

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE *Bacillus spp* DEGRADADORA DE PLUMAS DE AVES DE CORRAL

Isolation and Characterization of a Poultry Feather-Degrading *Bacillus spp* Strain

Judith Piñero Bonilla¹, Luis Vidal² y Nereida Coello³

¹ Ingeniería de Alimentos, Núcleo Canoabo, Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez" Edo. Carabobo, Venezuela.

² Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina; Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³ Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. E-mail: mcoello@reacciun.ve

RESUMEN

Se inocularon muestras de suelo de una granja avícola en un medio de enriquecimiento conteniendo plumas como principal fuente de carbono y energía, con la finalidad de favorecer el desarrollo de microorganismos con capacidad queratinolítica. Aislamientos del medio de enriquecimiento en placas con agar nutritivo mostraron la presencia de diferentes tipos de colonias. Estas se inocularon en tubos con medio salino y plumas enteras y se incubaron a 40°C para escoger posteriormente las cepas degradadoras de plumas. Se seleccionó la cepa LPB-2, la cual produjo la mayor degradación en el menor tiempo (3 días). El microorganismo fue identificado como un bacilo Gram positivo (2,4 x 0,64 µm) del género *Bacillus* sp. Los cultivos de la cepa LPB-2 en Erlenmeyers de 500 mL conteniendo medio salino y plumas molidas (20 g/L), demostraron que la máxima degradación de plumas, medida como grupos amino libres (GAL), fue en el intervalo comprendido entre 35 y 40°C. La velocidad de crecimiento fue de 0,205 h⁻¹, alcanzando 1,6 g/L de biomasa en 24 horas a 40°C y 75 rpm. Bajo estas condiciones la capacidad proteolítica en los caldos de fermentación fue de 0,25 U/mL y se observó un patrón de secreción asociado al crecimiento bacteriano. La concentración de GAL y la magnitud de la digestión de las plumas siguieron una tendencia similar durante la fermentación, obteniéndose en 32 horas de incubación 22 mmol/L y 35% respectivamente. La cepa LPB-2 produjo trazas de los ácidos cítrico, glucónico, málico, propiónico, láctico y butírico.

Palabras clave: *Bacillus* queratinolítico, degradación de plumas, aislamiento, fermentación.

ABSTRACT

Sample soils from a poultry plant were inoculated in enrichment medium with feathers as the major source of carbon and energy with the purpose of favoring the development of microorganisms with keratinolytic capacity. Colonies grown in nutrient agar plates streaked from enrichment medium were inoculated in tubes with saline medium with whole feathers and incubated at 40°C in order to isolate feather degrading strains. We selected the strain LPB-2 which produced highest feather degradation (3 days). The microorganism was a Gram positive rod (2.4 x 0.64 µm) and was identified as *Bacillus* sp. Cultures of LPB-2 in 500 mL Erlenmeyer baffled flasks containing 20 g/L of feather medium showed optimum feather degradation, measured as free amino groups (GAL), in the range of 35-40°C. Growth rate was estimated in 0.205 h⁻¹ with a maximum biomass of 1.6 g/L in 24 hours at 40°C and 75 rpm. Under these conditions, proteolysis C activity in fermentation broths attained 0.28 U/mL, and it was associated to microbial growth. GAL concentration and the amount of feather digestion followed similar trends, obtaining in 32 hours of cultivation 22 mmol/L and 35% respectively. The strain produced traces of citric, gluconic, malic, lactic, propionic and butyric acids.

Key words: Keratinolytic *Bacillus*, feather-degrading, isolation and fermentation.

INTRODUCCIÓN

Las plumas representan un alto porcentaje de los desechos generados en las plantas beneficiadoras de aves de corral. En su mayoría, éstas son destinadas a la elaboración de harinas para ser utilizadas como suplemento de los alimentos concentrados para aves, debido al alto contenido proteico

(95% de peso seco), principalmente de queratina (88%). Sin embargo, los procesos tradicionales a los que son sometidos mediante cocción a altas presiones, no mejoran la digestibilidad de estas harinas ya que el alto contenido de enlaces disulfuro en la queratina la convierten en una proteína muy resistente a la degradación por las enzimas digestivas de las aves. Por otro lado, existe un desbalance de aminoácidos e incluso algunos de ellos son destruidos durante el proceso que combina los tratamientos térmicos con los químicos (ácidos o alcalinos) [4]. Se han planteado otras alternativas para el aprovechamiento de la plumas, mediante tratamientos fermentativos con microorganismos queratinolíticos capaces de degradarlas, mejorando así su digestibilidad [12, 13] y calidad nutricional debido a su enriquecimiento con proteína microbiana [1].

Dadas las tendencias actuales hacia la búsqueda de procesos biotecnológicos aplicables al tratamiento de los residuos agroindustriales y la existencia de un alto potencial microbiano en la naturaleza, capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos, se ha dirigido el objetivo de este trabajo al aislamiento y caracterización de bacterias capaces de degradar las plumas de aves de corral como fuente de carbono, nitrógeno y energía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de plumas

Se tomaron muestras de suelo de diferentes áreas de los galpones de cría de pollos de engorde y se inocularon en tubos de ensayo que contenían caldo nutritivo Difco® como medio de transporte. Después de 24 h de incubación, se sometieron a un proceso de pasteurización a 80°C durante 15 min a fin de seleccionar los microorganismos esporulados. Alícuotas de estos medios se utilizaron para inocular tubos contentivos de una pluma entera y el medio basal (MBS) salino descrito por Williams y Shih [11], el cual contiene por litro de agua: 0,5 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,3 g K₂HPO₄, 0,4 g KH₂PO₄, 0,1 g MgCl₂·6H₂O, y 0,1 g de extracto de levadura. A esta solución salina se ajustó el pH a 7,5 con KOH al 10%. Estos tubos se incubaron a 45°C por 72 h. Para el enriquecimiento de los microorganismos queratinolíticos y los ensayos cinéticos, se utilizó el MBS descrito y la presentación de las plumas varió dependiendo del tipo de ensayo a ser realizado (enteras o troceadas con tijeras). Los medios se esterilizaron por autoclave (15 min, 15 lbf/pulg² de presión y 120°C). Para la preparación de los medios se emplearon plumas blancas de pollo, lavadas con abundante agua corriente, esterilizadas en el autoclave (15 min), secadas en la estufa y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

Las sales NH₄Cl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂·6H₂O, utilizadas para la preparación de los medios se obtuvieron de la casa comercial Riedel-de-Haën y el extracto de levadura de la casa Difco®.

Durante el enriquecimiento con los microorganismos queratinolíticos, se utilizaron plumas enteras para visualizar el proceso de degradación. Para ello, se introdujeron las plumas en tubos que contenían 5 mL del medio ya descrito. En los medios precultivo y los ensayos cinéticos, se emplearon plumas troceadas con la finalidad de ofrecer un sustrato más homogéneo. En los precultivos se usó una concentración de 5 g/L de plumas troceadas y 20 g/L para los ensayos cinéticos.

La selección de los microorganismos se llevó a cabo en base a su capacidad degradadora de plumas en medios de cultivo conteniendo este sustrato como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En aquellos tubos donde se observó degradación de las plumas, se siguieron transfiriendo alícuotas a otros tubos con medio de plumas hasta lograr un enriquecimiento. Por último, se realizaron aislamientos en agar nutritivo Difco® y se seleccionaron siete colonias morfológicamente diferentes. Cada una de ellas fue inoculada en tubos que contenían MBS fresco con plumas enteras e incubadas a 40°C para evaluar su capacidad queratinolítica. Observaciones periódicas del estado de las plumas permitió conocer el grado de desintegración alcanzado y seleccionar la cepa que produjo la mayor degradación en el tiempo más corto. Al mismo tiempo, en estos ensayos se realizó un control, consistente en un tubo con MBS y pluma entera que no era inoculado.

Conservación de las cepas microbianas

La conservación de las cepas aisladas se realizó a 40°C en estrías (cuñas) de medio sólido compuesto por las sales del MBS suplementado con 20 g/L de agar Difco® y 20 g/L de harina de plumas, previamente inoculadas e incubadas a 40°C. La harina de plumas, obtenida mediante tratamiento físicoquímico, fue producida en la Planta Proagro de Protinal (Edo. Carabobo).

Propagación y cultivo de la cepa LPB-2

Para la propagación de la cepa LPB-2, a partir de las cepas preservadas en estrías a 4°C, se inoculó un medio precultivo en fiolas Erlenmeyer con 30 mL de medio de plumas troceadas (5 g/L) y se incubó a 40°C por 48 h en un agitador rotatorio climatizado LAB-LINE, con una velocidad de agitación de 75 rpm. En los ensayos de fermentación, este precultivo permitió estandarizar la cantidad de células iniciales en los cultivos al ser utilizadas en una proporción de 7% como inóculo inicial. Los ensayos de fermentación se realizaron en fiolas Erlenmeyer con baffles que contenían 40 mL de medio con plumas troceadas (20 g/L) y se incubaron a 40°C y 75 rpm por varios días.

En los ensayos cinéticos, los cultivos se realizaron durante 48 h con una concentración de plumas de 20 g/L y una agitación de 75 rpm, que mostraron ser las condiciones óptimas para lograr una mejor homogeneidad y baja viscosidad del medio. Los valores de temperatura ensayados correspon-

den a 30, 35, 40 y 45°C. Se realizó un control en cada condición probada, consistente en un medio no inoculado.

Se realizaron observaciones periódicas al microscopio de frotis teñidos con coloración de Gram y siembra en placas de Petri con agar nutritivo (Oxoid®) para verificar el estado de pureza de los cultivos en el curso de los experimentos.

Toma y tratamiento de las muestras

A partir de alícuotas de 2 mL de los caldos de fermentación se realizaron las estimaciones de biomasa producida, concentración de GAL, actividad caseinolítica y concentración de ácidos orgánicos. Para ello, la muestra extraída se filtró a través de un disco de papel Whatman N° 4 para retener restos de plumas no degradadas. Una fracción de 0,5 mL del filtrado se utilizó para determinar la biomasa producida y el remanente se centrifugó en tubos Eppendorf (12.000 rpm) durante 10 min. Una fracción del sobrenadante recuperado se empleó en forma inmediata para la determinación de la actividad caseinolítica y el resto se congeló a -20°C hasta ser analizado en su contenido de grupos amino libres y ácidos orgánicos. De igual modo, el volumen total de un Erlenmeyer contentivo de 40 mL de caldo de fermentación del microorganismo con plumas troceadas en MBS, se utilizó para la estimación del porcentaje de plumas digeridas.

Determinación de la biomasa microbiana

La evaluación del crecimiento microbiano no es fácil cuando se están utilizando sustratos complejos e insolubles como las plumas, ya que éstas se mantienen en suspensión en el caldo de fermentación afectando las estimaciones de la biomasa bacteriana. Es por esta razón, que en el presente trabajo se hizo necesario diseñar una metodología que permitiera eliminar la interferencia producida por el sustrato mediante la elaboración de una curva patrón en la que se relacionó la absorbancia de los medios de cultivo con el peso seco de las células bacterianas. Todo el contenido de un cultivo en Erlenmeyer con medio de plumas troceadas, se filtró a través de papel Whatman N° 4 y, con la suspensión celular obtenida, se prepararon diluciones seriadas de 30 mL en tubos con agua destilada. Una fracción de 25 mL de cada una de estas diluciones se colocó en tubos de propileno (prepresados) y se centrifugó a 6000 rpm por 20 min. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento celular se resuspendió con 25 mL de agua destilada (este procedimiento se repitió dos veces). Finalmente, los tubos con el pellet celular se colocaron a 100°C por 12 h y, transcurrido este tiempo, se dejaron a temperatura ambiente por 1 h antes de ser pesados nuevamente. Con los 5 mL restantes del filtrado, se determinó la densidad óptica a 600 nm. Estos valores se correlacionaron con la diferencia de peso obtenida en cada caso para construir la curva de calibración. Para la determinación de la biomasa en los caldos de fermentación, se siguió el procedimiento antes descrito y se realizaron diluciones de los filtrados de las muestras, para luego ser leídas a 600 nm contra un blanco de agua destilada. Mediante

la curva de calibración fue posible la conversión de las lecturas a peso seco y así, calcular la biomasa producida en el curso de la fermentación.

Determinación del porcentaje de plumas digeridas (PPD)

La evaluación del PPD se llevó a cabo mediante un método gravimétrico. Para tal fin, se filtraba todo el contenido de un Erlenmeyer con medio de plumas a través de un disco de papel Whatman N° 4 prepesado, de manera de retener las plumas no digeridas. Luego, el papel con el material retenido se secó a 100°C por 24 h y se dejó a temperatura ambiente por 2 h antes de pesarlo nuevamente. La diferencia de peso obtenida correspondía a la cantidad de plumas no digeridas en un tiempo cualquiera de la fermentación. La diferencia entre este valor y el obtenido experimentalmente en el tiempo cero de curso de una fermentación, permitió calcular en términos de porcentaje la cantidad de plumas digeridas (PPD).

Determinación de grupos amino libres (GAL)

La determinación de la capacidad de degradación de las plumas por la cepa LPB-2 se estimó cuantificando la concentración de GAL presente en el medio de fermentación mediante el método colorimétrico de ninhidrina 6.

Actividad caseinolítica

La actividad caseinolítica fue determinada por el método de Kunitz 2 modificado, basado en la determinación del incremento en absorbancia a 280 nm como consecuencia de la liberación de aminoácidos por la acción de proteasas sobre la caseína. Una unidad (U) de actividad caseinolítica se definió como la cantidad de enzima requerida que produjo un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm en 1 min.

Determinación de la producción de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos en el caldo de fermentación fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia WATERS 600, previa desproteínización y clarificación de los caldos de fermentación, empleando una columna SHODEX (RS PACK) K-811 y una fase móvil de ácido fosfórico 0,8% a una temperatura de 45°C.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de los microorganismos queratinolíticos

Durante el aislamiento en agar nutritivo, se seleccionaron siete colonias morfológicamente diferentes que tenían la capacidad de degradar las plumas, sin embargo, se eligió aquella que en medio líquido con plumas mostró mayor degradación de este sustrato en el menor tiempo posible, aislando una cepa bacteriana que degradó las plumas enteras en tres días de incubación la cual fue designada como LPB-2 e identi-

Cinética de degradación del sustrato: La FIG. 3 muestra que tanto la concentración de GAL como el PPD, siguen la misma tendencia en relación a la magnitud de la degradación de las plumas. La cepa LPB-2 logra en 32 h de incubación, una degradación del sustrato de 35% correspondiente a 22 mmol/L de GAL, tiempo a partir del cual disminuye la velocidad de degradación del sustrato y no se modifican significativamente los resultados.

Producción de ácidos orgánicos: La evaluación de la capacidad de producción de ácidos orgánicos como subproductos de la fermentación por la cepa LPB-2 a partir de la degradación de las plumas señala, que bajo las condiciones establecidas, esta cepa no produjo a las 36 h de cultivo, cantidades significativas de los ácidos cítrico, glucónico, málico, láctico, propiónico o butírico y, muy poco de ácido acético (0,05 g/L).

DISCUSIÓN

Al igual que en otras cepas bacterianas queratinolíticas aisladas, no se ha podido conocer con exactitud si las mismas provienen del tracto gastrointestinal de las aves que llegan al suelo con sus excrementos o son parte de la microflora edáfica de los sitios de cría de estos animales [12]. En cualquier caso, es evidente que estos microorganismos se han adaptado a utilizar como fuente de carbono y nitrógeno, elementos queratinolíticos, poco convencionales pero abundantes en muchas regiones. Ello brinda la oportunidad de explotar su potencial como alternativa para el aprovechamiento de dichos desechos queratinolíticos, subutilizados hasta ahora por su poco valor nutritivo.

Las observaciones realizadas por microscopía electrónica mostraron que la cepa aislada corresponde a un bacilo Gram positivo que mide $2,4 \times 0,64 \mu\text{m}$, formador de endosporas, cuyas colonias son blancas, grandes y con bordes difusos en agar nutritivo [9]. Por otro lado, las observaciones hechas al microscopio óptico indicaron la adsorción de células a la superficie de los restos de plumas, que puede interpretarse como una ventaja estratégica para concentrar la cantidad de enzimas secretadas en un sitio específico y lograr así un mejor aprovechamiento de la fuente de carbono soluble; tal como se ha sugerido para otros microorganismos que se adsorben sobre su sustrato [5].

En base a los resultados obtenidos, se determinó que la máxima velocidad específica de crecimiento de la cepa LPB-2 fue de $0,21 \text{ h}^{-1}$, alcanzada a las 24 h. En concordancia con lo anterior, se observó que la cinética de la actividad proteolítica muestra un patrón de secreción de estas enzimas, asociado al crecimiento celular, decayendo ambos después de 24 h de incubación. Resultados similares han sido reportados en otra cepa degradadora de plumas (*Kocuria rosea*) [10]. Cuando se correlacionan estos resultados con el porcentaje de plumas degradadas (PPD) y la concentración de GAL, se tiene que a

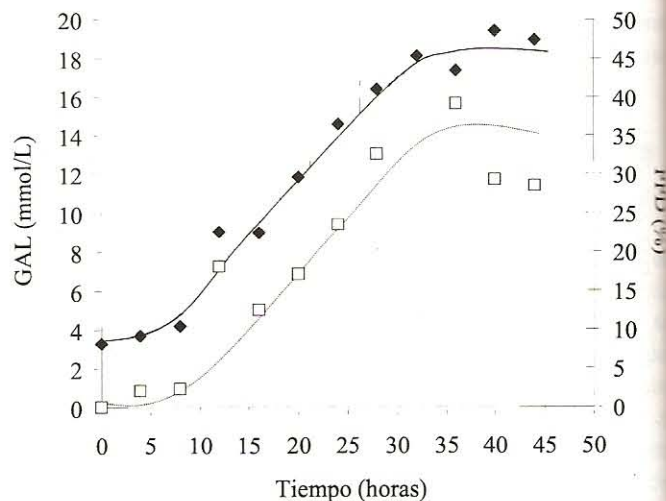


FIGURA 3. ESTIMACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LAS PLUMAS POR LA CEPA DE *Bacillus* LPB-2 MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GAL (◆) Y CANTIDAD DE PLUMAS DIGERIDAS EXPRESADAS EN PORCENTAJE (□) EN EL MEDIO DE CULTIVO.

las 24 h casi se ha degradado el 24% de las plumas obteniéndose aproximadamente 15 mmol/L de GAL, indicando este resultado que no existen problemas por agotamiento del sustrato. Sin embargo, la disminución de la biomasa bacteriana y la actividad enzimática puede ser atribuida a efectos inhibitorios por productos formados durante la fermentación o por cambios en el pH del medio. En cultivos de *Aspergillus fumigatus* en medio con harina de plumas se ha observado que la actividad proteolítica es afectada por el pH del medio [7]. Es posible que la inhibición esté acompañada por descensos en el pH del medio de fermentación que podría producir la inactivación de las enzimas excretadas por esta cepa. El rendimiento obtenido a las 36 h fue de 0,24 g de biomasa bacteriana/g de plumas degradadas.

Las actividades enzimáticas obtenidas pueden ser el resultado de una o varias proteasas presentes en el caldo de fermentación. La bibliografía reporta la presencia de varias proteasas en los caldos de fermentación de cultivos de cepas de *Trichophyton mentagrophytes* [8] y de cepas de *Scopulariopsis brevicaulis* [3] en medios de cultivo que incluían en su formulación sustratos de naturaleza queratinosa. La determinación del número de proteasas presentes en los caldos de fermentación, su purificación y caracterización bioquímica proporcionaría más información para profundizar en la fisiología de la cepa aislada y en el adecuado diseño de los procesos industriales conducentes a la obtención de proteasas (queratinasas).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La cepa de *Bacillus* spp LPB-2 aislada, exhibe características de especial interés para la degradación de materia queratinolítica como el que constituye a las plumas de aves de

corral. Las condiciones óptimas para determinar las cinéticas de crecimiento microbiano y degradación del sustrato fueron de 20 g/L de plumas, 75 rpm y 40°C. Bajo estas condiciones, se observó que la actividad proteolítica está asociada al crecimiento bacteriano, alcanzando el máximo valor a las 24 h (0,28 U/mL y 1,6 g/L respectivamente). La concentración de GAL y el PPD siguen la misma tendencia en la magnitud de la degradación de las plumas; la cepa LPB-2 degradó el 35% del sustrato en 32 h de incubación correspondiente a 22 mmol/L de GAL.

Los ensayos en fermentadores con alimentación por lotes ("Feed-batch") o continua permitirían dosificar la entrada del sustrato y la salida del hidrolizado y regular parámetros como el pH, controlando así, la inhibición de ciertos componentes del medio sobre la síntesis de proteasas o la reproducción bacteriana. Además, debe determinarse el valor nutricional de los hidrolizados obtenidos mediante el análisis de los perfiles aminoácidos y las pruebas de digestibilidad.

Su uso potencial, no sólo para la obtención de hidrolizados de mejor calidad nutritiva sino para el posible enriquecimiento proteico, se podrá demostrar mediante estudios posteriores, en los que se determine la composición de aminoácidos del hidrolizado proteico y su digestibilidad a través de ensayos con aves alimentadas con raciones que contienen este suplemento proteico.

Por otro lado, la posibilidad de utilizar este microorganismo como productor de queratinas abre nuevas alternativas para el tratamiento no sólo de las plumas sino de otros materiales queratinolíticos.

AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue financiado mediante fondos del Proyecto BTI-88 del Programa de Nuevas Tecnologías del BID-CONICIT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRION, D.; VIDAL, L.; PIÑERO, J.; COELLO, N. Optimización de la producción de proteína unicelular a partir de una bacteria degradadora de plumas. **XLVI Convención Anual de AsoVAC**. Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela, 17 al 22 de Noviembre. 20 pp. 1996.
- [2] KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **J. Gen. Physiol.** 30:291-310. 1947.
- [3] MALVIYA, H.K.; RAJAK, R.C.; HASIJA, S.K. Purification and partial characterization of two extracellular keratinases of *Scopulariopsis brevicaulis*. **Mycopathologia.** 119: 161-165. 1992.
- [4] NORBEST'S PELICAN RAPIDS. Processes wastes for profit food engineering. **Food Engineering.** 43(12):56-57. 1971.
- [5] ORPIN, C.G. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. **J. Gen. Microbiol.** 98: 423-430. 1977.
- [6] ROSEN, H.A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. **Arch. Biochem. Biophys.** 67: 10-15. 1957.
- [7] SANTOS, R.; FIRMINO, A.; DE SÁ, C.; FELIX, C. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus*. **Fresenius Current Microbiology.** 33: 364-370. 1996.
- [8] SIESENOP, U.; BÖHM, K.H. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. **Mycoses.** 38: 205-209. 1995.
- [9] VIDAL, L. Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores de plumas. Estudio comparativo de la cinética de fermentación de dos cepas bacterianas (*Kocuria rosea* y *Bacillus* sp). Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina (Trabajo de Ascenso). 76 pp. 1999.
- [10] VIDAL, L.; NONUS, M.; COELLO, N. *Kocuria rosea* as a new feather degrading bacteria. **European Congress on Biotechnology 9**. Bruselas, Bélgica, 11-15 de Julio. 304 pp. 1999.
- [11] WILLIAMS, C.M.; SHIH, J.C.H. Enumeration of some microbial groups in thermophili C poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. **J. Appl. Bacteriol.** 67: 25-35, 1989.
- [12] WILLIAMS, C.M.; RICHTER, C.S.; MCKENZIE, J.M.; SHIH, J.C.H. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. **Appl. Environ Microbiol.** 56(6): 1509-1515, 1990.
- [13] WILLIAMS, C.M.; LEE, C.G.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poultry Sci.** 70: 85-94, 1991.