colonias pequeñas de forma circular y bordes redondeados, semi mate, convexas de color beige	No identificación posible	---
FA	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, convexa, semi brillantes, de color rosado	<i>Kocuria rosae</i>	1.69
FB	Colonias medianas de forma circular y bordes granular, semi brillantes, convexas de color crema	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	1.84
FC	Colonias grandes de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color beige	<i>Bacillus megaterium</i>	1.93
FD	Colonias medianas de forma granular y bordes ondulados, mate de color salmón	<i>Rhodococcus corynebacterioide</i>	1.91
F1B	Colonias medianas de forma circular y bordes granular, semi brillantes, convexas de color amarillo	<i>Bacillus sp.</i>	1.75
F2B	Colonias medianas de forma circular y bordes redondeados, brillantes, convexas de color rojo intenso	<i>Serratia rubidaea</i>	2.23

<sup>1</sup> La letra inicial de cada aislado corresponde a la muestra de piel de donde fue aislada.

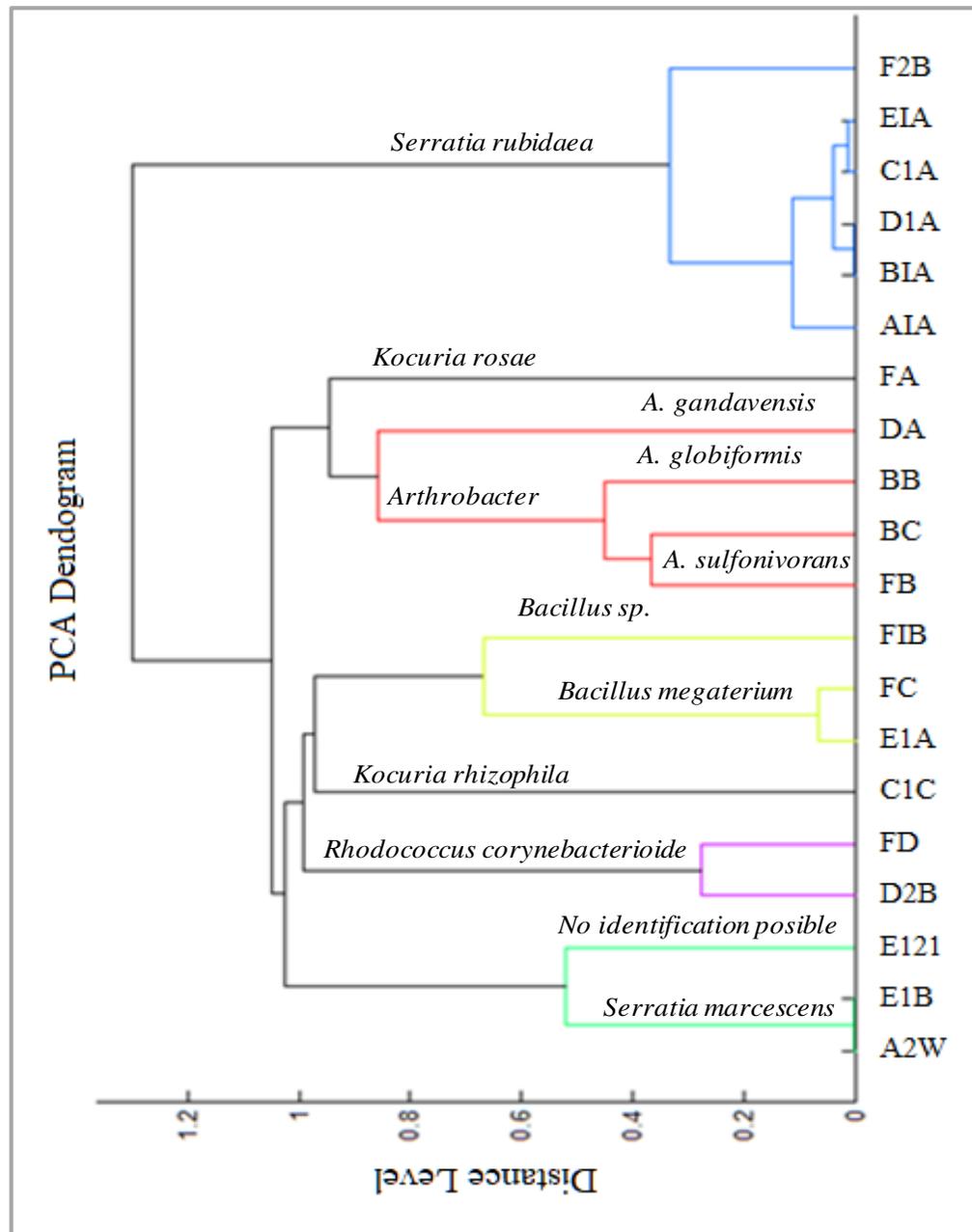
<sup>2</sup> Características de las colonias en medio sólido LB;

<sup>3</sup> Score: Biotyper™ reporta unidades arbitrarias en escala logarítmica con valores en intervalo de 0-3; valores  $\geq 2.0$  permiten la identificación a nivel de especie, los valores entre 1.7 y 2.0 posible identificación a nivel de género, mientras que los valores  $\leq 1.7$  no permiten una asignación confiable.



**Figura 11. Distribución de los aislados bacterianos de las pieles clasificados según su identificación por MALDI-Biotyper™ usando la base de datos de Bruker Daltonics (MBT-BDAL 3.3.1.0). Los aislados son señalados entre paréntesis y la letra inicial de cada aislado corresponde a la muestra de piel de donde fueron aislada.**

El software de Biotyper™ *Compass Explorer* 4.1 permite determinar la correlación entre los aislados de acuerdo con su perfil proteico. Con base en ello, se realizó un dendograma PCA de los espectros de masas obtenidos de todos los aislados (Figura 12). En esta figura se aprecia la alta correlación entre los aislados de *S. rubidaea* excepto para el aislado F2B. Entre los dos aislado de *S. marcescens* prácticame no presentan diferencia. Por otra parte, claramente se observa la diferencia en el nivel de distancia entre los aislados que pertenecen a otro género o especie.



**Figura 12. Dendrograma PCA de los aislados Bacterianos.** Obtenidos mediante el software de Biotyper™ Compass Explorer versión 4.1.

En conjunto los resultados de identificación y determinación de la concentración de biocidas en las pieles sugieren que los biocidas o las dosis aplicadas no son capaces de inhibir el crecimiento de *S. rubidaea*. Esta bacteria es considerada como un patógeno oportunista y que algunos aislados presentan un

fenotipo atípico de resistencia a quinolonas capaces de causar bacteriemia a algunas personas [79, 80], por lo que es importante llevar el control adecuado.

El TCMTB y MBT residual contenido en la muestra de cuero F, fue incapaz de proteger contra el crecimiento de *A. sulfonivorans*, *Bacillus sp.*, *B. megaterium*, *K. rosae* y *R. corynebacterioides*. Por otra parte, cuando la muestra de cuero fue tratada además de TCMTB con OIT y OPP (A y C) fue aislada *S. marcescens* y *K. rhizophila*. Mientras que en la muestra B que presentó PCMC y OIT además de TCMTB, se aislaron *A. globiformis* y *A. sulfonivorans*. En las muestras de cuero que no se encontró ningún biocida analizado (D y E) se identificó *A. garidavensis*, *B. megaterium*, *R. corynebacterioides*, *S. marcescens* y un aislamiento que no pudo identificarse (E121).

Algunos de los aislados identificado en este trabajo ya han sido reportados previamente en la literatura en productos o el ambiente de la industria de la curtiduría. Bacterias del género *Arthrobacter* (aislado de muestras de animales), *Kocuria*, *Bacillus* [81] y algunas bacterias halófilas han sido identificadas exitosamente por MALDI-TOF [82, 83]. Por ejemplo, se ha reportado cepas de *B. megaterium* entre las bacterias que causan la perforación durante el proceso de remojo, en productos en proceso de curtido o productos terminados. *B. megaterium*, *Bacillus sp.* y *K. rosae* también se han aislado del ambiente interior de las curtiembres [7, 8] y un nuevo aislado de *K. rosea* ha sido reportado capaz de tolerar condiciones extremas (pH 9.2 y 15% de concentración de NaCl) [26]. *S. marcescens* se han aislado de efluente de curtido [27] y la mucosa orofaríngea de trabajadores de la curtiduría [6]. Es importante señalar que debido a que las muestras de pieles fueron obtenidas del tratamiento de curtido por sales de cromo, estas cepas podrían tener además de posible resistencia a biocidas utilizados, capacidad para tolerar/reducir el cromo, como la cepa de *Serratia sp.* Zhang y col. (2011), la cual presenta capacidad de remover especies de Cr [84]. Por otra parte, los aislados de *S. rubidaea*, *A. garidavensis*, *A. globiformis*, *A. sulfonivorans*, *R.*

*corynebacterioides* y *K. rhizophila* no han sido reportados previamente en el cuero o en su entorno de producción.

En resumen, se aislaron 20 bacterias de muestras de pieles “cuero azul” lográndose identificar 14 bacterias a nivel de especie y 5 bacterias a nivel de género, por lo tanto, MALDI-TOF Biotyper™ es una herramienta útil para la identificación de bacterias provenientes de pieles. En todas las muestras de piel se encontró a *S. rubidaea*.

### **6.3.2 Hongos aislados de pieles**

La caracterización fenotípica de los aislados se inició con el crecimiento en cajas de Petri de 60 mm a 28°C y después de 7 días de cultivo se registraron características tales como: tipo de hongo (filamentoso o levadura), el color, la textura de la superficie colonial [algodonosa, aterciopelada, polvosa (harinosa)] y matiz del reverso de la colonia, así como producción y pigmentación de la espora [85].

Esta caracterización inicial nos permitió seleccionar diferentes aislados presente en las diversas pieles. Cabe señalar al igual que en las bacterias, algunos hongos presentaban características fenotípicas similares entre sí, pero fueron seleccionados para más caracterización, ya que provenían de diferentes muestras de piel. Como se presentó en la Tabla 4, se aislaron 26 cepas fúngicas provenientes de las seis muestras de cuero azul. La letra inicial de cada aislado indica la muestra de la piel de donde fue aislada. En general, todos los aislados presentaron características de hongos filamentosos, excepto el aislado C1B, que fue la única levadura obtenida (Tabla 8). La imagen de cada una de ellas en medio PDA se muestra en el recuadro de las figuras 14-19. Como era de esperarse, es difícil llevar a cabo la identificación por este método, por lo que la caracterización morfológica solo la utilizamos para llevar un registro fenotípico de cada una de ellas.

**Tabla 8. Características morfológicas de las 26 cepas fúngicas aisladas de seis diferentes muestras de piel “cuero azul”**

Aislado	Observaciones		
	Frente <sup>1</sup>	Reverso	Espora <sup>2</sup>
<b>A1</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige	Café oscuro
<b>A2</b>	Micelio blanco granular	Blanco-verde	Verde-amarillo
<b>B22</b>	Micelio blanco	Beige corrugado	Verde oliva
<b>B23</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige-azul	Café claro
<b>C1B</b>	Levadura de aspecto cremosa	Beige	NP
<b>C11</b>	Micelio blanco algodonoso	Blanco-beige	NP
<b>C21</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige corrugado	Verde oliva
<b>C221</b>	Micelio blanco aterciopelado	Blanco	blanco
<b>C23</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige-azul	Café claro
<b>D11</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige	Café claro
<b>D121</b>	Micelio blanco aterciopelado	Crema	Café muy claro
<b>D121A</b>	Micelio blanco aterciopelado	Crema	Verde claro
<b>D12</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige corrugado	Verde oliva
<b>D213</b>	Micelio blanco aterciopelado	Rojo	Verde opaco
<b>D221</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige-azulado	Café claro
<b>D222</b>	Micelio blanco aterciopelado	Crema. Beige	Verde olivo
<b>D224</b>	Micelio blanco aterciopelado	beige	Café oscuro
<b>E1</b>	Micelio blanco aterciopelado	beige	Café oscuro
<b>E2</b>	Micelio blanco polvoso	beige	Verde olivo -amarillo
<b>F11</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige	Café claro
<b>F131</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige-azul	Café oscuro
<b>F132</b>	Micelio blanco aterciopelado	Beige	Café claro
<b>F21</b>	Micelio blanco muy compacto	Crema corrugado	Verde oliva claro
<b>F21A</b>	Micelio blanco compacto	Beige corrugado	Verde gris claro
<b>F22</b>	Micelio blanco colonia muy pequeña	Beige-oscuro	Verde oscura
<b>F241</b>	Micelio blanco algodonoso	Beige verde	Verde oliva

<sup>1</sup> La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislada.

<sup>2</sup> Producción y color de las esporas.

NP = No presenta

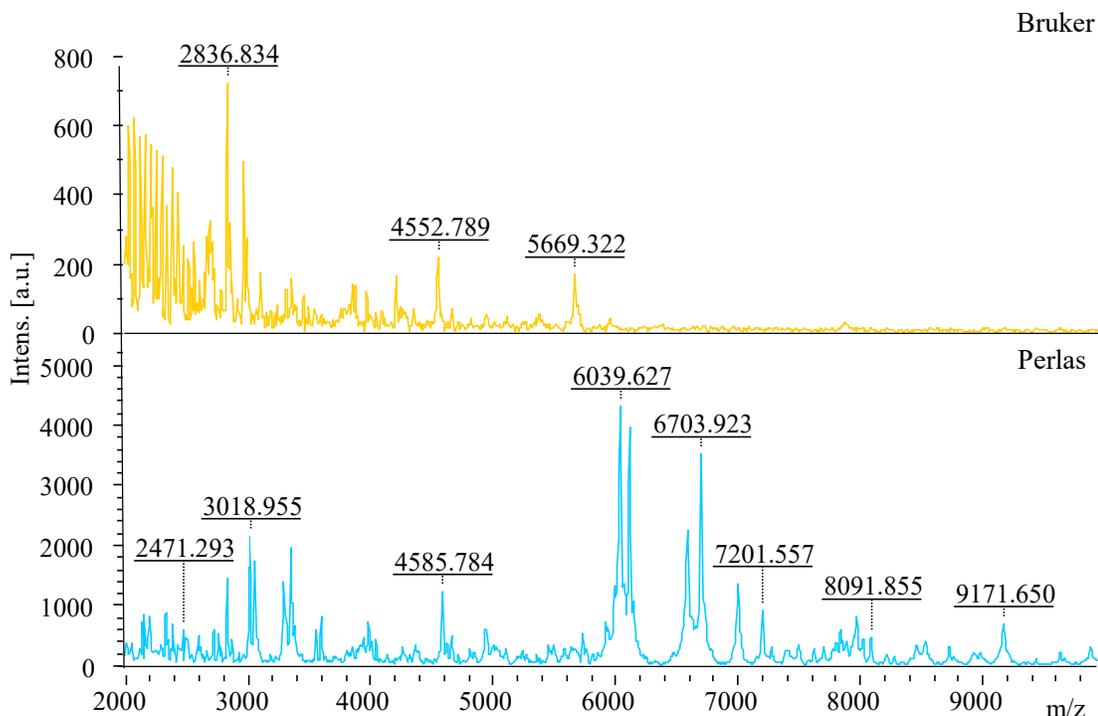
Para la identificación de los aislados fúngicos por MALDITOF-Biotyper™, inicialmente se llevó a cabo el cultivo de los hongos en medio líquido en medio PD natural por periodo de 18- 48 h) y la extracción de proteínas se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por el fabricante (sección 5.7.2 y 5.8.). Cabe señalar que para algunos aislados no se logró obtener espectros de masa de calidad, por lo que se realizaron ajustes al protocolo de extracción. La generación de espectros de

masas de alta calidad y reproducibles es un factor muy importante para obtener un valor de score lo más alto posible y por lo tanto una mejor identificación.

Para evitar posibles interferencias por el medio de cultivo (PD natural), decidimos llevar a cabo el crecimiento de los hongos en medio Dextrosa Sabouraud ajustando el tiempo de crecimiento a 24 h como máximo. Transcurrido el tiempo, el medio fue eliminado mediante filtración y lavado 3 veces con agua destilada estéril. Del micelio obtenido se tomó 200 a 400 mg y se colocó en un tubo eppendorf haciendo un lavado con 1mL de etanol al 70% y mezclándolo por vórtex durante un minuto y centrifugando a 10 000 x g por un minuto. El lavado se repitió dos veces más y la pastilla se dejó secar totalmente.

El micelio seco se transfirió a un tubo de 2 mL que contenía perlas de zirconio (0.5 mm de diámetro) y se agregó 100  $\mu$ L de ácido fórmico al 70 %, y el mismo volumen de MeCN con PMSF 2 mM. El tubo se colocó en el homogeneizador (Bead Bug) y se inició el rompimiento agitándolos a 4000 x g por 20 segundos y enseguida enfriando con hielo por un minuto, repitiendo el proceso cuatro veces. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000xg por un minuto. Un  $\mu$ L sobrenadante obtenido fue colocado en la placa de MALDI junto con la matriz (HCCA) para su análisis.

La implementación de este protocolo permitió obtener un espectro de masas con mejor calidad. En la Figura 13, se muestra un ejemplo de los espectros de masas del aislado F11 obtenido tanto con la metodología propuesta por el fabricante y el rompimiento con perlas de zirconio. Cabe señalar, que esta metodología rompimiento con perlas de zirconio solo se aplicó para los aislados que inicialmente no se obtuvo un buen espectro de masas. Sin embargo, de manera general se estandarizaron las condiciones a medio Dextrosa Sabouraud y 24 h de crecimiento. Excepto para el aislado F22, el cual solo logró crecer en medio PD.



**Figura 13. Ejemplo de espectros de masas de la muestra F11 obtenido por dos métodos de extracción.** La extracción de las proteínas se realizó por el método descrito por el fabricante (Bruker Daltonics) y el propuesto (perlas) en este trabajo de tesis utilizando perlas de zirconio (0.5 mm de diámetro) para el rompimiento.

Todos los espectros de masas obtenidos fueron de alta calidad (Figuras 14-19). A continuación, se describe las características fenotípicas para cada aislado (Tabla 4 y recuadro de Figura. 14-19) y la identificación inicial por MALDI-TOF Biotyper™ utilizando la base de datos proporcionada por el fabricante (Tabla 9).

De la muestra de piel A (Tabla 4), se obtuvieron dos aislados de hongos filamentosos que se denominaron A1 y A2 (Tabla 9, Figura 14). El aislado A1 presentó una coloración de micelio blanco, aterciopelado que con el tiempo formo esporas de color café oscuro y se identificó como *Aspergillus sydowii*, aunque con muy bajo score (1.77). El aislado A2 presentó micelio blanco y esporas en el centro de la colonia color verde claro y algunas tonalidades amarillas y no logró la identificación por MALDI-TOF-Biotyper™ utilizando la base de datos de Bruker

Daltonics (Tabla 9), a pesar de que se obtuvieron espectros de alta calidad como se mencionó anteriormente. Interesantemente, la muestra de cuero también presentaba manchas de color café y verdes.

**Tabla 9. Identificación por MALDI-Biotyper™ de las cepas fúngicas aisladas de pieles “cuero azul” utilizando la base de datos de Bruker Daltonics**

Aislado <sup>1</sup>	Organismo	Score <sup>2</sup>	Aislado <sup>1</sup>	Organismo	Score <sup>2</sup>
A1	<i>Aspergillus sydowii</i>	1.77	D213	No identificación	---
A2	No identificación	---	D221	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.11
B22	<i>Penicillium glabrum</i>	1.75	D22	No identificación	---
B23	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.2	D24	No identificación	---
C1B	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2.24	E1	<i>Aspergillus flavus</i>	1.71
C11	<i>Arhhrinium phaeospermum</i>	1.78	E2	No identificación	---
C21	No identificación	---	F11	No identificación	---
C221	No identificación	---	F131	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.3
C23	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.08	F132	No identificación	---
D11	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.11	F21	No identificación	---
D121	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.14	F21A	<i>Penicillium glabrum</i>	1.94
D121A	No identificación	---	F22	<i>Penicillium sp.</i>	1.87
D12	No identificación	---	F241	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.72

<sup>1</sup>La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislada.

<sup>2</sup>Score: Biotyper™ reporta unidades arbitrarias en escala logarítmica con valores en intervalo de 0-3; valores  $\geq 2.0$  permiten la identificación a nivel de especie, los valores entre 1.7 y 2.0 posible identificación a nivel de género, mientras que los valores  $\leq 1.7$  no permiten una asignación confiable.

En la muestra de cuero “B” se aislaron dos hongos filamentosos denominados “B22” y “B23” (Tabla 9, Figura 15). El hongo B22 presentaba una apariencia corrugada por el reverso y una coloración de micelio blanco que con el tiempo formaba esporas en halos de color verde oliva. En el micelio del aislado B23 se observó una coloración beige-azul por el reverso y por el frente blanco aterciopelado con formación de esporas café claro de aspecto polvoriento. La cepa B22 fue identificada como *P. glabrum* con un score bajo de 1.75, mientras que la cepa B23 se identificó como *P. variotii* con score de 2.2 (Tabla 9).

De la muestra de cuero C se aisló una levadura C1B y 4 cepas de hongos filamentosos (Fig. 16). El espectro de masa de cepa C1B correspondió a *Yarrowia*

*lipolytica* (score 2.24), el de la cepa C11 a *Arthrimum phaeospermum* (score 1.78), mientras que las cepas C221 y C23 fueron identificadas como *P. variotii* (score 1.70 y 2.08, respectivamente) (Tabla 9). Estas dos cepas presentan el fenotipo diferente: la cepa C221 presenta un crecimiento micelial blanco aterciopelado y las esporas son blancas, mientras que la cepa C23 el micelio es también blanco, pero con el tiempo se observa la aparición de esporas color café claro, similar al de la cepa B23. El aislado C21 no fue identificado por Biotyper™ y presentó un crecimiento micelar blanco aterciopelado, que en el revés de la colonia se observa corrugado y con el tiempo genera la aparición de esporas color verde oliva.

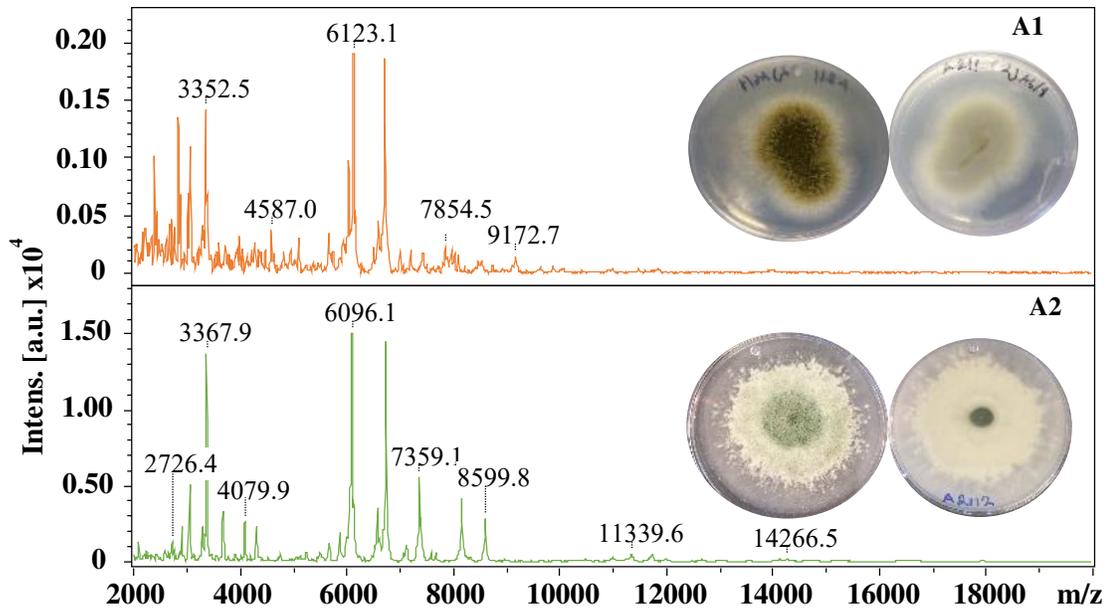
De la muestra cuero E se aisló una gran cantidad de hongos nombrados de la siguiente manera: D11, D121, D121A, D12, D213, D221, D222 y D224 (Fig. 17). Cabe señalar que esta muestra de cuero era una de las que presentaba mayor biodeterioro y no se le detectó ningún fungicida. Las muestras D11, D121 y D221 fueron identificadas por Biotyper™ como *P. variotii* con un score de (2.11, 2.14 y 2.11, respectivamente), sin embargo, en la placa con medio PDA presentaron un fenotipo diferente entre ellas. La cepa D221, presenta el fenotipo similar a los aislados B23 y C23. Mientras que D11 tuvo menor crecimiento colonial y D121 presentó un micelio más granular y esporas de color café más claro. Por otro lado, las muestras D121A, D12, D213, D222 y D224 no fue posible su identificación por Biotyper™. En todos estos aislados se observa diferente el fenotipo al igual que sus espectros de masas. De todos los aislados, la única cepa que presentó pigmentación roja fue la D213. Algunos aislados del género *Penicillium* presentes en pieles curtidas al cromo han sido reportados con esta coloración ([6].

En la muestra de cuero E, se aislaron dos hongos filamentosos nombrados E1 y E2 (Fig. 18). La muestra E1 presentó un crecimiento micelial blanco aterciopelado produciendo esporas color café oscuro y fue identificado como *A. flavus*, aunque con muy bajo score (1.71). Mientras que la cepa E2, no se pudo identificar. El fenotipo que presentó esta cepa en medio PDA fue al inicio un

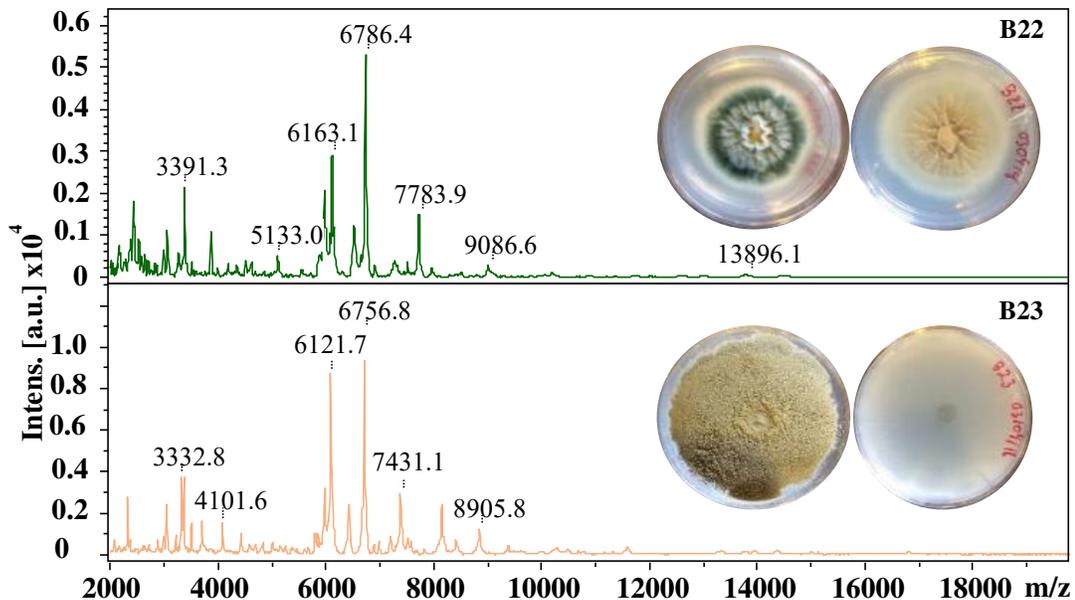
crecimiento micelial blanco, que con el tiempo se volvió amarillo verdoso y producción de esporas verdes olivo parecido a mohó.

Finalmente, de la muestra de cuero "F", aislaron siete cepas denominadas como: F11, F131, F132, F21, F21A, F22, y F241 (Fig. 19). En este grupo, cuatro cepas no se lograron identificar por comparación en la base de datos (F11, F132, F21 y F22). La cepa F131 fue identificada como *P. variotii* (score 2.3) y presentó el fenotipo común de los aislados identificados previamente como *P. variotii* (crecimiento micelial blanco algodonoso que con el tiempo producía esporas café claras). Mientras que los aislados F21A y F241, fueron identificados como *P. glabrum* (score 1.94) y *A. nidulans* (score 1.72) respectivamente.

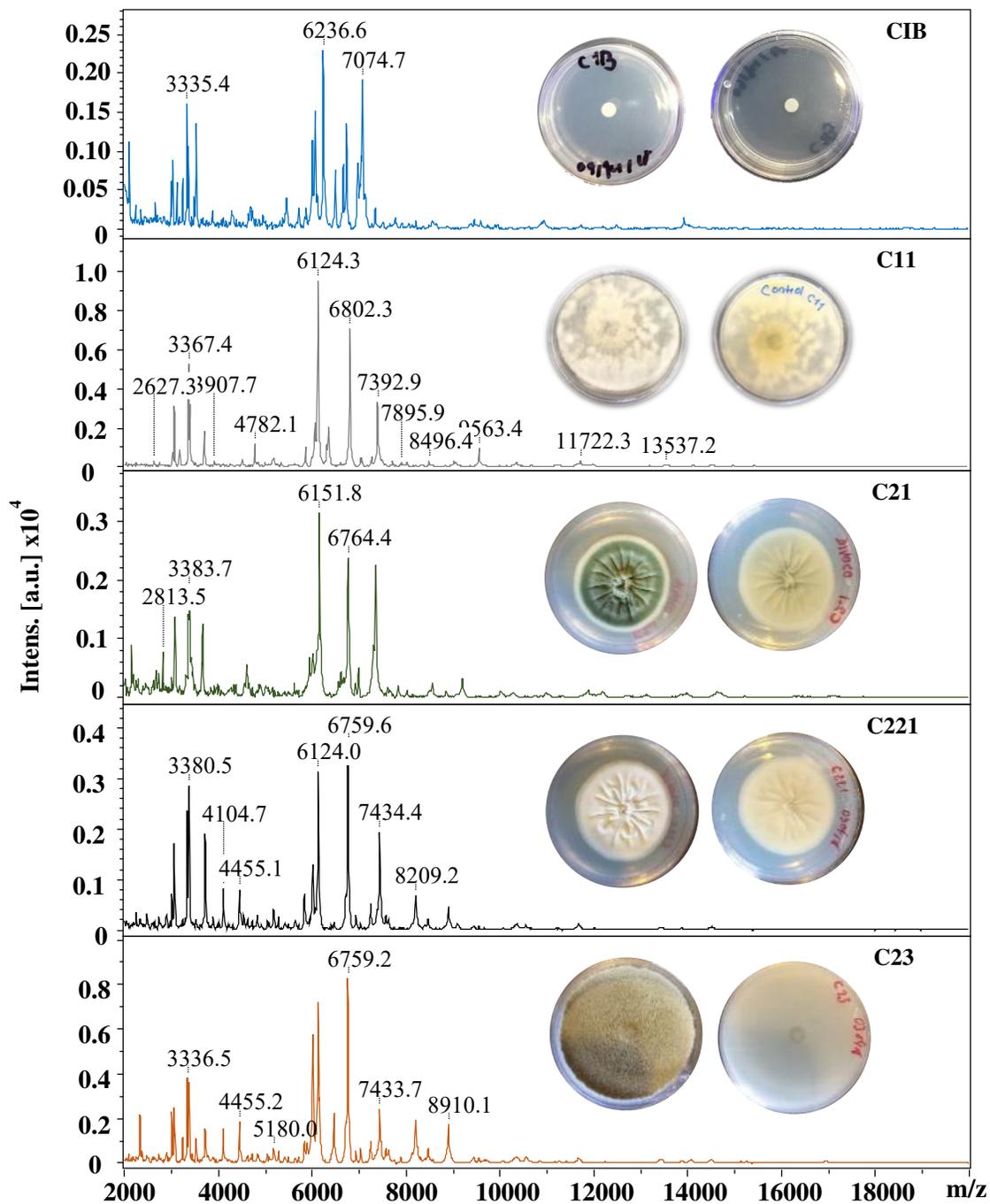
En resumen, del total de los 26 aislados fúngicos, 7 cepas presentaron un score  $\geq 2.0$ , las cuales fueron identidades como *Yarrowia lipolytica* (C1B) y *Paecilomyces variotii* (B23, C23, D11, D121, D221 y F131) y 8 cepas se obtuvieron un score entre 1.7 y 2.0, lo que sugiere su identificación solo a nivel de género. De estas, tres pertenecen al género *Penicillium* (B22, F21A y F241), tres a *Aspergillus* (A1, E1 y F21A), una *Arthrinium* (C11) y otra a *Paecilomyces* (C221).



**Figura 14. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos A1 y A2 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada A.** En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado.



**Figura 15. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos B22 y B23 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada B.** En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado.



**Figura 16. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos CIB, C11, C21, C221 y C23 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada C. En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado**

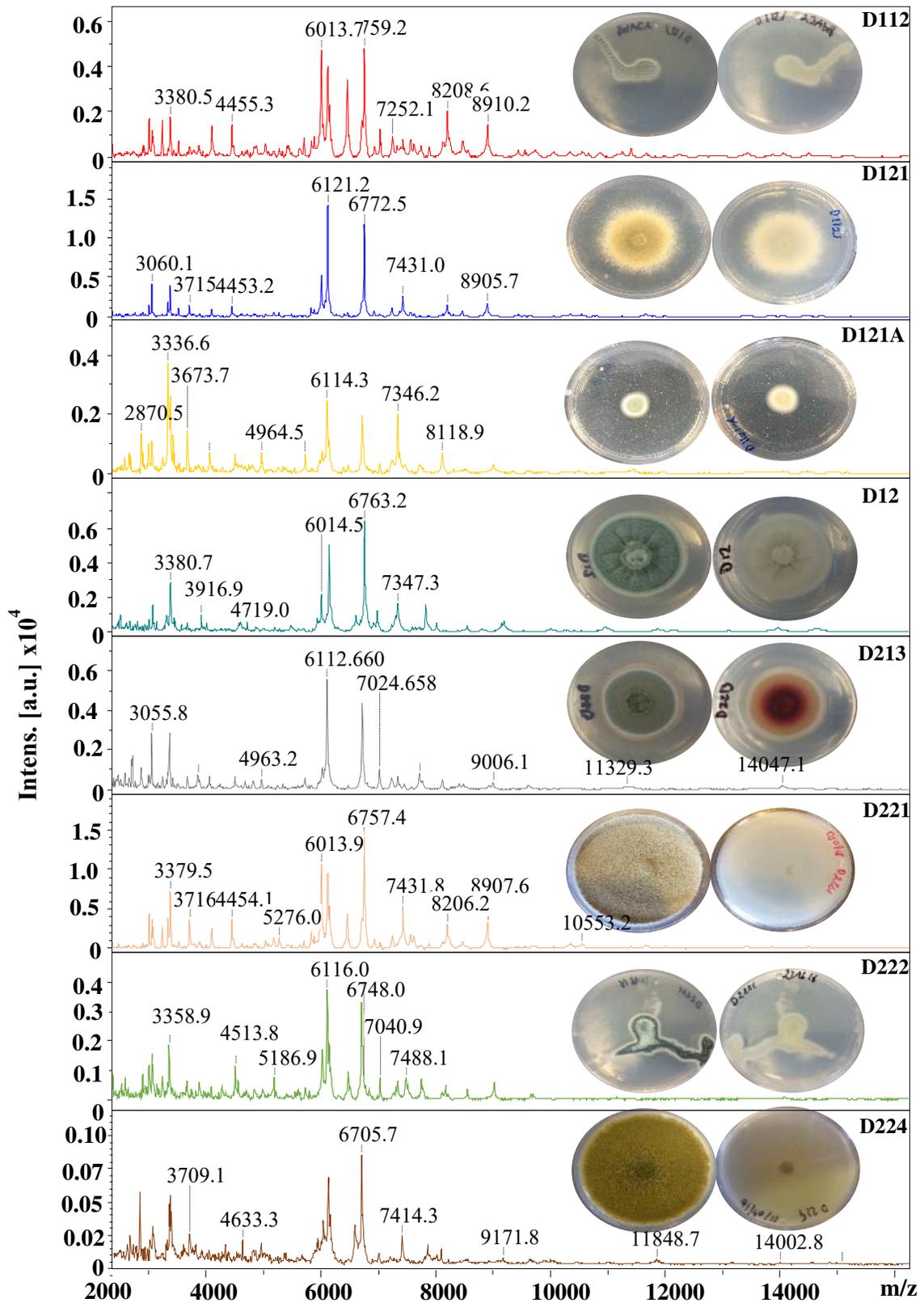
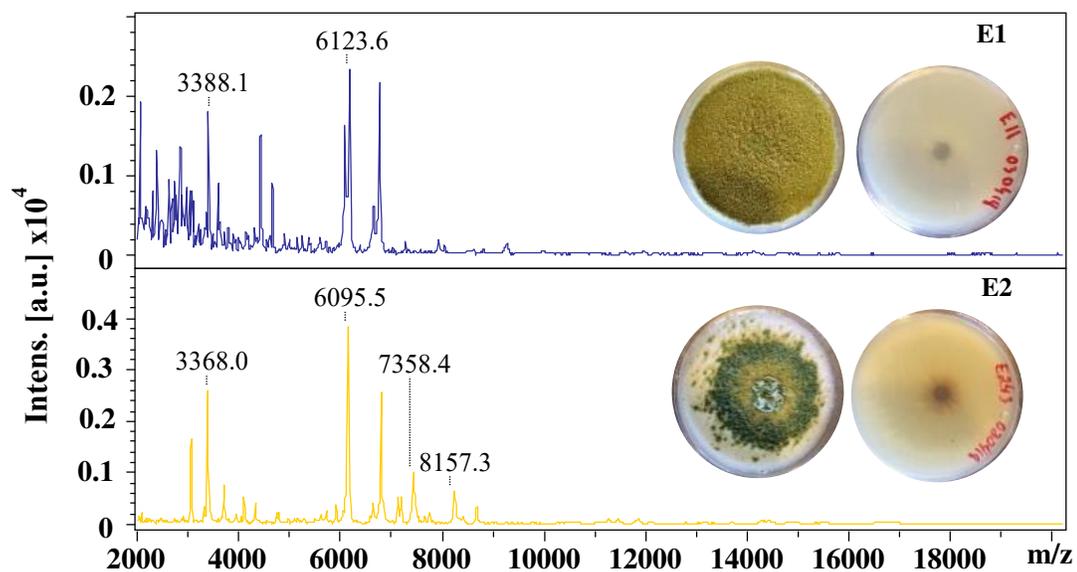
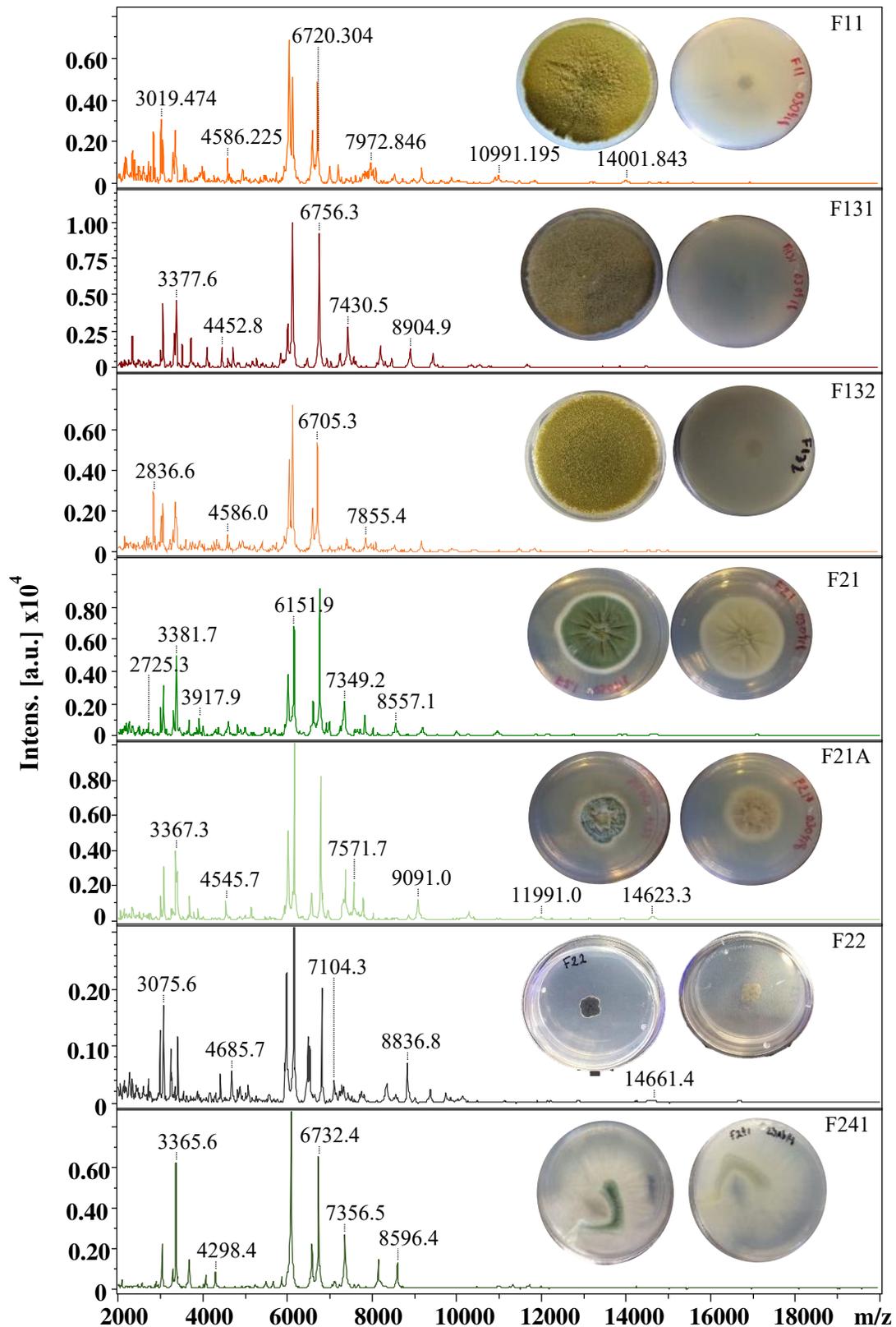


Figura 17. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos D11, D121, D121A, D12, D213, D221, D222 y D224 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada D. En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado.



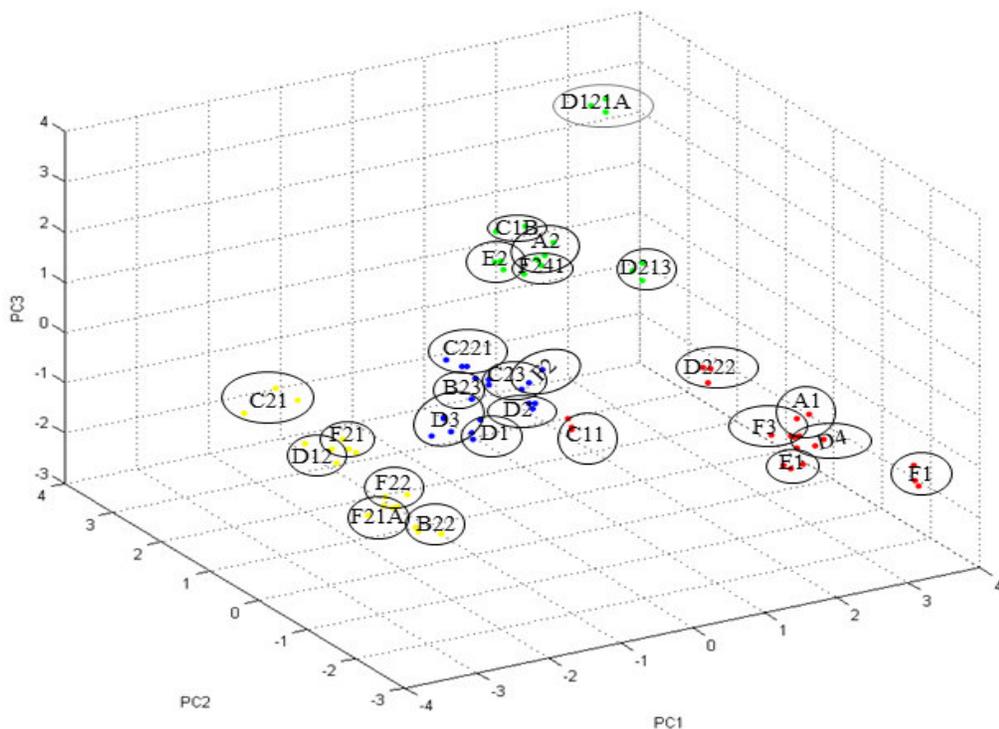
**Figura 18. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos E1 y E2 provenientes de la muestra de “cuero azul” denominada E.** En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado.



**Figura 19. Espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de los aislados fúngicos F11, F131, F132, F21, F21A, F22 y F241 provenientes de la muestra de "cuero azul" denominada E. En el recuadro de cada espectro de masa se muestra la fotografía correspondiente al aislado cultivado en medio PDA por 7 días. La letra inicial de cada cepa corresponde a la muestra de piel de donde fue aislado.**

## 6.4 Creación de espectros de masas principales (MPS)

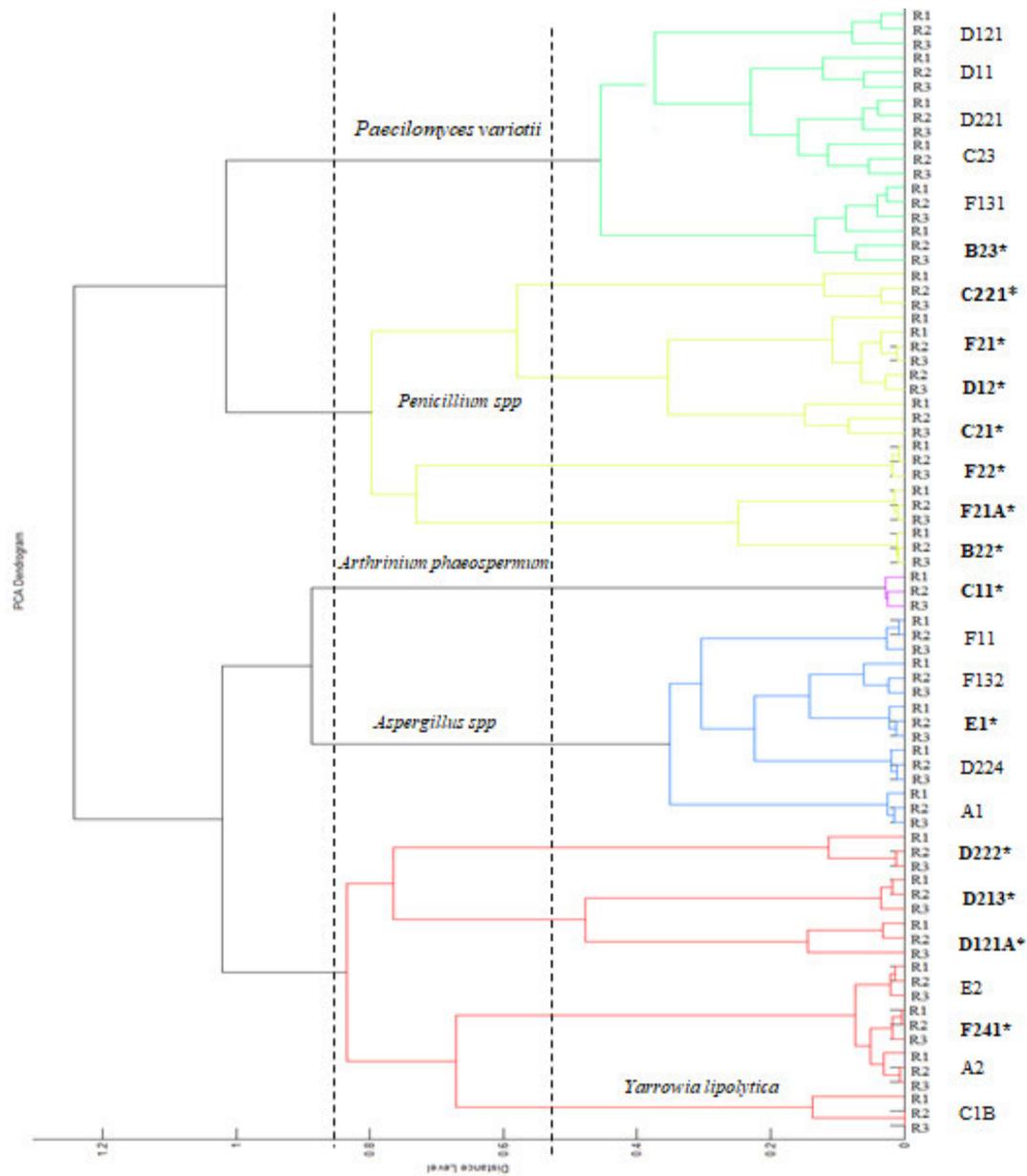
Después de haber obtenido los espectros de masas de cada bloque, se continuo en realizar el descarto de cepas de hongos, debido a sus parecidos fenotípicos y al espectro de masas que presentaron. Para lograrlo se usaron aditamentos estadísticos del programa *MBT Compass Explorer* y se obtuvo un diagrama de análisis de componentes principales (PCA) representado en la Figura 20. Para ello, usaron muestras por triplicado de cada una de las cepas y se puede observar con claridad el agrupamiento entre algunos aislados. En esta figura se puede apreciar el agrupamiento de cepas.



**Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) de los espectros de masas de los aislados fúngicos.** adquiridos en MALDI-TOF MS y analizados con el software *Compass Explorer* (Bruker Daltonics).

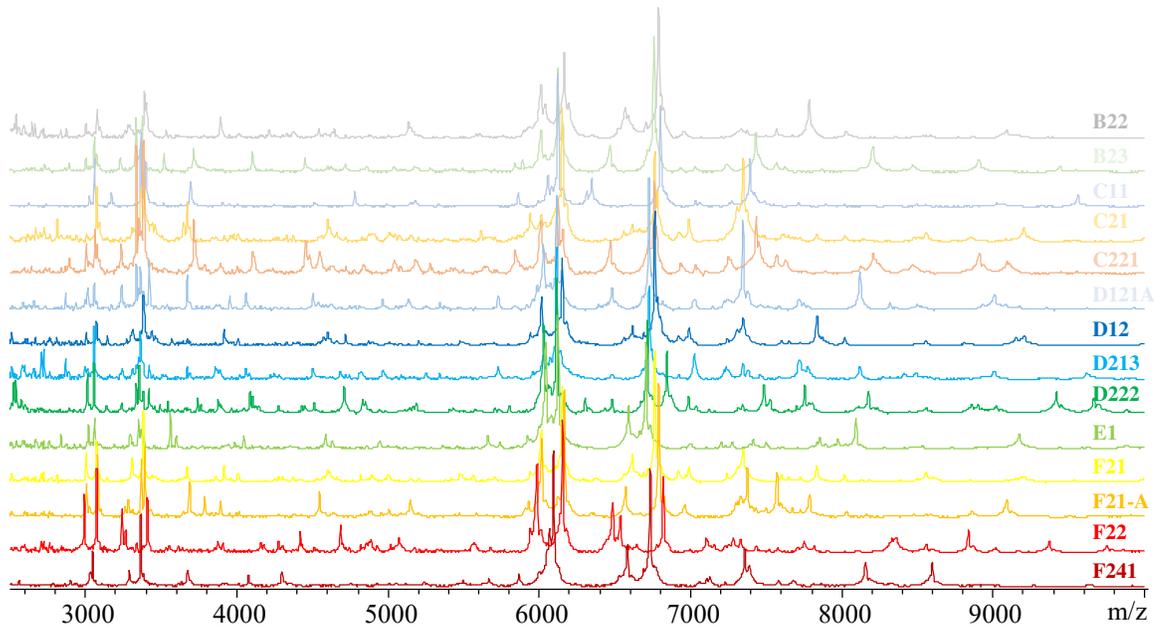
Para seleccionar a los aislados fúngicos que serán incluidos en la librería local, también se llevó a cabo un dendograma PCA con los espectros de masas obtenidos de cada uno de los aislados fúngicos (Fig. 22). La agrupación que realiza el software permitió el ordenamiento en 5 colores (verde, amarillo, morado, azul, y rojo), posiblemente relacionados a nivel de género. En esta figura se aprecia que los aislados identificados como *P. variotii* son asignados en el mismo grupo (verde) a excepción del aislado C221 y cuyo valor de score fue bajo (1.7), lo que nos sugiere que este aislado no es *P. variotii*. Por otra parte, a los hongos del género *Penicillium*, *Arthrimium*, *Aspergillus* y *Yarrowia* los asigna en grupos distintos. Con base en el agrupamiento asignado por el Dendograma PCA y a las características fenotípicas, se decidió seleccionar a algunos aislados para realizar la librería local. El criterio de selección se basó en que presentaran un nivel de distancia superior a 0.5. Los aislados que cumplieron este criterio fueron: B22, B23, C11, C21, C221, D12, D213, D121A, D222, E1, F21 F21A, F22, y F241.

La creación de las entradas para la biblioteca con los espectros principales de los aislados se realizó con los softwares: *Flexcontrol*, *FlexAnalysis* y *Compass Explorer* (Bruker Daltonics). siguiendo la metodología descrita en la sección 5.8 (Creación de base de datos).



**Figura 21. Dendrograma PCA de los espectros de masas adquiridos en MALDI-TOF MS de las cepas fúngicas aislados de pieles “cuero azul”. Para cada aislado se utilizó tres replicas.**

Por último, se generaron espectros principales a partir de los datos recabados, obteniendo 14 espectros principales correspondientes a las cepas: B22, B23, C11, C21, C221, D12, D213, D121A, D222, E1, F21, F21A, F22, y F241. En la Figura 22 se presentan los espectros de masas de cada una de las cepas y se puede observar un perfil diferente de picos para cada una de ellas.



**Figura 22. Comparación entre los espectros de masas de los hongos utilizados para crear la librería local. La relación m/z es de 2500 a 10000.**

Una vez creada las entradas con los espectros principales en la biblioteca, se realizó la validación de esta. Para ello, se cargaron algunos de los espectros de masas antiguos de diferentes muestras de hongos filamentosos correspondientes a las mismas muestras y se procedió a analizar con los MSP recién incorporados en la librería e identificando con puntaje mayor a 2.

Una vez comprobando la eficiencia de la base de datos creada con los mismos espectros de masas se procedió a analizar ahora todas las muestras utilizando la nueva librería como la proporcionada por el fabricante. Los resultados son presentados en la Tabla 10.

**Tabla 10. Identificación por MALDI-Biotyper™ de los aislados fúngicos utilizándolo la base de datos local y la de Bruker Daltonics**

Aislado	Identificación por MALDI-Biotyper™			
	1 <sup>era</sup> coincidencia	Score <sup>1</sup>	2 <sup>da</sup> coincidencia	Score
A1	E1	2.16	<i>Aspegillus sydowii</i>	1.77
A2	F241	2.45	No identificación posible	---
B22	B22	2.6	<i>Penicillium glabrum</i>	1.75
B23	B23	2.64	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.11
C1B	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2.24	<i>Yarrowia lipolytica</i>	2.2
C11	C11	2.68	<i>Arthrimum phaeospermum</i>	1.78
C21	C21	2.59	D12/F21	2.15
C221	C221	2.5	No identificación posible	---
C23	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.1	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.1
D11	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.11	B23	1.88
D121	B23	1.99	<i>Paecilomyces variotii</i>	1.89
D121A	D121A	2.61	D213	2.4
D12	D12	2.64	F21/C21	2.37
D213	D213	2.64	D121A	2.19
D221	B23	2.46	<i>Paecilomyces variotii</i>	2.1
D222	D222	2.7	No identificación posible	---
D224	E1	2.69	No identificación posible	---
E1	E1	2.67	<i>Aspergillus flavus</i>	1.71
E2	F241	2.51	No identificación posible	---
F11	E1	2.57	No identificación posible	---
F131	B23	2.54	C221	2.47
F132	E1	2.49	No identificación posible	---
F21	F21	2.69	D12/C21	2.44
F21A	F21A	2.67	<i>Penicillium glabrum</i>	1.94
F22	F22	2.65	Lab W_2.3 sab	1.87
F241	F241	2.69	No identificación posible	---

<sup>1</sup>Score: Biotyper™ reporta unidades arbitrarias en escala logarítmica con valores en intervalo de 0-3; valores  $\geq 2.0$  permiten la identificación a nivel de especie, los valores entre 1.7 y 2.0 posible identificación a nivel de género, mientras que los valores  $\leq 1.7$  no permiten una asignación confiable.

El aislado A1 coincide con E1 con un score de 2.16; E1 también coincide consigo mismo (2.67), así como con los aislados D224, F11 y F132 (score de 2.69, 2.57 y 2.49, respectivamente). Curiosamente, en todas estas cepas las esporas que se producen en medio PDA son de color café, aunque varía en la tonalidad entre ellas. El aislado A2 coincide con F241 (score 2.45), al igual que con el mismo y E2 (score 2.69 y 2.51, respectivamente). Cabe señalar que el fenotipo mostrado en medio PDA es diferente entre estas tres cepas. B22 solo coincide con el mismo (score 2.60) y no con F21A como era de esperarse por su agrupación en el

dendograma PCA (Fig. 22). B23 coincide consigo mismo con un score de 2.64, al igual que con los aislados D122, D221 y F131 (score 1.99, 2.46 y 2.54, respectivamente); estos aislados y los aislados C23 y D11 fueron identificados en la base de datos previamente como *P. variotii*, aunque estos últimos fueron obtuvieron la misma identificación solo así. C21 presento un alto valor de score (2.59) consigo mismo y fue común con D12 y F21 también (score 2.15). Lo mismo sucedió entre estas cepas (F21 y D12), lo que sugiere que se trata de la misma cepa, ya que el fenotipo en medio PDA también coincide entre sí. El resto de los aislados (C1B, C11, C221, D222, D213 y D121A) presentaron solo coincidencia con ellos mismos, lo que sugiere que son aislados diferentes.

## 7. CONCLUSIONES

Se logró aislar una gran variedad de micororganismos de las distintas muestras de cueros; entre ellos fueron 20 cepas de bacterias, 25 cepas de hongos filamentosos y una levadura.

MALDI-TOF Biotyper™ es una herramienta útil para la identificación de bacterias provenientes de pieles utilizando la base de datos proporcionada por el fabricante. logrando identificar de las cepas bacterianas: 14 a nivel género y 5 a nivel especie.

Por otro lado, para la identificación de hongos filamentosos, es necesario llevar a cabo la ampliación de la librería y complementarla con la identificación molecular. En nuestro caso, de los 25 hongos aislados solo se lograron identificar 7 a nivel de especie y 8 a nivel de genero algunos de ellos siendo una misma especie (6 cepas de *P. variotii*).

La determinación de los biocidas en muestras comerciales sugiere que las dosis aplicadas (o las formas de aplicación) no son adecuadas para inhibir el crecimiento de los microorganismos encontrados en este estudio.

## 8. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la identificación molecular de los aislados no identificados.
- Ampliar la base de datos creada con aislados Fúngicos.
- Encontrar diferencias entre los espectros de masas con biocidas y sin ellos.

## REFERENCIAS

1. INEGI, *INEGI. Estadísticas a propósito de la Industria del Calzado*. 2012. <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/modulosamb/default.aspx>, 2012.
2. González, G.C., A.A. Alonso, and G.C. Torre-Marín, *Innovación tecnológica y curtiduría en el estado de Guanajuato*. Economía Informa, 2017. **402**: p. 66-79.
3. Lofrano, G., et al., *Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: a review*. Sci Total Environ, 2013. **461-462**: p. 265-81.
4. Covington, A.D., *Tanning chemistry: the science of leather*. 2009: Royal Society of Chemistry.
5. Hauber, C., *Microbicide applications in the leather industry*, in *Directory of Microbicides for the Protection of Materials: A Handbook*, W. Paulus, Editor. 2005, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 317-324.
6. Orlita, A., *Microbial biodeterioration of leather and its control: a review*. International biodeterioration & biodegradation, 2004. **53**(3): p. 157-163.
7. Zhang, J., et al., *Biodeterioration process of chromium tanned leather with *Penicillium* sp.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. **116**: p. 104-111.
8. Skóra, J., et al., *The Evaluation of Microbial Contamination in the Working Environment of Tanneries*. Medycyna Pracy, 2014.
9. Niculescu, O., et al., *Finishing Product for Improving Antifungal Properties of Leather*. Leather and Footwear Journal, 2017. **17**(1): p. 31-38.
10. Cuadros Domènech, S., et al., *Alternative fungicides for the leather industry: application in various processes*. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 2012. **96**(6): p. 225-233.
11. Kavitha, S., Y. Khambhaty, and N.K. Chandra Babu, *Evaluation of Industrial Biocides on a Novel *Aspergillus versicolor* TANCK-1 and Elucidation of Their Probable Biocidal Mechanism*. Indian J Microbiol, 2018. **58**(1): p. 51-59.
12. Ciardo, D.E., et al., *Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-year study*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(8): p. 2809-13.
13. Clarridge, J.E., 3rd, *Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(4): p. 840-62, table of contents.
14. Fenselau, C. and P.A. Demirev, *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2001. **20**(4): p. 157-71.
15. Sauer, S. and M. Kliem, *Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(1): p. 74-82.
16. Nomura, F., *Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2015. **1854**(6): p. 528-537.
17. Ruelle, V., et al., *Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(18): p. 2013-9.

18. Santos, I.C., Z.L. Hildenbrand, and K.A. Schug, *Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology*. *Analyst*, 2016. **141**(10): p. 2827-37.
19. Ghosh, R., et al., *Antibiotic resistance profile of halophilic microorganisms isolated from tannery effluent*. *Indian Journal of Biotechnology* 2010. **9**(1): p. 80.
20. Sirvaityte, J., J. Siugzdaite, and V. Valeika, *Application of commercial essential oils of eucalyptus and lavender as natural preservative for leather tanning industry*. *Revista de Chimie*, 2011. **62**(2): p. 5.
21. Özdilli, K., et al., *Biological Hazards in Tannery Workers*. *Indoor and Built Environment*, 2007. **16**(4): p. 349-357.
22. Caglayan, P., et al., *Characterization of moderately halophilic bacteria from the salt-pack cured hides*. *J Soc Leath Tech*, 2015: p. 250-254.
23. Fernandes, I.P., et al., *Development of chitosan-based antimicrobial leather coatings*. *Carbohydr Polym*, 2013. **98**(1): p. 1229-35.
24. Zengin, A.C.A., et al., *Eco-Friendly Soaking Process Using Tannic Acid as an Alternative Bactericide*. *Archives of Environmental Protection*, 2014. **40**(1): p. 3-12.
25. WANG, R.-r., et al., *Leather Science and Engineering*, 2012(2): p. 02.
26. Castellanos-Arévalo Andrea Paola, et al., *Microbial contamination in the indoor environment of tanneries in Leon, Mexico*. *Indoor and Built Environment*, 2015. **25**(3): p. 524-540.
27. Edokpayi, J., R. Oruko, and J. Odiyo, *The Role of Leather Microbes in Human Health*, in *Role of Microbes in Human Health and Diseases*. 2019, IntechOpen.
28. Bilgi, S., B.M. Yapici, and A. Yapici, *Determination of bacterial and fungal numbers in floats of pre-tanning operations*. *African Journal of Biotechnology*, 2009. **8**(8).
29. Castellanos-Arevalo, D.C., et al., *Evaluation of microbial load in oropharyngeal mucosa from tannery workers*. *Saf Health Work*, 2015. **6**(1): p. 62-70.
30. CHIRILĂ, C., V. DESELCU, and M. CRUDU, *Comparative study regarding the resistance of wet-white and wet-blue leather to the growth of fungi*. *Leather and Footwear Journal*, 2014. **14**(2): p. 107.
31. Tigrini, V., et al., *Tannery mixed liquors from an ecotoxicological and mycological point of view: Risks vs potential biodegradation application*. *Sci Total Environ*, 2018. **627**: p. 835-843.
32. Cadirci, B., et al., *new defect on leather: microbial bio-film*. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2010.
33. Lama, A., et al., *Methods of isolation and identification of pathogenic and potential pathogenic bacteria from skins and tannery effluents*. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 2013. **108**(2): p. 48-62.
34. Vankar, P.S. and A.K. Dwivedi, *Sulphates for skin preservation--a novel approach to reduce tannery effluent salinity hazards*. *J Hazard Mater*, 2009. **163**(1): p. 207-12.
35. Dixit, S., et al., *Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat: a review*. *Journal of Cleaner Production*, 2015. **87**: p. 39-49.
36. Bacardit, A., et al., *Evaluation of a new environment friendly tanning process*. *Journal of Cleaner Production*, 2014. **65**: p. 568-573.
37. Kanagaraj, J., et al., *Eco-friendly waste management strategies for greener environment towards sustainable development in leather industry: a comprehensive review*. *Journal of Cleaner Production*, 2015. **89**: p. 1-17.
38. Grice, E.A. and J.A. Segre, *The skin microbiome*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(4): p. 244-53.

39. Machuca, L.M., *Desarrollo de nuevos biocidas derivados de amidas para aplicaciones en la conservación de cueros*, in *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*. 2010, Universidad Nacional de Litoral: Santa Fe, Argentina. p. 1-25.
40. Montanari, M., et al., *Fungal biodeterioration of historical library materials stored in Compactus movable shelves*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012. **75**: p. 83-88.
41. Hanski, I., et al., *Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(21): p. 8334-8339.
42. Lindner, W. and H.-U. Neuber, *Preservation in the tannery*. *International Biodeterioration*, 1990. **26**(2-4): p. 195-203.
43. Vankar, P.S. and A.K. Dwivedi, *Raw skin preservation through sodium salts — A comparative analysis*. *Desalination*, 2009. **249**(1): p. 158-162.
44. Wu, J., et al., *Recent progress in cleaner preservation of hides and skins*. *Journal of Cleaner Production*, 2017. **148**: p. 158-173.
45. Zhang, C., et al., *A salt-free and chromium discharge minimizing tanning technology: the novel cleaner integrated chrome tanning process*. *Journal of Cleaner Production*, 2016. **112**: p. 1055-1063.
46. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice, *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. *Clinical microbiology reviews*, 1999. **12**(4): p. 501-517.
47. Machuca, L.M., *Desarrollo de nuevos biocidas derivados de amidas para aplicaciones en la conservación de cueros*. 2010.
48. Liu, G., et al., *Fabrication of silver nanoparticle sponge leather with durable antibacterial property*. *J Colloid Interface Sci*, 2018. **514**: p. 338-348.
49. Das, S., et al., *Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms*. *J Microbiol Methods*, 2014. **103**: p. 80-100.
50. Moore, E.R., et al., *Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons*. *Res Microbiol*, 2010. **161**(6): p. 430-8.
51. Rossello-Mora, R. and R. Amann, *Past and future species definitions for Bacteria and Archaea*. *Syst Appl Microbiol*, 2015. **38**(4): p. 209-16.
52. Tindall, B.J., et al., *Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010. **60**(Pt 1): p. 249-66.
53. Welker, M. and E.R. Moore, *Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology*. *Syst Appl Microbiol*, 2011. **34**(1): p. 2-11.
54. Glaeser, S.P. and P. Kampf, *Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy*. *Syst Appl Microbiol*, 2015. **38**(4): p. 237-45.
55. Anhalt, J.P. and C. Fenselau, *Identification of bacteria using mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1975. **47**(2): p. 219-225.
56. Claydon, M.A., et al., *The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry*. *Nature biotechnology*, 1996. **14**(11): p. 1584.
57. Krishnamurthy, T. and P.L. Ross, *Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells*. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1996. **10**(15): p. 1992-1996.
58. Maier, T., et al., *Fast and reliable maldi-tof ms-based microorganism identification*. *Nature Methods*, 2006. **3**(4).

59. Sogawa, K., et al., *Use of the MALDI BioTyper system with MALDI–TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **400**(7): p. 1905.
60. Wieser, A., et al., *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review)*. Applied microbiology and biotechnology, 2012. **93**(3): p. 965-974.
61. Timperio, A.M., et al., *Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0181860.
62. Patel, R., *A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification*. Journal of Fungi, 2019. **5**(1): p. 4.
63. El-Nemr, I.M., et al., *Application of MALDI Biotyper System for Rapid Identification of Bacteria Isolated from a Fresh Produce Market*. Curr Microbiol, 2019.
64. Seng, P., et al., *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(4): p. 543-51.
65. Sogawa, K., et al., *Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms*. Anal Bioanal Chem, 2011. **400**(7): p. 1905-11.
66. Li, Y., et al., *Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Aspergillus Species Directly from Growth on Solid Agar Media*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1209.
67. Álvarez-Buylla, A., E. Culebras, and J.J. Picazo, *Identification of Acinetobacter species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques?* Infection, Genetics and Evolution, 2012. **12**(2): p. 345-349.
68. Daltonics, B., *MALDI Biotyper CA System, Clinical Application for Identification of Microorganisms*. 2014: Billerica, MA USA.
69. Veloo, A., et al., *The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(12): p. O1091-O1097.
70. Pasciak, M., et al., *Creation of an In-House Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Corynebacterineae Database Overcomes Difficulties in Identification of Nocardia farcinica Clinical Isolates*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(8): p. 2611-21.
71. Sogawa, K., et al., *Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database*. Anal Bioanal Chem, 2012. **403**(7): p. 1811-22.
72. Zvezdanova, M.E., et al., *Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library*. Med Mycol, 2018.
73. Van Driessche, L., et al., *Rapid detection of tetracycline resistance in bovine Pasteurella multocida isolates by MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA)*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13599.
74. Font, J., et al., *Determination of TCMTB and other fungicides in leather*. Journal of the American Leather Chemists Association, 2011. **106**(11): p. 341.
75. Ames de Icochea, T., *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. 2004: International Potato Center.
76. Maier, T., et al., *Fast and reliable MALDI-TOF MS–based microorganism identification*. Nature Methods, 2006. **3**(4): p. i-ii.

77. GmbH, B.D., *MALDI Biotyper Protocol Guide*, in 2. 2014. p. 6-30.
78. Cassagne, C., et al., *Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification*. *Mycoses*, 2016. **59**(11): p. 678-690.
79. Gentile, D., M. Pérez, and M.J. Centelles, *Bacteriemia por Serratia rubidaea con fenotipo atípico de resistencia a quinolonas*. *Revista chilena de infectología*, 2014. **31**(3): p. 351-352.
80. Kumar, S., et al., *Red discoloration of urine caused by Serratia rubidaea: A rare case*. *Avicenna journal of medicine*, 2013. **3**(1): p. 20.
81. Storms, V., et al., *Arthrobacter gandavensis sp. nov., for strains of veterinary origin*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. **53**(Pt 6): p. 1881-4.
82. Prisyazhnaya, N.V., et al., *Application of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of closely related species of the "Arthrobacter crystallopoietes" phylogenetic group*. *Microbiology*, 2012. **81**(6): p. 696-701.
83. Vargha, M., et al., *Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of Arthrobacter isolates*. *Journal of microbiological methods*, 2006. **66**(3): p. 399-409.
84. Zhang, K. and F. Li, *Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium Serratia sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011. **90**(3): p. 1163-1169.
85. Watanabe, T., *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 2010: CRC press.