

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN BACTERIAS HALÓFILAS  
AISLADAS DE CAMAS DE SALADO DE CURTIDURÍA DE  
PIELES DE GANADO.”**

**TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA**

**Que para obtener el Título de**

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

**Presenta:**

**María Isabel Murrieta Dórame**

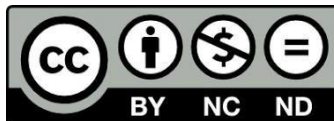
**Hermosillo, Sonora**

**Diciembre 2018**

# Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACIÓN**

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de María Isabel Murrieta Dórame la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

---

**Dra. Itzamná Baqueiro Peña**  
**Presidente**

---

**Dr. Aldo Arvizu Flores**  
**Secretario**

---

**Dra. Maritza Álvarez Ainza**  
**Vocal**

---

**Mtra. Griselda Moreno Ibarra**  
**Suplente**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar a esta etapa dándome la fuerza y la perseverancia necesaria para continuar a pesar de los obstáculos.

A la Universidad de Sonora mi alma mater, por brindarme las herramientas, conocimientos y habilidades para ser un profesional, a mis maestros quienes formaron parte fundamental de mi formación integral y a todas las personas que directa o indirecta fueron parte de este proceso.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) por abrirme las puertas de una manera tan cálida primeramente en mi servicio social y finalmente en mi proyecto de tesis, especialmente a la división de ciencias de los alimentos y muy particularmente al Laboratorio de biotecnología industrial por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mi comité de tesis, Dra. Itzamná Baqueiro, Dr. Aldo Arvizu, Dra. Maritza Álvarez, Mtra. Griselda Moreno, gracias por el tiempo que dedicaron a este proyecto, por sus cocimientos, por sus consejos y sugerencias.

Al Dr. José Ángel Huerta y la Mtra. Ciria Figueroa quienes me apoyaron durante varias ocasiones a lo largo de mi experimental.

A mi directora de tesis, Dra. Itzamná Baqueiro quién me brindó la confianza para llevar a cabo este proyecto y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por su paciencia infinita, por siempre tomarse el tiempo de la explicación “con manzanitas” y por todo su apoyo en todos los ámbitos. Quedo infinitamente agradecida también, por ayudarme a tener más confianza sobre mis decisiones, ayudarme a madurar en mi forma de trabajo, así como mil y una lecciones que aprendí gracias a usted.

Al Laboratorio de Biotecnología Industrial, Amanda, gracias por todo tu apoyo técnico en el laboratorio. Alejandra muchas gracias por el tiempo dedicado y toda tu asesoría. Carolina muchas gracias por tu apoyo infinito durante mi experimental, el tiempo que le dedicaste, así como por la buena compañía y el equipo que formamos. Victor muchas gracias por todo tu apoyo a lo largo de todo este proyecto, así como en mi presentación en Vallarta, por todos los tips, las enseñanzas que fueron infinitas, las charlas y las experiencias que vivimos. Carol Rodríguez, mi colombianita muchas gracias por alegrar los días en el LBI con tus cantos y bailes, también muchas gracias por tu apoyo durante mi experimental y mi trabajo.

Dafne Ávila, gracias por todo tu apoyo durante mi trabajo de tesis, por siempre quedarte a hacerme compañía pesar del cansancio y la hora para que no quedarme sola en el CIAD, por tu apoyo con mi experimental. Pero especialmente gracias por brindarme tan hermosa amistad, porque a pesar de todo siempre estás ahí.

A las mejores amigas que pude encontrar en la carrera, Gabriela Bustamante, por alegrarme todos los días y enseñarme el lado positivo de cada situación. Janeth Ramos, por tu amistad, horas de risas vagando por la unison y por siempre seguirme en rollo en mis locuras. Brenda Venancio gracias por tan bonita amistad, por todas esas palabras de aliento, por las largas charlas y comidas juntas. Muchas gracias a todas por su apoyo y por hacer más ameno el tiempo de estudio.

A mis padrinos Edna Navarro y Jesús Murrieta por estar presente en una de las etapas más difíciles para mí, por darme todo su amor y apoyo a cada momento, gracias por esas tardes de lectura y de platicas en el jardín que me dejaron mucho en el corazón.

A mi prima y ahijada Abril Ballesteros quien siempre ha sido como una hermanita para mi. A mis tíos Alejandra Dórame y Martin Ballesteros que siempre me han dado su completo apoyo.

A mi hermano Ángel Murrieta, aunque la mayoría del tiempo pareciera que estamos en una batalla, hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos. Gracias por estar cuando más te necesito.

A mi Fanny, que siempre me acompañó en las veladas de trabajo y sabía como alegrarme para hacerlas más amenas.

A mis padres por su apoyo, consejos y amor. Por ser los principales promotores de mis sueños, por creer en mí. Gracias a mi ma' por siempre estar pendiente y dispuesta a acompañarme en algunas veladas, por tu atención y comprensión durante todo el tiempo de trabajo, por todo tu amor. Gracias pa' por siempre anhelar lo mejor para mi vida, por cada consejo que me has brindado para ser cada día mejor.

A la persona que siempre está a mi lado, Luis Carlos Méndez, gracias por estar incondicionalmente para mí, por no dejarme derrumbar en los momentos más difíciles, por siempre recordarme quien soy y hacia dónde voy. Gracias por siempre acompañarme en mis experimentales de fin de semana, por ayudarme siempre a lo largo de todo este trabajo, las palabras de aliento, los cafés eternos de desahogo y por siempre estar también en mis triunfos, te adoro infinitamente.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, que por ellos soy lo que soy.

A mis padres, Rosa Dórame y José Murrieta quienes me han dado todo para poder realizar mis estudios satisfactoriamente, así como también me han dado lo que soy como persona, mis valores, principios, perseverancia y el coraje para conseguir mis objetivos.

A mis abuelos, Francisca, José, Angelita y Miguel quienes han sido de gran importancia en mi vida y me han enseñado el valor de la familia y el amor.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo General: .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos Particulares: .....</b>	<b>14</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>Bacterias Halófilas .....</b>	<b>17</b>
<b>Mecanismos de Adaptación .....</b>	<b>18</b>
<b>Generalidades De Las Enzimas .....</b>	<b>20</b>
<b>Clasificación de las Enzimas .....</b>	<b>21</b>
<b>Proteasas .....</b>	<b>22</b>
<b>Enzimas Provenientes de Bacterias Halófilas y su Aplicación Industrial. ....</b>	<b>24</b>
<b>Curtido de Pieles de Ganado .....</b>	<b>25</b>
.....	<b>27</b>
<b>Figura 4. Camas de salado en el proceso de curtiduría de pieles de ganado.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>Morfología .....</b>	<b>29</b>
<b>Tinción Gram .....</b>	<b>30</b>
<b>Actividad Proteolítica en Placa.....</b>	<b>30</b>
<b>Concentración de NaCl Óptima para el Desarrollo de las Cepas.....</b>	<b>31</b>
<b>Actividad Proteolítica por Método Espectrofotométrico (Tsuchida,1986).....</b>	<b>32</b>
<b>Medición de Proteína por Método de Bradford.....</b>	<b>32</b>
<b>Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica. ....</b>	<b>33</b>
<b>Efecto del pH.....</b>	<b>33</b>
<b>Efecto de la Temperatura.....</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>34</b>
.....	<b>37</b>
.....	<b>37</b>

<b>Actividad Proteolítica en Placa.....</b>	<b>38</b>
<b>Determinación Cuantitativa de la Actividad Proteolítica .....</b>	<b>43</b>
<b>Efecto del pH y la Temperatura en la Actividad Proteolítica. ....</b>	<b>45</b>
<b>Efecto de la Temperatura .....</b>	<b>45</b>
<b>Efecto del pH.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas	15
2. Clasificación de las enzimas según la reacción catalizada.	20
3. Identificación de las cepas aisladas de camas de salado por 16S rRNA.	34
4. Morfología macroscópica de las cepas aisladas de camas de salado.	35
5. Tinción Gram y morfología microscópica de capas aisladas de camas de salado.	35
6. Actividad proteolítica y actividad específica de las cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles.	43
7. Temperatura óptima en la actividad proteolítica presentada por las cepas aisladas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado.	46
8. pH óptimo en la actividad proteolítica presentada por las cepas aisladas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado .	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Diagrama de la conformación de una enzima.	19
2. Rompimiento de enlaces con endopeptidasas y exopeptidasas.	22
3. Proceso de salado en camas para conservación de pieles de curtiduría.	26
4. Camas de salado en el proceso de curtiduría de pieles de ganado.	26
5. Procesos típicos de curtido y acabado del cuero.	27
6. Morfología macroscópica colonial.	29
7. Tinción Gram de la cepa <i>R. ornithinolytica</i> .	36
8. Tinción Gram de la cepa <i>E. xiangfangensis</i> .	36
9. Actividad proteolítica en placa de <i>A. baumannii</i> en agar con leche descremada al 2%.	38
10. Actividad proteolítica en placa de <i>E. fergusonii</i> en agar con leche descremada al 2%.	39
11. Actividad proteolítica en placa de <i>R. ornithinolytica</i> sembrado en agar con leche descremada al 2%.	39
12. Actividad proteolítica en placa de <i>E. xiangfangensis</i> sembrado en agar con leche descremada al 2%.	40
13. Actividad proteolítica en placa de <i>P. agglomerans</i> sembrada en agar con leche descremada al 2%.	40
14. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas de camas de salado con una concentración de 2.5% de NaCl.	42
15. Actividad específica a diversas condiciones de temperatura en cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles de ganado.	45
16. Actividad específica a diversas condiciones de pH en cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles de ganado.	47

## RESUMEN

Las enzimas juegan un papel muy importante a nivel industrial, ya que son necesarias para los procesos de elaboración de diversos productos en diferentes ámbitos como lo son la Industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, entre otras. Las enzimas son las que tienen una mayor relevancia para dichas industrias son las proteasas, ya que representan más del 60% de la demanda total de enzimas.

La utilización de las enzimas se lleva a cabo en varios procesos industriales y en muchas ocasiones en condiciones adversas de temperatura, pH y presión, por lo que es necesario la utilización de enzimas con capacidades funcionales a tales condiciones. Una de las fuentes utilizadas para la obtención de estas enzimas, son los microorganismos extremófilos, pues se conoce que las enzimas provenientes de éstos, tienen la capacidad de ser funcionales a más de una condición adversa.

Se midió la capacidad proteolítica de cinco cepas extraídas de mesas de salado de curtiduría presentes en el Rancho JC en Hermosillo, Sonora. Las cepas aisladas fueron identificadas por 16S como: *Acinetobacter baumannii* (42), *Escherichia fergusonii* (44), *Raoultella ornithinolytica* (46L), *Enterobacter xianfangensis* (46P) y *Pantoea agglomerans* (49).

Primeramente, se evaluó la capacidad proteolítica por método de placa utilizando un medio de cultivo con leche descremada al 2%, en donde se pudo observar un halo de hidrólisis en las cepas con esta actividad enzimática. Posteriormente la presencia de la actividad proteolítica se evaluó de forma cuantitativa por método espectrofotométrico (Tsuchida 1986), así como el efecto de la temperatura y el pH en la misma.

Se logró obtener la presencia de actividad proteolítica en las 5 cepas aisladas con una concentración del 2.5% de NaCl sin embargo, la cepa *E. fergusonii* (44) fue la que presentó una mayor actividad en condiciones estándar de 37°C y pH 7. Mientras que cuando se evaluó el efecto del pH desde 5 hasta 10 y el efecto de diferentes temperaturas las cuales van desde 25 hasta 60°C, mostró la mayor actividad.

Estos resultados, nos indican que las cepas aisladas principalmente *A. baumannii* y *E. fergusonii* son de interés industrial ya que su función catalítica es activa aún en condiciones consideradas como extremas.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos conocidos por sus capacidades infecciosas; sin embargo, existe una gran cantidad de características que representan un beneficio de las necesidades humanas, específicamente en el ámbito industrial, llegando indirectamente a la industria farmacéutica, cosmetología e incluso a la industria alimentaria.

Por otro lado, algunas bacterias presentan capacidades extremas: temperatura, presión, pH, o salinidad. Las bacterias halófilas, son capaces de resistir altas concentraciones de sal, e incluso puede ser un requerimiento para su óptimo desarrollo (Ramírez, 2004).

Kushner y Kamekura (1988) clasifican estos microorganismos según su requerimiento de NaCl para llevar a cabo sus funciones de una manera más eficaz. En esta clasificación encontramos primeramente a los halófilos ligeros, los cuales requieren de una concentración del 2-5% de NaCl; posteriormente se encuentran los halófilos moderados, que necesitan de un 5-20% de NaCl, y finalmente a los halófilos extremos, los cuales llevaran a cabo su óptimo desarrollo en concentraciones desde un 20% hasta un 30% de NaCl (DasSarma y col., 2001).

Las fuentes de aislamiento de estos organismos son muy variadas, ya que pueden estar en diversas zonas geográficas desde mares y lagos; hasta hábitats poco comunes como la salsa de soya, salmueras e incluso en fosas nasales de iguanas (DasSarma y col, 2001)

Estos microorganismos al igual que los no halófilos, son capaces de producir enzimas que pueden ser utilizadas en diversos procesos biotecnológicos. Una de las enzimas más importantes para el ámbito industrial por satisfacer casi el 60% de los requerimientos del mercado de enzimas son las proteasas (Alnahdi, 2012). Estas pueden ser obtenidas de diversas fuentes: hongos, plantas o bacterias; sin embargo, por facilidad de manipulación y rápido crecimiento, las generadas por estas últimas son las preferidas (Enache, 2010).

Además, las proteasas provenientes de microorganismos halófilos también cuentan con la capacidad de llevar a cabo su función catalítica en presencia de condiciones poco comunes de temperatura o incluso otros factores. De esta manera, ofrecen importantes oportunidades en aplicaciones biotecnológicas: como procesamiento de alimentos, biorremediación ambiental y procesos biosintéticos.

Esto es importante ya que muchos procesos industriales se llevan a cabo en condiciones físicas y químicas específicas que no siempre se pueden ajustar a los valores óptimos requeridos para la actividad de las enzimas disponibles. Es por esto que los microorganismos halófilos son la fuente más probable de tales enzimas, porque no sólo son enzimas tolerantes a la sal, si no que muchas también son termotolerantes.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo General:***

Determinar la actividad proteolítica de bacterias halófilas extraídas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado.

### ***Objetivos Particulares:***

- 1.- Definir la concentración de NaCl óptima para el desarrollo de cada una de las cepas aisladas.
- 2.- Confirmar la presencia de actividad proteolítica por el método de placa en cada una de las cepas aisladas.
- 4.- Medir la actividad proteolítica por método espectrofotométrico (Tsuchida,1986) para cada una de las cepas.
- 5.- Medir el efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de bacterias halófilas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Las bacterias son microorganismos ampliamente conocidos por sus capacidades infecciosas y aunque solo se conoce cerca del 1% de su diversidad, muchas de ellas pueden resultar benéficas para las necesidades humanas, ya que estos microorganismos pueden ser utilizados con fines biotecnológicos, agrícolas, biomédicos, ecológicos y de biorremediación. Un ejemplo de esto, son las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas por diferentes mecanismos como lo es la fijación biológica de nitrógeno, el aumento de la disponibilidad de nutrientes en al rizósfera, entre otros. También existen microorganismos con la capacidad de degradar compuestos tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente (Morales García y col., 2010). Otro claro ejemplo de la utilización de bacterias en la industria es en la producción de celulosa la cual a su vez es materia prima para la generación de material de construcción, fibras textiles, papel, cosméticos y algunos medicamentos (Pacheco y col., 2004).

Por otro lado, se ha reportado que algunas bacterias pueden estar presentes en ambientes extremos. Un ambiente extremo puede presentar altas concentraciones, de sal, altas presiones, pH extremos (ácidos o básicos), e incluso estos ambientes pueden tener la combinación de más de una condición. Las bacterias que han sido aisladas de ambientes extremos han sido de interés en muchas áreas y han proporcionado herramientas incluso para poder determinar el origen de la vida en el planeta. Existen diversos reportes donde se menciona que los microorganismos extremos poseen la capacidad de síntesis de metabolitos y enzimas que pueden tener acción catalítica en condiciones extremas (Delgado García y col., 2012). Los microorganismos extremos se clasifican con base en el ambiente en los que se desarrollan, entre ellos se encuentran los termófilos, alcalófilos, acidófilos, psicrófilos, metalófilos, piezófilos y halófilos (Oliart Ros y col., 2016)

De acuerdo con Oliart Ros y col., 2016, los microorganismos termófilos son aquellos que presentan una temperatura óptima de crecimiento mayor a 45°C, dentro de estos se encuentran los hipertermófilos quienes tienen un crecimiento óptimo a temperaturas mayores de 80°C; psicrófilos aquellos que tienen una temperatura óptima de crecimiento por debajo de los 10°C; acidófilos son los que se desarrollarán de forma óptima a pH menor a 5 y alcalófilos en pH mayor a 8; halófilos son los microorganismos que se desarrollan en medios hipersalinos (de 5% a 30% de sal); osmófilos viven a altas presiones osmóticas; radiófilos

resisten altos niveles de radiación; metalófilos son capaces de tolerar altas concentraciones de metales pesados; piezófilos antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas (van den Burg, 2003).

<b>Tipo</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Aplicación</b>
<b>Termófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Lipasas, esterasas</li> <li>• Glucosilhidrolasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes, hidrólisis en alimentos, panificación, bebidas.</li> <li>• Modificación de grasas y lácteos, detergentes, curtido de pieles.</li> <li>• Procesamiento de almidón, celulosas y textiles.</li> </ul>
<b>Psicrófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Amilasas</li> <li>• Deshidrogenasas</li> <li>• Lipasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes, industria de alimentos.</li> <li>• Detergentes y panificación</li> <li>• Biosensores</li> <li>• Alimentos y cosméticos</li> </ul>
<b>Halófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Deshidrogenasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de péptidos, hidrólisis en alimentos, detergentes.</li> <li>• Biocatálisis en disolventes orgánicos.</li> </ul>
<b>Alcalófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas, celulasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes e industria alimentaria.</li> </ul>
<b>Acidófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amilasas</li> <li>• Proteasas y celulasas</li> <li>• Oxidasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamientos del almidón</li> <li>• Componentes de alimentos</li> <li>• Desulfuración del carbono</li> </ul>



## **Bacterias Halófilas**

Durante los estudios de la microbiología se han encontrado muchas capacidades de adaptación en los microorganismos y específicamente de las bacterias. Uno de estos mecanismos de adaptación es la resistencia a la sal (NaCl) para llevar a cabo funciones fundamentales, por lo que los microorganismos con estas características reciben el nombre de halotolerantes y halófilos respectivamente. Y aunque los halotolerantes se desarrollan de una forma óptima y mejor en ausencia de sal, estos son capaces de admitir cierta concentración en su medio ambiente (Meseguer, 2004). En contraste con los halófilos, para llevar a cabo un desarrollo óptimo se ven en la necesidad de un medio ambiente salino (Kerker, 2004).

El estudio de estos microorganismos comenzó hace cerca de un siglo, sin embargo, el conocimiento con mayor impacto se ha obtenido desde hace alrededor de 25 años. Hoy en día sabemos que existe una gran diversidad de estos, pero solo un pequeño porcentaje es el que ha sido y sigue siendo estudiado actualmente (Meseguer, 2004).

Los halófilos son caracterizados según el requerimiento de sal para su crecimiento, por lo que en 1988 Kushner y Kamekura los clasificaron en halófilos ligeros, los cuales requieren de una concentración del 2-5% de NaCl; halófilos moderados, los cuales necesitan de un 5-20% de NaCl, y finalmente a los halófilos extremos, los cuales llevarán a cabo su óptimo desarrollo en concentraciones desde un 20% hasta un 30% de NaCl (DasSarma y col., 2001).

Las fuentes de aislamiento de estas bacterias pueden ser muy diversas, ya que se pueden encontrar en muchas zonas geográficas de forma natural como lo es en los mares y lagos, o incluso en lugares poco comunes y salmueras creadas por el hombre como conservadores, siendo la salsa de soya un claro ejemplo de estos (DasSarma, 2001).

El descubrimiento de microorganismos provenientes de ambientes extremos como lo es la alta salinidad, ha despertado el interés de su estudio, sobre todo desde el punto de vista biotecnológico ya que sus biomoléculas suelen ser resistentes a las condiciones agresivas de su entorno, lo que permite estudiarlos en la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales (Ramírez, 2006), lo que le da un mayor interés a las cepas que se utilizaron en este trabajo, ya que fueron aisladas de un entorno con condiciones extremas de NaCl.

## Mecanismos de Adaptación

Existen diferentes tipos de mecanismos que las bacterias utilizan para adaptarse al medio en el que habitan. En el caso de las halófilas y las halotolerantes tienen que resistir la gran presión osmótica ejercida por el medio altamente salino en el que se desarrollan. Siendo esto posible gracias a que las membranas biológicas son permeables al agua, permitiendo crear un equilibrio osmótico con el ambiente que les rodea (Oren, 2002).

Se utilizan diversas estrategias por los diferentes grupos de microorganismos para lograr mantener una alta presión osmótica en el citoplasma y una baja concentración de  $\text{Na}^+$  (Oren, 2002). La principal estrategia para adaptarse al estrés osmótico se basa en la compensación de la presión osmótica del exterior por medio de una acumulación de compuestos en el citoplasma, los cuales pueden ser iónicos o no iónicos dependiendo del microorganismo, dando lugar a dos mecanismos principales de acumulación.

El primero de estos mecanismos es conocido como “salt-in” el cual se encuentra mayormente en Arqueas y en Haloanaerobiales, los cuales acumulan en el citoplasma iones inorgánicos, principalmente  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  provocando el aumento de la concentración de KCl en el citoplasma, lo que conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de los componentes celulares (Ramírez, 2006). Los cálculos bioenergéticos demuestran que este mecanismo de adaptación consume poca energía, sin embargo, las altas concentraciones de KCl en el citoplasma requieren grandes adaptaciones de todas las proteínas para que sea posible que todos los sistemas enzimáticos sean activos en estas condiciones (Oren, 2002).

El segundo mecanismo se basa en la acumulación de solutos compatibles, los cuales son de bajo peso molecular como aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína, esto en presencia de estrés osmótico, siendo un proceso más flexible y que permite el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, este mecanismo es llamado “salt-out”. Estos solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis (Ramírez, 2006).

## Ambientes Hipersalinos

Los ambientes hipersalinos son poco comunes y generalmente se encuentran de forma natural en zonas calientes y secas (Ramírez, 2006). Estos ambientes como su nombre lo indica, constan de una concentración salina tal que restringe las formas de vida que se desarrollan en el mismo, sin embargo, son considerados los ambientes más antiguos sobre el planeta, ya que se cree que en la tierra primitiva se generaron una gran cantidad de estos ambientes durante el establecimiento del ciclo del agua y de las mareas (Gerdes, 2010).

A la fecha, se conocen algunos suelos salinos naturales, estos varían sus composiciones en sodio, cloro, sulfatos y pH; y según la zona geográfica donde se encuentren. Entre estos ambientes podemos encontrar el Mar muerto, en donde se sabe además que existe una gran concentración de  $Mg^{+2}$  (González, 2002), y el gran lago salado de Utah.

En México también se conoce la existencia de ambientes hipersalinos, incluso se sabe de la presencia de tapetes microbianos. Dichos tapetes se encuentran a lo largo de la costa, cerca de la laguna San Ignacio en Baja California Sur, donde se forman planicies de inundación donde al evaporarse el agua crecen microorganismos de coloración rojiza (Cadena Rodríguez, 2014). En este mismo estado también se encuentra la segunda salinera más grande de todo el mundo, la cual está conformada por 13 estanques interconectados que concentran el agua de mar proveniente de la laguna Ojo de Liebre, esta salinera es conocida como Exportadora de Sal S.A. de C.V. (Marais, 2003).

Por otro lado, existen ambientes mucho menos comunes, entre los que se encuentran tanto especies marinas como plantas y animales desérticos. Así como también ambientes generados por el hombre, como lo son la salsa de soya y las salmueras, en donde también se ha encontrado la presencia de microorganismos halófilos (DasSarma, 2001).

Entre los ambientes producidos por el hombre, se encuentran las camas de salado de curtiduría de pieles, estas camas son utilizadas para la conservación de las mismas dentro de este proceso. A pesar de que es un ambiente prometedor por las altas concentraciones de NaCl, éste ambiente a sido poco explorado, lo que nos permite encontrar una nueva fuente de microorganismos halotolerantes o incluso halófilos.

## Generalidades De Las Enzimas

Las enzimas son proteínas que cuentan con la función de acelerar reacciones químicas en los sistemas biológicos actuando como catalizadores. Un catalizador, aumenta la velocidad de una reacción química sin sufrir modificaciones durante el proceso. Es decir, la enzima puede unirse de forma covalente a la molécula que se encuentra en transformación durante el proceso de la reacción, sin embargo, al final de la misma, el producto se libera y la enzima vuelve a su forma original (Devlin, 2004)

Las enzimas son sumamente específicas, tanto en las sustancias con las que interactúa como en las reacciones que catalizan. La sustancia sobre las que interactúa la enzima es conocida generalmente como sustrato. Se deduce que incluso los productos de las enzimas son muy específicos ya que en una reacción catalizada por enzimas ninguno de los sustratos se desvía a reacciones secundarias no productivas, es decir no se forman subproductos derrochadores (Grisham, 2013)

En algunas ocasiones, las enzimas cuentan con baja actividad catalítica cuando carecen de la presencia de un componente no proteico, conocido como cofactor (molécula orgánica / ion metálico), cuando esto sucede, el componente proteico inactivo de la enzima se llama apoenzima. Sin embargo, cuando cuentan con la presencia del cofactor son conocidas como holoenzimas, las cuales son totalmente funcionales. (Palmer T., 2008)

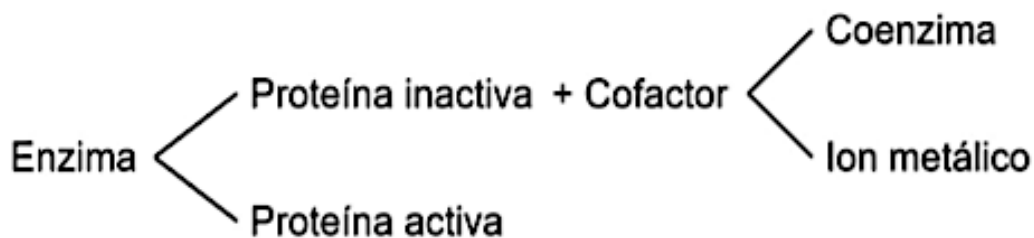


Figura 1. Diagrama de la conformación de una enzima (Palmer T., 2008).

## Clasificación de las Enzimas

Para nombrar a las enzimas se puede utilizar el nombre tradicional, que suele obtenerse añadiendo el sufijo “asa” al nombre del sustrato o al tipo de reacción que cataliza. Sin embargo, el problema de esta nomenclatura es que muchas enzimas no dan la información necesaria para conocer donde actúan químicamente.

La enzyme commission de la international union of biochemistry and molecular biology (IUBMB) clasifica a las enzimas para evitar ambigüedades e imprecisiones. Según este sistema las enzimas pueden clasificarse en 6 principales clases, cada una con diferentes subclases según la reacción que catalicen como se muestra en la Tabla 1 (Feduchi Canosa, 2011).

Tabla 2. Clasificación de las enzimas según la reacción catalizada (Feduchi Canosa, 2011)

CLASE	SUBCLASE
<b>1. Oxidorreductasas</b>	Deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, peroxidasas, catalasa, oxigenasas, hidroxilasas.
<b>2. Transferasas</b>	Transaldolasas y transcetolasas, fosforiltransferasas, quinasas, fosfomutasas.
<b>3. Hidrolasas</b>	Esterasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiasas, fosfolipasas, amidasas, desaminasas, ribonucleasas.
<b>4. Liasas</b>	Descarboxilasas, aldolasas, hidratasas, deshidratasas, sintasas, liasas.
<b>5. Isomerasas</b>	Racemasas, epimerasas, isomerasas, mutasas.
<b>6. Ligasas</b>	Sintetasas, carboxilasas.

## Proteasas

Las proteasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas, y tienen la capacidad romper las proteínas en péptidos o incluso en aminoácidos.

El grupo de proteasas es muy grande y complejo, por lo que muchas de estas se diferencian en su especificidad, sitio activo, mecanismo catalítico entre otras propiedades. Su especificidad depende de la conformación de aminoácidos y de otros grupos funcionales, así como del enlace que se va a hidrolizar (Pandey, 2006).

Estas enzimas pueden separarse en dos grupos; el primero de ellos son las exopeptidasas, que tienen la capacidad de romper los enlaces N-terminal y C-terminal, mientras que en el segundo tenemos a las endopeptidasas, las cuales actúan sobre los enlaces peptídicos intermedios; Además, juegan un papel importante a nivel industrial. Cabe destacar que son las endopeptidasas quienes cuentan con un mayor valor en este ámbito (Pandey, 2006).

Existen diferentes fuentes para la obtención de estas enzimas ya que son de naturaleza generalizada, sin embargo, en el ámbito industrial se prefiere la obtención de estas por medio de bacterias, ya que son de rápido crecimiento, fácil manipulación genética y requieren un espacio limitado para su cultivo (Alnahdi, 2012).

Otra clasificación que se les puede asignar a las proteasas es en base al pH en el que son activas, dando lugar a 3 tipos, las proteasas que actúan a pH ácido, las que funcionan a pH neutro y finalmente las de acción en pH alcalino. Sin embargo la clasificación comúnmente utilizada es la de las endopeptidasas y exopeptidasas que se mencionó anteriormente (Chavez Galindo, 2014).

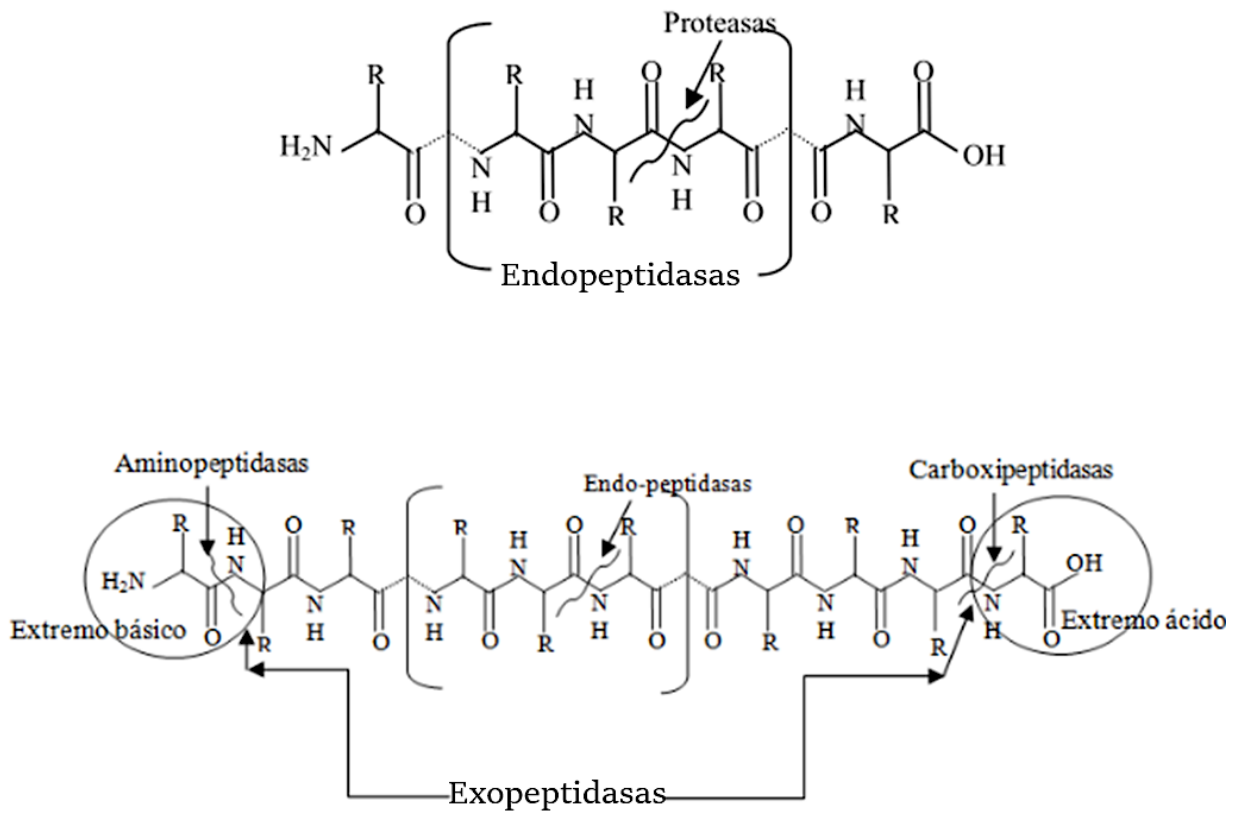


Figura 2. Reacción de endopeptidasas y exopeptidasas

## **Enzimas Provenientes de Bacterias Halófilas y su Aplicación Industrial.**

Las enzimas son proteínas muy especializadas que tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas, ayudando a promover la transformación de diversas moléculas en productos específicos, además de contribuir a la reducción en el volumen de desechos generados por estos procesos, convirtiendo así a estos biocatalizadores en elementos casi indispensables en diversos sectores industriales (Rodríguez María, 2014).

La utilización de las enzimas comienza hace varios siglos en industrias cerveceras, panificadoras y lácteas, sin embargo, no es hasta principios del siglo XX que se establece su mecanismo de acción, por lo que es indiscutible el interés que se ha generado en las últimas décadas por el uso de estos catalizadores en los procesos industriales. Por ello, a partir de los años ochenta se comenzaron a desarrollar nuevas técnicas que nos permitieran la producción y comercialización de las enzimas a gran escala, descubriendo así nuevas fuentes de dichos catalizadores como lo son los animales, vegetales y los microbios.

Actualmente los desarrollos en áreas de proteómica y genómica nos han permitido la manipulación de las proteínas, por lo que hoy en día es posible manipular, diseñar y mejorar las actividades enzimáticas nuevas y tradicionales (Rodríguez María, 2014)

El mercado de las enzimas tiene una gran relevancia en la industria, y se conoce que las enzimas mayormente utilizadas, son las proteasas, las cuales constituyen cerca del 60% del comercio internacional de enzimas, ya que estas tienen un amplio rango de usos comerciales en detergentes, cuero, alimentos e industrias farmacéuticas. Una de las características más importantes que determinan la idoneidad industrial de estas proteasas es su requerimiento de un pH alto para una óptima actividad enzimática (Alnahdi, 2012).

Se conoce que en el 2013 las enzimas con importancia industrial generaron 4.8 billones de dólares, y además, se estima que para el 2021 las mismas generarán cerca de 21.1 billones de dólares lo que les da una gran importancia a nivel mundial (Mokashe y col., 2018).



## **Curtido de Pieles de Ganado**

Durante miles de años se han utilizado las pieles y cueros fabricados a partir de pellejos curtidos de animales para confeccionar diferentes prendas; como zapatos, chalecos, abrigos, guantes etc. Prendas que aun en la actualidad siguen siendo muy utilizadas por la sociedad.

El proceso de la producción de pieles puede dividirse en tres fases principales:

- Preparación del cuero para el curtido
- Curtido
- Acabado

La primera etapa de este proceso es la preparación del cuero para el curtido, como estos se deterioran fácilmente es necesario una buena conservación y desinfección antes de su expedición a la curtiduría. Para esto, primeramente, se extraen del armazón y se conservan mediante diferentes métodos de cura como lo puede ser el curado mediante secado, el cual se utiliza en regiones secas y calurosas. Este consiste en colocar las pieles estiradas ya sea en bastidores o en el suelo bajo la acción del calor del sol. Otro método de cura es la de secado con sal, en la cual se colocan las pieles sobre mesas y el lado de la carne es frotada con sal (Figura 3 y Figura 4).

Por otra parte, en los países más desarrollados, también se utilizan las salmueras, proceso que consiste en sumergir los cueros en una solución de cloruro sódico, posteriormente los cueros son tratados con DDT, cloruro de zinc, clorofenoles u otros agentes para su correcta desinfección.

Luego del preparado se continúa con el proceso de ribera, que es un conjunto de operaciones que se realizan para preparar los cueros antes de que se lleve a cabo el curtido. En este proceso los cueros se cortan y se lavan en tinas con desinfectantes. Seguidamente se sumergen en una lechada de cal para así poder desprender la epidermis y las raíces del pelo por labrado. Estas operaciones se encuentran seguidas por la descalcificación y maceración con sales estabilizadoras como sulfato de amonio, además de enzimas proteolíticas que neutralizan la alta alcalinidad de los cueros encalados.

Después de esto, en el piquelado los cueros se ponen en un ambiente ácido formado por cloruro de sodio y ácido sulfúrico para que los curtientes de cromo sean solubles y así poder pasar a la segunda etapa del proceso de curtiduría.

La segunda etapa de todo este proceso es la de curtido y pueden emplearse varias sustancias para curtir, sin embargo, los principales tipos de curtido son el vegetal y al cromo. El primero de estos suele realizarse en tambores giratorios con altas concentraciones de taninos. Por otro lado, el proceso de curtido al cromo se emplea frecuentemente en un solo baño, donde los cueros se tratan en una solución coloidal de sulfato de cromo (III) hasta completar el curtido y después neutralizarse (Figura 5).

Finalmente, después del curtido el cuero es procesado para darle forma y acondicionarlo con recurtido, coloreado y engrase en baño. En esta etapa la mayoría de los cueros son sometidos a coloreado, a excepción de los destinados para suelas de zapatos (Michael McCann, n.d.)

En el 2011, Habib y colaboradores reportan proteasas extracelulares provenientes de bacterias del género *Halobacterium* y *Actinobacillus*, aisladas de los efluentes de curtidos de pieles, en Bangladesh. Este artículo describe el aislamiento de ocho cepas productoras de proteasas las cuales se seleccionaron por medio de la prueba cualitativa en agar con leche descremada así como con la prueba cuantitativa por el método de Yang y Huang, el cual es un método muy similar al de Tsuchida.

Sin embargo, hasta la fecha no se conocen trabajos previos en donde se realice este tipo de investigación a partir de las camas de salado de curtiduría de pieles, por lo que considerando las características de éste ambiente en particular, podría ser de interés para la obtención de enzimas.



Figura 3. Proceso de salado de pieles en mesas para su conservación.



Figura 4. Camas de salado en el proceso de curtiduría de pieles de ganado.

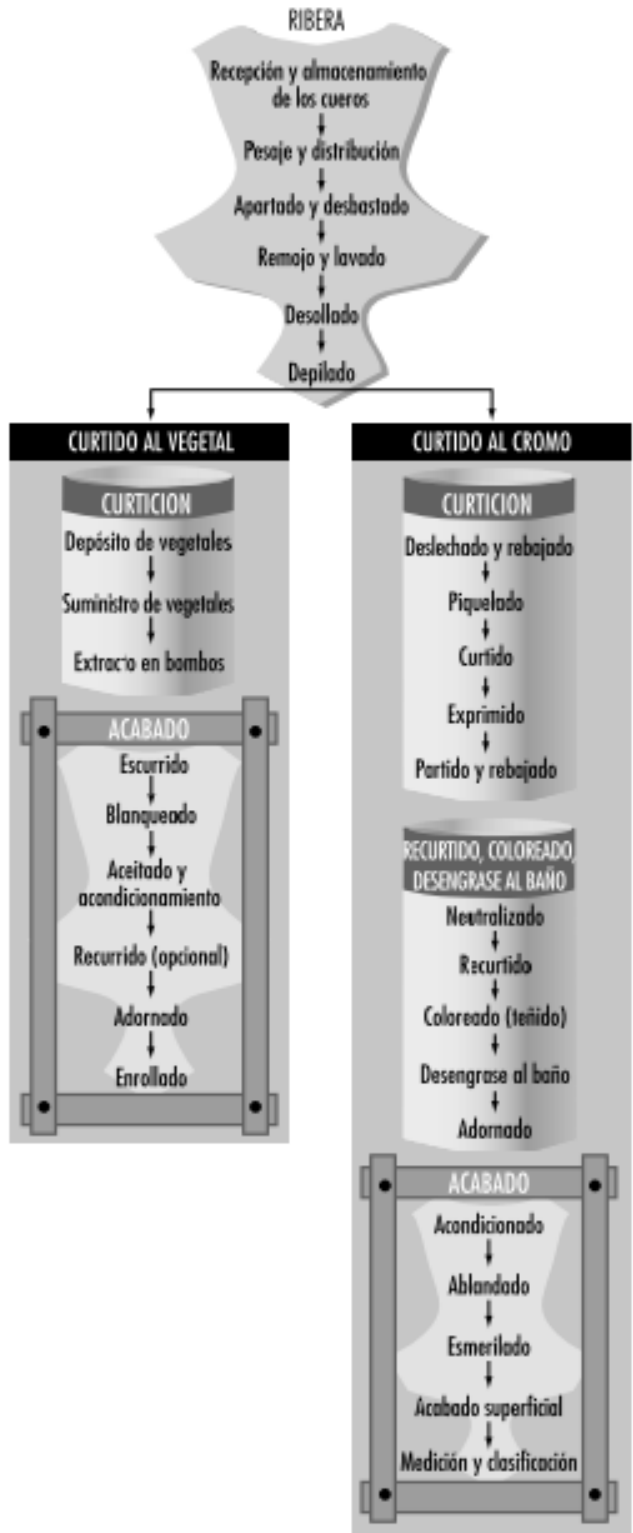


Figura 5. Procesos típicos de curtido y acabado del cuero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.), se aislaron cepas bacterianas de ambientes vacunos, entre ellos las mesas de salado de curtiduría de pieles del Rancho JC en Hermosillo, Sonora.

Primeramente, a estas cepas se les asignó una numeración local, solamente para su identificación dentro del laboratorio, la cual se manejó durante la mayoría del experimental.

Después se llevó a cabo la identificación oficial gracias al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ A.C.).

Entre estas cepas se obtuvieron:

**42** *Acinetobacter baumannii*

**44** *Escherichia fergusonii*

**46 L** *Raoultella ornithinolytica*

**46 P** *Enterobacter xianfangensis*

**49** *Pantoea agglomerans*.

### **Morfología**

Se evaluó la forma, elevación y el margen de las colonias bacterianas de las cepas aisladas, las cuales se inocularon en placas con agar nutritivo. Las características fueron evaluadas según la Figura 6 de morfología macroscópica descrita por Prescott y col. ( 2011).

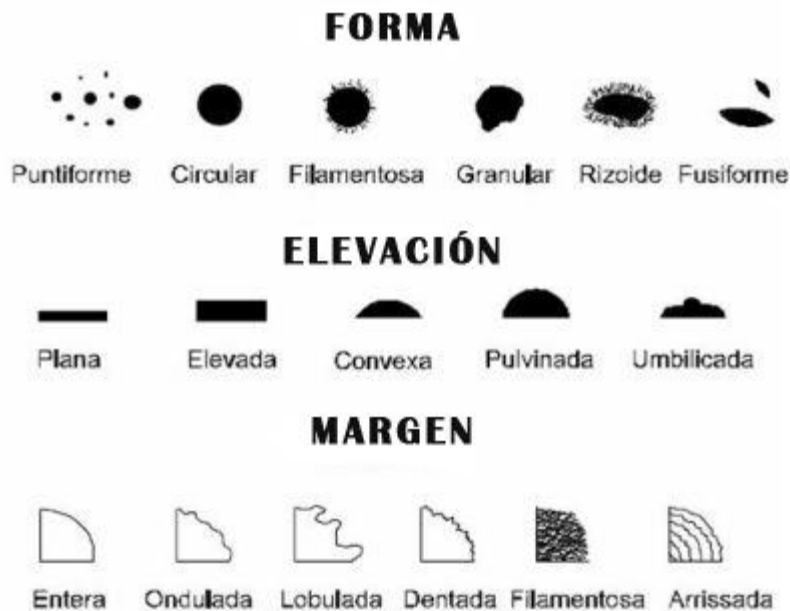


Figura 6. Morfología macroscópica colonial (Prescott y col., 2011).

### Tinción Gram

Se realizó un análisis microscópico por medio de tinción Gram, metodología descrita en Bailey & Scott, 2014.

### Actividad Proteolítica en Placa.

Previo a la determinación de actividad proteolítica en placa, se preparó un preinoculo de la siguiente manera: en una botella weathon de 50 mL, se prepararon 30 mL del caldo TSB (Difco). El medio se esterilizó a 121°C durante 20 min. Posteriormente en microtubos de 2 mL se agregó 1 mL del medio estéril y por asada se incubo la cepa correspondiente. Los microtubos inoculados se incubaron durante 48 horas a 37°C.

La preparación del medio para actividad proteolítica en placa se preparó a partir de un medio base reportada por Mateos y col (2012). En un matraz Erlenmeyer de 500 mL , se prepararon mL del medio base con la siguiente composición (%): peptona de caseína 0.3, agar base 1.5, extracto de levadura 0.3. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. El medio se enfrió y al matraz con el medio base se agregaron 250 mL de leche descremada pasteurizada, el matraz se agitó y se realizó el vaciado en placa. Una vez solidificado el medio de cultivo, se realizaron pozos de 1 cm de diámetro. En el centro de la perforación se depositaron 100 µL del preinóculo (previamente descrito) con cada una de las cepas.

Las placas se incubaron a 37 °C. La observación y medición del halo se realizó cada 24 h durante 72 horas.

### **Concentración de NaCl Óptima para el Desarrollo de las Cepas.**

Se realizaron cinéticas de crecimiento para evaluar el desarrollo óptimo a diferentes concentraciones de NaCl. En matraces Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 30 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el caldo proteolítico (Patel, 2005), cuya composición es la siguiente (g/L): Glucosa 5, Peptona de caseína 7.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, NaCl 2.5, 5,10 %. El medio se esterilizo a 121°C durante 20 min.

Los matraces se inocularon por asada y se incubaron a 37°C y 120 rpm. Al momento de la inoculación (tiempo 0) y cada 4 horas por 24 y 36 h fueron tomadas muestras de 1ml y se les leyó la absorbancia a 600nm en una celda de vidrio de 1ml utilizando un espectrofotómetro Jenway 7315. La toma de muestra concluyó en el momento en que la densidad óptica decreció. estas absorbancias fueron graficadas para construir la curva de crecimiento de cada una de las cepas.

### **Actividad Proteolítica por Método Espectrofotométrico (Tsuchida,1986).**

Una vez identificada de manera cualitativa la presencia de proteasas en las cepas bacterianas, se realizó la determinación de manera cuantitativa por triplicado a partir del método Tsuchida (1986), donde se utilizó como sustrato caseína al 1% (Tsuchida y col., 1986).

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 30 mL de medio de cultivo, se esterilizó y después se inoculó por medio de asada. Posteriormente se incubó a 37°C y 120 rpm por 48 h. El medio de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5417R y se obtuvieron dos fases. Se recuperó la fase acuosa que se denominó extracto crudo enzimático y la fase sólida o pellet que se desechó.

Después se tomaron 200µL del extracto crudo enzimático y se agregaron 500µL de caseína al 1% en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.-Esta reacción se incubó durante 20 minutos a una temperatura de 37°C , en un baño de agua.

Pasado este tiempo, se detuvo la reacción con 1 mL de ácido tricloroacético al 10%, se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5417R. Se obtuvo el sobrenadante y finalmente se leyó la absorbancia a 280 nm en una celda de cuarzo de 1mL, en un espectrofotómetro Jenway 7315. La absorbancia producto de la reacción enzimática se interpoló en una curva estándar de tirosina de 1mg/mL.

### **Medición de Proteína por Método de Bradford.**

A los extractos crudos enzimáticos se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Se colocaron en tubos de vidrio 200µL de extracto crudo y 1 mL de reactivo de Bradford, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Posteriormente se leyó la absorbancia en celdas de vidrio de 1mL a 595 nm utilizando un espectrofotómetro Jenway 7315

Las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva estándar de ovoalbúmina en una concentración de 0.09 mg/mL para poder obtener la cantidad de enzima en el extracto.



## **Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica.**

### ***Efecto del pH***

Para realizar la evaluación del efecto del pH sobre la reacción, se preparó la caseína al 1% en diferentes buffers, que se enlistan a continuación:

- pH 5. Buffer de Citratos 50 mM
- pH 6 y 7. Buffer de Fosfatos 50 mM:
- pH 8. Buffer Trizma 50 mM
- pH 9 y 10. Buffer de Glicina 50 mM

Una vez solubilizada la caseína en los diferentes buffers, se llevó a cabo nuevamente la técnica de Tsuchida por triplicado utilizando como sustrato la caseína con el pH en evaluación.

### ***Efecto de la Temperatura***

Para la evaluación del efecto de la temperatura se llevó a cabo el método de Tsuchida con modificación solamente en la temperatura de incubación de la reacción enzimática.

En tubos de 2 mL se colocó por triplicado 200 $\mu$ L de extracto crudo y 500 $\mu$ L de caseína al 1%, pH7 preparada en buffer de fosfatos 50 mM, y se incubaron en un baño de agua a la temperatura evaluada en un rango de 25-60°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo agregando 1 mL de ácido tricloroacético al 10%, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga marca Eppendorf modelo 5417R. Se obtuvo el sobrenadante y finalmente se leyó la absorbancia a 280 nm en una celda de cuarzo de 1mL, en un espectrofotómetro Jenway 7315.

La absorbancia producto de la reacción enzimática se interpoló en una curva estándar de tirosina de 1mg/mL.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las cepas aisladas se identificaron por medio de la amplificación de la región 16S de los genes ribosómicos. Datos obtenidos gracias al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). En estos resultados (Tabla 2), se mostró la identificación de bacterias de cinco géneros distintos.

Se ha reportado el aislamiento de *Pantoea agglomerans* a partir de plantas, además se conoce que se encuentra entre los agentes de biocontrol más prometedores para el tratamiento de plagas bacterianas y fúngicas, sobre todo en el tratamiento de la niebla del peral y del manzano, que se cree que es una plaga autóctona de América del norte, aunque actualmente se ha propagado al norte y este de Europa así como a la región del Mediterráneo. (Rezzonico y col., 2009)

Estudios previos reportan el aislamiento de *Acinetobacter* en el medio ambiente, principalmente en suelos contaminados por combustibles y muestras provenientes de acuíferos. *Acinetobacter* desempeña un papel importante en la mejora de la eliminación biológica del fósforo en aguas residuales. También algunas especies como *A. baumannii* presentan la capacidad de degradación de hidrocarburos, lo cual es de gran interés para la biorremediación del suelo. (Vanbroekhoven y col., 2004)

Las especies de *Enterobacter* se localizan en muchos ambientes naturales que van desde suelos, plantas, agua e incluso en los tractos digestivos de mamíferos y aves. La mayoría son parte de la microflora normal; sin embargo, en las aves y en el ganado existen ciertas cepas que pueden ser patógenas y capaces de inducir enfermedades intractables o extraintestinales. (Maheux y col., 2014)

*Escherichia fergusonii* es la bacteria que se encuentra más estrechamente relacionada con *E. coli*. Esta se ha aislado de sangre humana, orina y heridas abiertas. También se ha aislado de varios animales como vaca, cerdo, caballo y pavo (Glover y col., 2017)

*Raoultella ornithinolytica* es un bacilo encapsulado el cual, anteriormente fue clasificado en el género *Klebsiella* por sus similitudes bioquímicas, incluso en sus mecanismos de patogenicidad, es productora de histamina y ha sido aislada de ambientes acuáticos, así como de insectos. (García-Lozano y col., 2013)

Como podemos ver en investigaciones anteriores se nos muestra que estas cepas pueden presentar un gran potencial industrial, sin embargo aun existen áreas de investigación

con para las mismas, ya que hasta la fecha es difícil encontrar incluso algunas de sus características básicas.

Tabla 2. Identificación de las cepas aisladas de camas de salado por 16S rRNA.

<u>Cepa</u>	<u>Cepa relacionada en</u> <u>NCBI</u>	<u>Número de acceso</u>	<u>Identidad</u> <u>(%)</u>
<b>42</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19978	NR_074737.1	99
<b>44</b>	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	NR_074902.1	99
<b>46 P</b>	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 1017	NR_126208.1	100
<b>46 L</b>	<i>Raoultella ornithinolytica</i> ATCC 31898	NR_114502.1	100
<b>49</b>	<i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236	NR_11998.1	99

### **Morfología macroscópica**

En la Tabla 3 podemos observar los resultados del crecimiento colonial en agar nutritivo de las 5 cepas utilizadas. Tortora y colaboradores nos menciona en el 2013 que las bacterias pueden ser catalogadas dependiendo de las características tanto microscópicas como macroscópicas.

Entre los resultados obtenidos, se puede ver que la mayoría de las cepas presentan colonias circulares y convexas, pero también encontramos puntiformes y planas, como en caso de *E. xiangfangensis*.

Tabla 4. Morfología macroscópica de las cepas aisladas de camas de salado.

<b>Cepa</b>	<b>Forma</b>	<b>Elevación</b>	<b>Margen</b>
<i>A.baumannii 42</i>	Circular	Convexa	Entera
<i>E. fergusonii 44</i>	Circular	Convexa	Entera
<i>R. ornithinolytica 46 L</i>	Circular	Convexa	Dentada
<i>E. xiangfangensis 46 P</i>	Puntiforme	Plana	Ondulada
<i>P. agglomerans 49</i>	Circular	Convexa	Entera

#### Tinción Gram y morfología microscópica

Al realizar la tinción de Gram pudimos ver que todas las cepas resultaron Gram negativo, como se muestra en la Tabla 4. También se pudo notar que no hubo mucha variación entre las morfologías microscópicas, ya que en las cinco cepas solamente se encontraron bacilos.

Tabla 5. Tinción Gram y morfología microscópica.

<b>Cepa</b>	<b>Morfología Microscópica</b>	<b>Tinción Gram</b>
<i>A.baumannii 42</i>	Cocobacilo	Negativo
<i>E. fergusonii 44</i>	Bacilo	Negativo
<i>R. ornithinolytica 46 L</i>	Bacilo corto	Negativo
<i>E. xiangfangensis 46 P</i>	Bacilo corto	Negativo
<i>P. agglomerans 49</i>	Bacilo	Negativo

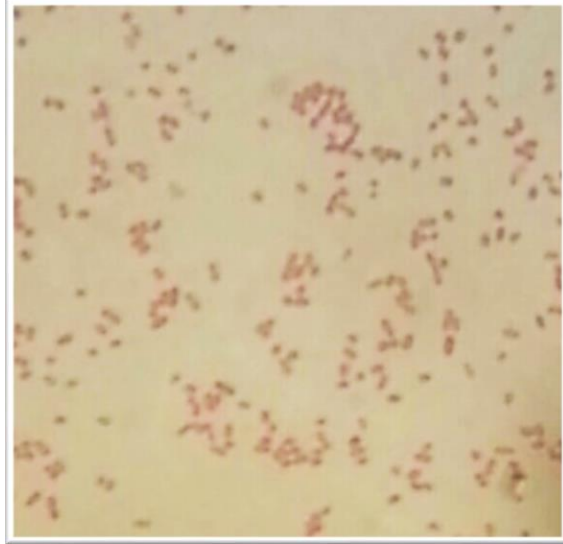


Figura 7. Tinción Gram de la cepa *R. ornithinolytica* 46 L.

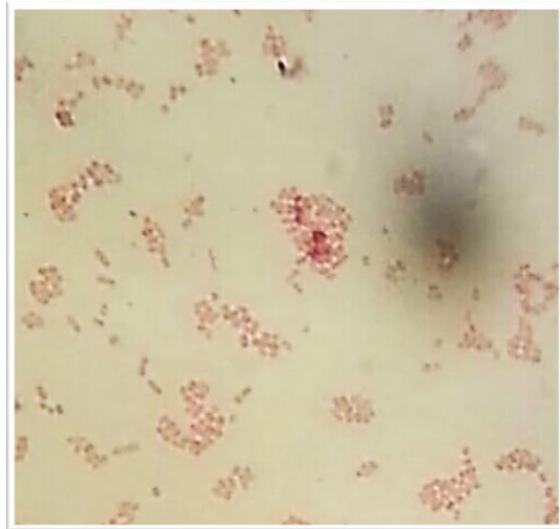


Figura 8. Tinción Gram de la cepa *E. xiangfangensis* 46 P.

### **Actividad Proteolítica en Placa.**

El crecimiento de la cepa *A. baumannii* 42 pudo observarse a partir de las 24 horas, presentó colonias muy pequeñas y ligeramente amarillentas, sin embargo, no presentó un halo de hidrólisis claro o concluyente aun pasadas las 72 horas, como se muestra en la Figura 6.

A pesar de los resultados no concluyentes de la cepa 42, se decidió realizarle las pruebas cuantitativas para la medición de la actividad proteolítica ya que alrededor de las colonias podía observarse un halo muy escaso y casi imperceptible, lo que nos hizo sospechar que si podía presentar actividad proteolítica.

En el caso de la cepa *E. fergusonii* 44, en la Figura 7 se puede notar que hubo crecimiento a las 24 horas, presentó colonias con un aspecto seco y de tamaño mediano, su crecimiento fue algo peculiar ya que encontramos colonias en toda la placa, no solamente alrededor del pozo, lo cual pudo ocurrir por la técnica de sembrado que se utilizó. Se pudo notar que las colonias desde las 24 horas presentaban un halo de hidrólisis el cual fue aumentando de tamaño con el paso del tiempo.

*R. ornithinolytica* presentó muy escaso crecimiento en diversos puntos de la placa, las colonias eran color crema, grandes, totalmente redondeadas. Aun después de 72 horas el numero de colonias era escaso. Fue difícil observar un halo de hidrólisis presente en esta cepa ya que este fue muy pequeño y poco claro por lo que al igual que la cepa 42, se consideró no concluyente pero aun así se optó por realizar las pruebas cuantitativas para la actividad enzimática (Figura 8).

*E. xiangfangensis* presento un crecimiento muy acelerado, como se puede observar en la Figura 9, a las 24 horas sus colonias ya eran de gran tamaño, de color beige con un aspecto seco y de forma irregular. Como se muestra en la imagen, a las 24 horas las colonias se acompañaban de un halo de hidrólisis amplio y claro, el cual aumentó en conjunto con las colonias bacterianas llegando a medir 1cm de ancho a las 72h. Se consideró como la cepa que presentó mejores resultados en la prueba cualitativa para actividad proteolítica.

*P. agglomerans* presento un crecimiento muy lento, incluso sus colonias apenas pudieron notarse después de 48 horas, las cuales eran sumamente pequeñas y puntiformes, sin embargo a pesar del tamaño de las colonias y el tiempo que le tomó en crecer, si presento un halo de hidrólisis, aunque este fue bastante pequeño.

La técnica cualitativa de actividad enzimática en placa, que es una técnica rápida y muy utilizada, que nos permite discriminar cepas bacterianas, tal y como Gupta y colaboradores (2005) cuando realizaron un aislamiento de cepas bacterianas extraídas del medio ambiente a las que se les evaluó la capacidad de producir proteasas utilizando el agar descremado donde se reportó que *Streptomyces* sp. CD3 fue el máximo productor de proteasas entre las cepas que fueron aisladas (Alnahdi, 2012).

Al igual que en artículo de Alnahdi 2012, se le realizó esta prueba a las cepas aisladas de las camas de salado, esto con la finalidad de hacer una selección entre las mejores cepas productoras de enzimas proteolíticas, sin embargo, se notó que, al tener baja actividad en algunas de las cepas, el halo de hidrólisis no era muy notorio, e incluso en algunas este no mostraba resultados concluyentes, por lo que se decidió continuar con el estudio de estas cepas a partir de una técnica cuantitativa, con caseína como sustrato.

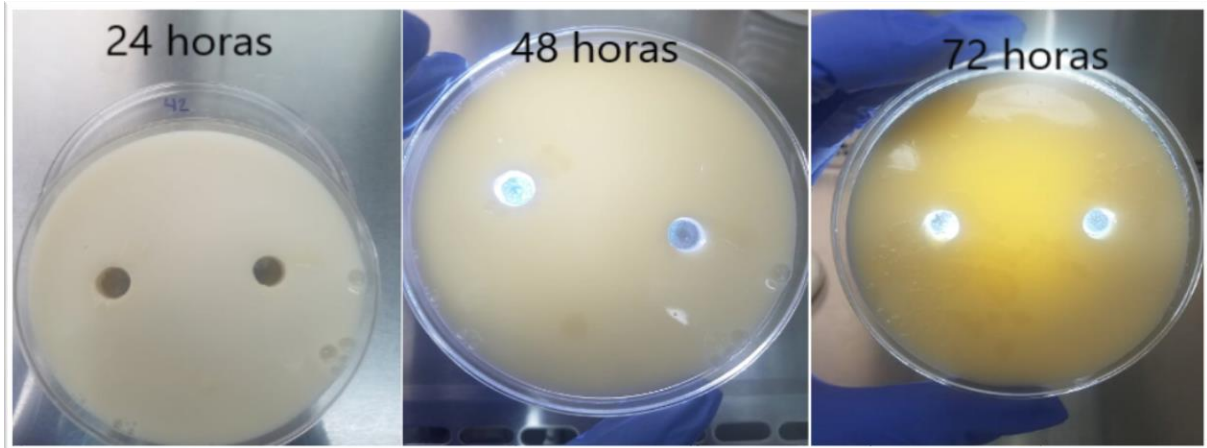


Figura 9. Actividad proteolítica en placa de en *A. baumannii* sembrada en agar con leche descremada al 2%.

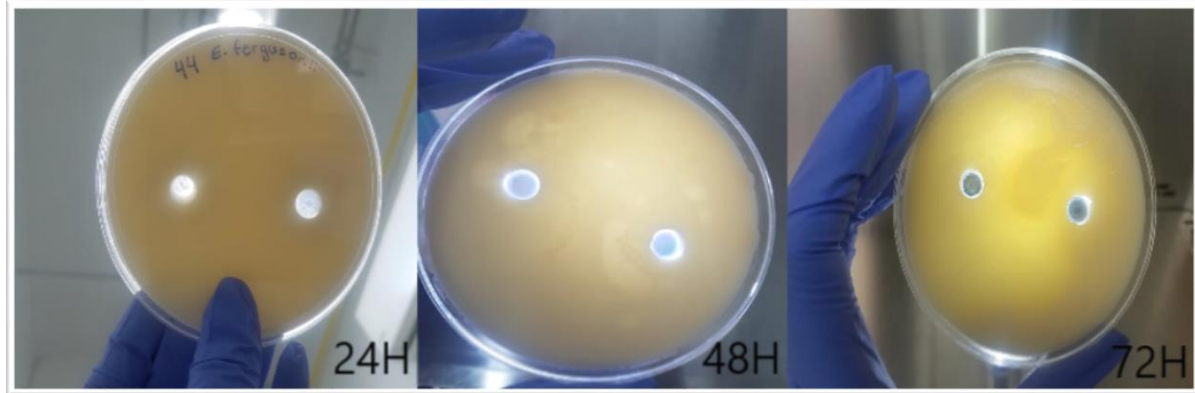


Figura 10. Actividad proteolítica en placa de *E. fergusonii* sembrada en agar con leche descremada 2%

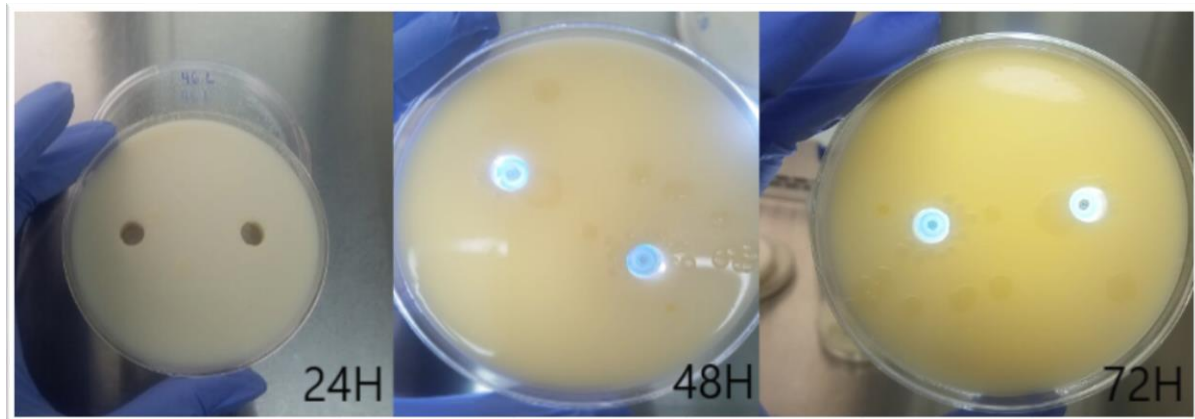


Figura 11. Actividad proteolítica en placa de *R. ornithinolytica* sembrada en agar con leche descremada al 2%.



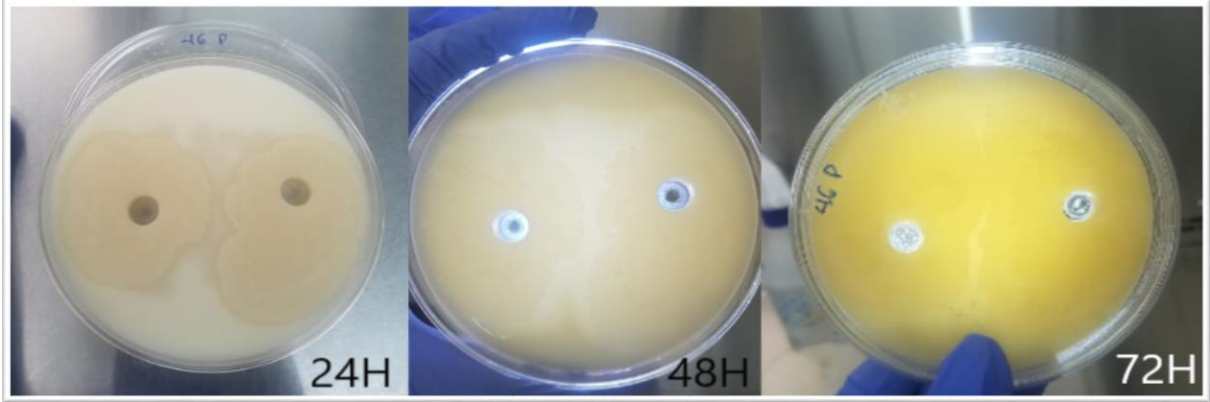


Figura 12. Actividad proteolítica en placa de *E. xiangfangensis* sembrada en agar con leche descremada al 2%

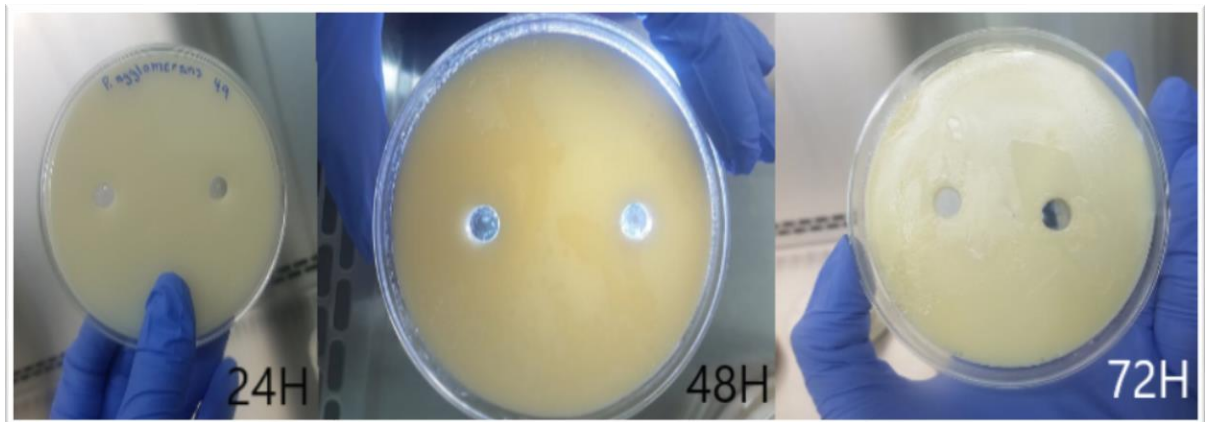


Figura 13. Actividad proteolítica en placa de *P. agglomerans* sembrada en agar con leche descremada al 2%

## Concentración de NaCl Óptima para el Desarrollo de las Cepas.

Las cinéticas se realizaron a concentraciones de 2.5, 5 y 10% de NaCl, sin embargo, al momento de realizarse las medidas de turbidez por densidad óptica, pudimos observar que en los matraces con concentración mayor al 2.5% de NaCl, no se presentó crecimiento alguno.

Como se puede observar en la figura , *R. ornithinolytica* y *E. xiangfangensis* fueron las cepas que obtuvieron un mayor crecimiento, sin embargo, al principio éste fue más lento que en las otras cepas.

Por otra parte, *A. baumannii*, *P.agglomerans* y *E. fergusonii* fueron presentaron un menor crecimiento pero su fase estacionaria se encuentra mucho más prolongada que en el caso de *R. ornithinolytica* y *E. xiangfangensis*.

Podemos ver que todas las cepas presentaron un comportamiento favorable en a una concentración de 2.5% de NaCl, por lo que pudieran considerarse como halófilas ligeras, sin embargo, anteriormente no se han reportado datos sobre la tolerancia de sal en estas cepas, a excepción de *Pantoea agglomerans* de la cual existe un reporte donde Hong Joo y colaboradores, en el 2006 hacen una evaluación del crecimiento de esta cepa a diversas concentraciones de NaCl y reportan su crecimiento incluso en concentraciones del 5% en donde la bacteria ya no se reproduce y comienza a morir.

En 1999, Hernández Herrero y colaboradores en su estudio de diversas bacterias halotolerantes aisladas de anchoas saladas reportan el crecimiento de *Enterobacter cloacae* a una concentración máxima de 0.5% de NaCl. También, Hrenovic e Ivankovic en el 2009 presentan datos en donde *Acinetobacter junii* y *Escherichia coli* toleran concentraciones de hasta 3.5 y 5% de NaCl respectivamente.

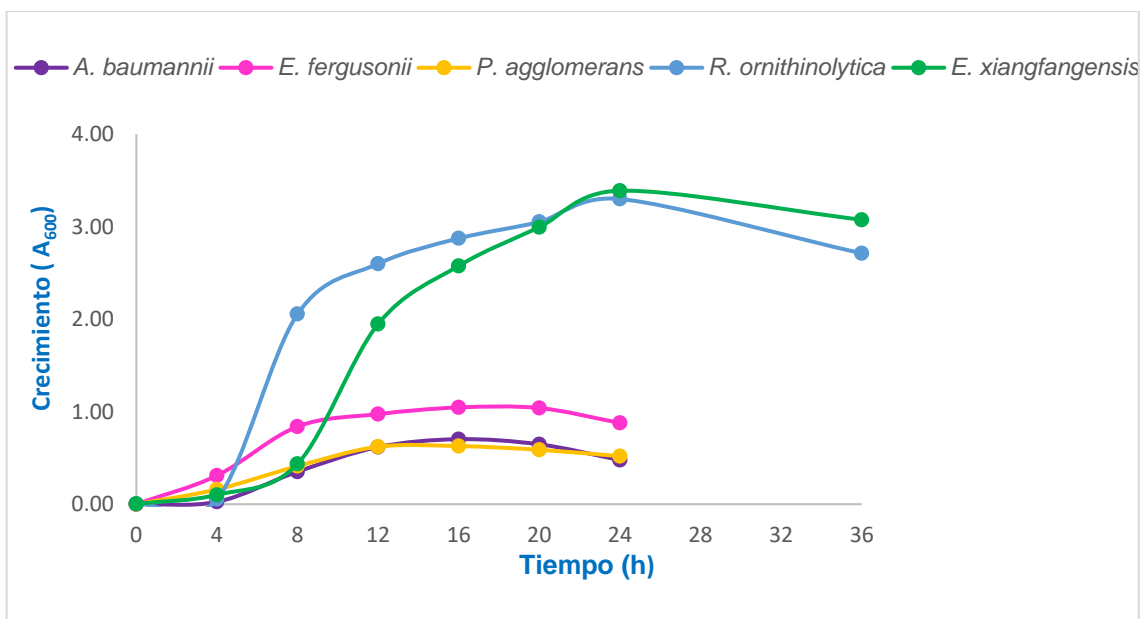


Figura 14. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas de camas de salado con una concentración de 2.5% de NaCl

### Determinación Cuantitativa de la Actividad Proteolítica.

En la Tabla 3 se puede observar la actividad proteolítica, así como la concentración de proteínas y la actividad específica que presentó cada una de las cepas aisladas de las camas de salado, estos resultados se presentaron a condiciones estándar, es decir, a 37°C y a pH de 7, como la marca la técnica Tsuchida.

Como se puede observar en la Tabla 3, todas las cepas aisladas de las camas de salado presentaron actividad proteolítica. *A. baumannii* 42 fue la que presentó la mayor actividad proteolítica de  $4.6 \times 10^{-4}$  U/ml, sin embargo podemos notar que a pesar de esto, cuenta con una alta cantidad de proteína 0.0108 mg/ml, lo que nos indica que la especificidad de la actividad enzimática es baja.

Por otra parte, tenemos a *E. fergusonii* 44, la cual presenta una actividad proteolítica muy similar a las demás de  $2.9 \times 10^{-4}$  U/ml, sin embargo su concentración de proteínas es mucho menor a la de las otras cepas, lo que nos dice que la especificidad de la actividad es mucho más alta, lo que la hace una cepa mucho más interesante, por lo menos a condiciones estándar.

Así también la cepa *P. agglomerans* presenta una alta especificidad en su actividad enzimática ya que cuenta con una Actividad proteolítica de  $2.7 \times 10^{-4}$  U/ml y una concentración de proteínas de 0.0025 mg/ml, mucho menor a las demás cepas a excepción de *E. fergusonii*.

En general, las cepas aisladas de las camas de salado de curtiduría mostraron baja actividad enzimática; no hay informes previos sobre el aislamiento de bacterias de esta área particular de la curtiduría, y pocos informes mencionan el aislamiento de los efluentes de la curtiduría. Habib y col. 2012 aislaron ocho cepas con actividad proteolítica alcalina termoestable, extracelular; entre ellos, *Halobacterium* sp. AF1 mostró una mayor actividad proteolítica (12,4 U/mL). Las diferencias entre sus resultados y los nuestros se pueden relacionar con la ubicación de aislamiento. Los efluentes de las curtiembres se han caracterizado como residuos sólidos proteináceos, mientras que las zonas de curtiduría saladas muestran altas concentraciones de sal.

Tabla 6. Actividad proteolítica y actividad específica de las cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles

<b>Cepa</b>	<b>Proteínas (mg/ml)</b>	<b>Actividad Proteolítica(U/ml)</b>	<b>Actividad específica (U/mg de proteína)</b>
<i>A.baumannii</i> 42	0.0108	$4.6 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$	0.0425
<i>E. fergusonii</i> 44	0.0020	$2.9 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-6}$	0.1459
<i>R. ornithinolytica</i> 46 L	0.0107	$2.4 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-6}$	0.0224
<i>E. xiangfangensis</i> 46 P	0.0318	$2.2 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.0070
<i>P. agglomerans</i> 49	0.0025	$2.7 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.1068

## Efecto del pH y la Temperatura en la Actividad Proteolítica.

### ***Efecto de la Temperatura***

Existe una temperatura óptima para cada enzima, cuando la temperatura rebasa o se encuentra por debajo de la óptima, la velocidad de la reacción enzimática se hace más lenta. En muchas enzimas se ha observado que cuando la temperatura se encuentra por encima de los 10°C la velocidad de reacción se duplica, y luego decae considerablemente cuando la temperatura rebasa los 60°C (De Lera Santín, 2011).

En la Figura 11 se nos muestra la actividad específica que presentó cada una de las cepas a diferentes condiciones de temperatura, en este caso se evaluó desde los 25°C hasta los 60°. Aquí podemos identificar el comportamiento de las cepas, el cual podemos notar que es muy variado.

*E. fergusonii* es la cepa que más destaca en esta grafica ya que presentó la mayor actividad enzimática. Como se puede ver, pareciera que cuenta con 2 temperaturas óptimas, sin embargo la actividad proteolítica a la temperatura de 60°C es mucho mayor que la de 35°C, lo que le da un gran interés a nivel industrial ya que esta es una temperatura óptima poco común en enzimas y como se mencionó anteriormente, algunos procesos industriales se llevan a cabo a altas temperaturas.

A diferencia de las condiciones estándar en la técnica, la cepa *A. baumannii* presentó datos mucho menores, pero podemos ver que tiene una temperatura óptima de 55°C lo cual le da un mayor interés.

En el caso de *P. agglomerans* cuenta con una actividad mayor a las demás cepas a excepción de *E. fergusonii* por lo que la hace también una cepa bastante interesante ya que cuenta con una temperatura óptima de 45°C.

Como podemos ver en la Tabla 3, *E. fergusonii* sigue siendo la cepa que presenta una mayor actividad proteolítica aun siendo expuesta a diferentes temperaturas. Al igual que en las condiciones estándar presenta una actividad específica mayor a la de las demás cepas, sin embargo al ser 60°C su actividad óptima, podemos notar que la actividad específica también aumentó ya que a condiciones estándar presentó 0.1459 U/mg de proteína y a 60°C incrementó a 0.1677 U/mg de proteína, a diferencia del caso de *P. agglomerans*, quien

presentó una temperatura óptima de 45°C en este experimento, tuvo una actividad específica de 0.0958 U/mg, mucho menor a la encontrada en condiciones estándar.

Según los datos obtenidos pudimos notar que para el caso de *A. baumannii*, *E. fergusonii* y *P. agglomerans*, el aumento de la temperatura favoreció a la actividad enzimática lo que coincide con (Lopez Flores, 2014) quien reporta proteasas activas a 45°C. Incluso las proteasas producidas por *E. fergusonii* pudieran considerarse termoactivas, según lo reportado por (Hernandez Martínez, 2006).

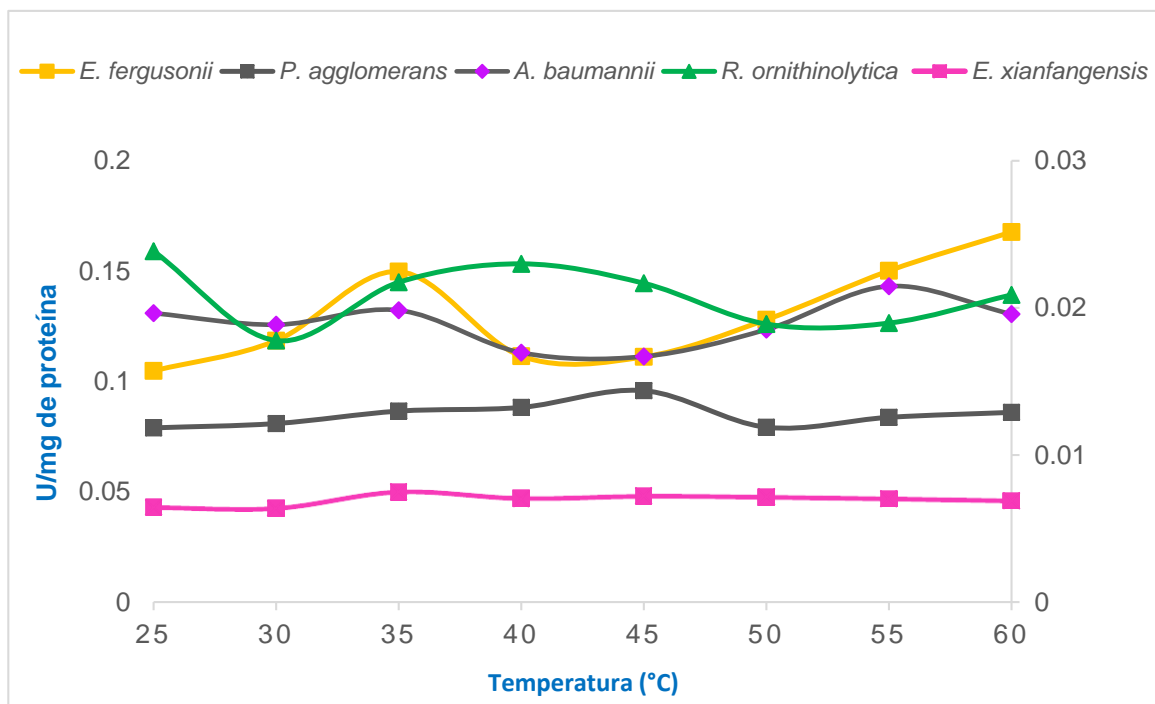


Figura 15. Actividad específica a diversas condiciones de temperatura en cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles de ganado

Tabla 7. Temperatura óptima en la actividad proteolítica presentada por las cepas aisladas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado.

Cepa	Temperatura Óptima °C	Concentración de Proteína (mg/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)	Actividad específica (U/mg de proteína)
<i>A. baumannii</i> 42	55	0.0108	$2.3 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	0.0215
<i>E. fergusonii</i> 44	60	0.0020	$3.9 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-6}$	0.1677
<i>R. ornithinolytica</i> 46L	25	0.0107	$2.6 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	0.0239
<i>E. xiangfangensis</i> 46P	35	0.0318	$2.4 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	0.0075
<i>P. agglomerans</i> 49	45	0.0025	$2.4 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-6}$	0.0958

### Efecto del pH

El pH, así como la temperatura, también es un regulador de la actividad enzimática. Cada enzima tiene un pH óptimo o un intervalo de pH, y cuando este varía, la conformación de la enzima se ve modificada llegando a no ser funcional, esto por el cambio en el estado de ionización de los grupos del sitio activo. Esto sucede ya que la conformación de una proteína depende de las atracciones y repulsiones que se presentan entre los aminoácidos cargados positiva o negativamente (De Lera Santín, 2011).

La Figura 14 nos muestra las actividades específicas presentadas por las cepas aisladas de las camas de salado, esto a condiciones diferentes de pH, desde 5 hasta 10.

Por otra parte, tenemos a *E. fergusonii* nuevamente, que, aunque esta vez no presentó la mayor actividad proteolítica, si obtuvo la mayor actividad específica que es un dato muy importante para este trabajo. El pH óptimo de esta cepa fue de 6, con la cual obtuvo una actividad proteolítica de  $2.7 \times 10^{-4}$  U/ml sin embargo como se puede observar en la Tabla 4,

presentó una actividad específica de 0.1326 U/mg de proteína, mucho mayor a la de las otras cepas.

*P. agglomerans* es la siguiente cepa con una mayor actividad específica de 0.0812 U/mg de proteína, incluso mayor a la de *A. baumannii*, sin embargo, en este experimento fue la que presentó una actividad proteolítica menor con  $2.0 \times 10^{-4}$  U/ml presentando un pH óptimo de 8.

En el caso de *A. baumannii*, podemos ver que el pH al que lleva a cabo su actividad enzimática es ácido, esto puede deberse a que las enzimas provenientes de microorganismos extremófilos pueden ser activas a más de una condición extrema (Delgado García y col., 2012). Esto pudiera ser posible por un constante contacto con ambientes tanto hipersalinos como ambientes ácidos, por lo tanto las enzimas pueden ser estables a estas condiciones. Se además, sabe que la mayoría de las proteasas cuentan con pH óptimos alcalinos (Alnahdi, 2012), por lo que no están frecuente encontrar microorganismos halófilos que puedan producir enzimas con pH óptimos ácidos o neutros.

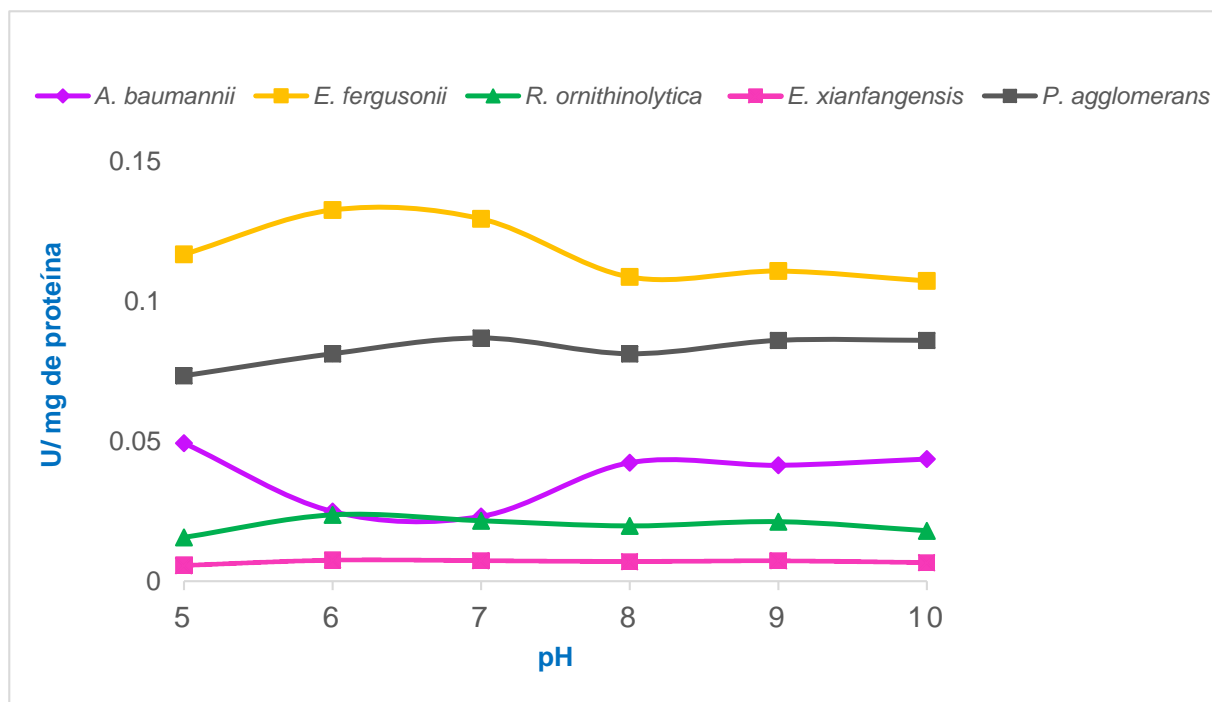


Figura 16. Actividad específica a diversas condiciones de pH en cepas aisladas de mesas de salado de curtiduría de pieles de ganado.



Tabla 8. pH óptimo en la actividad proteolítica presentada por las cepas aisladas de camas de salado de curtiduría de pieles de ganado.

Cepa	pH óptimo	Concentración de Proteína (mg/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)	Actividad específica (U/mg de proteína)
<i>A. baumannii</i> 42	5	0.0108	$5.3 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$	0.0493
<i>E. fergusonii</i> 44	6	0.0020	$2.7 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.1326
<i>R. ornithinolytica</i> 46L	6	0.0107	$2.5 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.0237
<i>E. xiangfangensis</i> 46P	6	0.0318	$2.4 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-6}$	0.0075
<i>P. agglomerans</i> 49	8	0.0025	$2.0 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-6}$	0.0812

## RESUMEN DE RESULTADOS

Las cepas extraídas de las mesas de salado de curtiduría de pieles de ganado del Rancho JC en Hermosillo Sonora presentaron un crecimiento sin problemas a una concentración máxima de 2.5% de NaCl, por lo que pudieran considerarse como bacterias halófilas, sin embargo, no se han reportado datos anteriores que lo confirmen. Esta respuesta a la sal era de esperarse ya que fueron extraídas de un ambiente considerado como extremófilo.

En la técnica para la evaluación de la actividad proteolítica por el método de agar con leche descremada al 2% no se obtuvieron los resultados esperados ya que algunas cepas presentaban resultados no concluyentes. Sin embargo, la cepa que arrojó mejores resultados fue *E. xianfangensis*, en la cual se pudo observar un crecimiento muy amplio y acelerado, así como un halo de hidrólisis bastante claro y con un grosor cerca de 1cm después de 72h.

A pesar de que los resultados del método de placa no fueron los mejores, se decidió realizar las pruebas de actividad proteolítica de forma cuantitativa a todas las cepas a lo que se esperaba que la cepa *E. xianfangensis* presentara altos resultados de actividad proteolítica, pero esto no fue así, lo que pudo explicar que presentara un gran halo de hidrólisis en el método de placa es que en las pruebas realizadas posteriormente se descubrió que tenía una gran cantidad de proteína lo que pudo general el halo de hidrólisis a pesar de que su actividad fuera poco específica.

Por otra parte, las pruebas de actividad cuantitativa revelaron que la cepa que comúnmente presenta mayor actividad proteolítica es *A. baumannii*, la cual obtuvo los mejores resultados en este aspecto a condiciones estándar y a diversas condiciones de pH obteniendo un óptimo de 6. A pesar de esto no se considera la cepa más interesante ya que, aunque presenta la mayor actividad proteolítica, pudimos ver en los diversos experimentos, que la cepa con una mayor actividad específica es *E. fergusonii*, la cual en todos los caso presentó los mejores resultados, lo cual la hace muy interesante ya que presenta mayor actividad proteolítica con cantidades mucho menores de proteína, incluso exponiéndola a diferentes condiciones de temperatura y pH.

## CONCLUSIÓN

Las bacterias aisladas de las camas de salado de curtiduría de pieles de ganado en el rancho JC presentaron actividad proteolítica extracelular.

*E. fergusonii* pudiera considerarse como una nueva fuente de proteasas ya que su acción catalítica se lleva a cabo de forma óptima a una temperatura de 60°C. Lo cual puede ser prometedor para las industrias como la alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- A.R. Lopez-Flores, C. Luna-Urban, J. 2014. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 13(3), 765–778.
- A De Lera Santín. 2011. *Las enzimas; tesis doctoral*. Capítulo I. Las enzimas.
- Alnahdi, H. S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated bacillus sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 071–074.
- Cadena Rodríguez, S. 2014. ¿Sabías que existen ambientes hipersalinos? *Ciencia Y*, 49–53.
- CHAVEZ GALINDO, G. V. 2014. *Producción de la enzima proteasa en cultivo, en medio solido y líquido utilizando Rhizopus oryzae*. UAAAN, buenavista saltillo coah.
- DasSarma. 2001. Halophiles. In *eLS* (1–13). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., & Rodríguez-Herrera, R. 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Devlin, T. M. 2004. *Bioquímica : libro de texto con aplicaciones clínicas* (3rd ed.).
- Feduchi Canosa, E. 2011. *Bioquímica: Conceptos esenciales*. (Panamericana, ed.) (1ra ed.).
- García-Lozano, T., Pascual Plá, F. J., & Aznar Oroval, E. 2013. Raoultella ornithinolytica en infecciones de las vías urinarias. Estudio clínico y microbiológico de una serie de 4 pacientes con neoplasias. *Medicina Clinica*, 138–139.
- Gerdes, G. 2010. What are Microbial Mats? (3–25). Springer, Dordrecht.
- Glover, B., Wentzel, J., Jenkins, A., & Van Vuuren, M. 2017. The first report of Escherichia fergusonii isolated from non-human primates, in Africa. *One Health*, 3, 70–75.
- González. 2002. halófilos y Debaryomyces hansenii ( Levadura halófila ), 44.
- Grisham, C. M. 2013. *Biochemistry*. Brooks/Cole, Cengage Learning.

- Hernández-Herrero, M. M., Roig-Sagués, A. X., Rodríguez-Jerez, J. J., & Mora-Ventura, T. M. 1999. Halotolerant and Halophilic Histamine-Forming Bacteria Isolated during the Ripening of Salted Anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Journal of Food Protection*, 62(5), 509–514.
- Hernandez Martínez, R. 2006. *Producción y caracterización de un extracto proteolítico termoestable*.
- Hong Joo, S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97(2), 204–210.
- Hrenovic, J., & Ivankovic, T. 2009. Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride. *EurAsian Journal of Biosciences*, 144–151.
- Kerker, S. 2004. Ecology of Hypersaline Microorganisms, 37-46.
- Maheux, A. F., Boudreau, D. K., Bergeron, M. G., & Rodriguez, M. J. 2014. Characterization of *Escherichia fergusonii* and *Escherichia albertii* isolated from water. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 597–609.
- Marais, D. J. Des. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *The Biological Bulletin*, 204(2), 160–168.
- Meseguer, I. 2004. Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, VII(2), 13–17.
- Michael McCann. (n.d.). Cuero, pieles y calzado. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, (8).
- Morales-García, Y. E., Rodríguez-Andrade, O., De, J., & Zúñiga, T. 2010. *Isolation and screening of plant growth promoting bacteria for their application in forest species*, (5-9)
- Oliart Ros, R. M., Manresa Presas, Á., Sánchez-Otero, M. G., Oliart-Ros, R. M., Manresa-Presas, Á., & Sánchez-Otero, M. G. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*, 11(1), 79–90.

- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms : Environments , phylogeny , physiology , and applications, 56–63.
- Pacheco, C.-, Luis, J., Yee, M., Zentella, C., & Marván, E. 2004. Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. (5-14)
- Palmer T. 2008. *Enzymes : biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*.
- Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food - Grade Proteases : A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211–220.
- Patil, U., Mokashe, N., Shaha, J., Arthekar, S., & Jagatap, H. 2018. Ultrasound-assisted improvements in biocatalytic activity and production of organic-solvent stable protease from *Bacillus circulans* MTCC 7942. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 201–205.
- Ramírez, D. 2006. Extremophile microorganisms. Halophile actinomycetes in Mexico.
- Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E., & Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiology*, 9.
- Rodríguez María. 2014. *Revista digital universitaria: Enzimas aplicadas a procesos industriales*. Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM.
- Tsuchida, O., Yamagata, Y., Ishizuka, T., Arai, T., Yamada, J. I., Takeuchi, M., & Ichishima, E. 1986. An alkaline proteinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Current Microbiology*, 14(1), 7–12.
- van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218.
- Vanbroekhoven, K., Ryngaert, A., Wattiau, P., De Mot, R., & Springael, D. 2004. *Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(1), 37–50.