



BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

*Estrategia biotecnológica para la biodegradación de la
pluma de pollo con bacterias productoras de enzimas
queratinasas*

TESIS

Para obtener el título de:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

PRESENTA:

Luis Enrique Hernández Guzmán

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

ASESORA

Dra. Lucía López Reyes

ASESORA TÉCNICA

Dra. Reyna Del Consuelo Almiray Pinzón De Dios

Septiembre 2020

Agradecimientos

A mis padres Leticia Guzmán Reyes y Luis E. Hernández Barba por estar en cada etapa de mi vida, apoyarme y forjar lo que soy.

A mis hermanos Ari, Diana y Eduardo, que estuvieron ayudándome en toda mi vida y jamás permitieron que me rindiera.

A mis abuelos Concepción, Elizabeth, Bartolo y José, que siempre vieron por mis hermanos y por mí, aún sin que nosotros lo pidiéramos.

A mis tíos Viridiana, Wilder, Dante, que me escucharon y me enseñaron muchas cosas de la vida.

A mis padrinos Guadalupe y Alfonso, porque muchas veces vieron por mi familia.

Al Maestro Moisés que me dio la oportunidad de integrarme al laboratorio de microbiología de suelos y me permitió quedarme aún después de terminar mi estancia, me dio a oportunidad de desarrollar algo más que un solo proyecto y darme cuenta lo que en verdad me apasiona.

A la Dra. Lucia que me ayudo en mi proyecto en todos los sentidos y muchas veces me motivo para seguir con el trabajo.

A la Ing. Elizabeth y a la Biól. Leticia, que no solo me enseñaron y reforzaron mis conocimientos, sino también siempre estuvieron al pendiente de mí y no solo académicamente, me ayudaron en muchos aspectos de mi vida y estoy en deuda con ellas.

A mis Amigos de laboratorio Alejandra, Ceci, Joselyne, Jesús, Frank, Joaquín y Héctor, por todos los momentos alegres que tuvimos y hacerme sentir en casa.

A la Ing. Alexa por todo el tiempo que me ayudo en cada parte de mi trabajo y por todas las charlas que me daba, su motivación me ayudó mucho con las últimas etapas del proyecto.

A mis mejores amigos Jaz, Esther, Maurilio, Lalo, Arnulfo, Alexis y Paul, que estuvieron conmigo en el transcurso de la carrera apoyándome y de darme los mejores recuerdos de esta bonita etapa, que se volvieron más que mis amigos y a los cuales estimo mucho. Gracias por tolerarme.

A Yesenia, gracias por todo lo que has hecho por mí, por ser mi confidente y mi fuerza.

Dedicatoria

A Ne y Tochi que siempre creyeron en mí.

A mis hermanos Diana, Godi y Lalo, si se puede y sé que ustedes también lo lograrán.

Índice

1.	Resumen	9
2.	Introducción	10
3.	Marco teórico.....	12
3.1	Residuos agroindustriales	12
3.2	Residuos en la avicultura	12
3.3	Plumas	12
3.3.1	Usos de la pluma de pollo	13
3.4	Proteína fibrosa	14
3.4.1	Queratina	14
3.4.2	Hoja β	15
3.5	Microorganismos productores de queratinasas.....	15
3.5.1	Queratinasas.....	16
3.5.2	Mecanismo de degradación de queratina en las plumas	16
3.6	Suelo	17
3.6.1	Ciclo del carbono	17
3.6.2	Materia orgánica	18
3.6.3	Compost.....	19
4.	Planteamiento del problema	20
5.	Justificación	21
6.	Objetivo	22
6.1	General	22
6.2	Particulares	22
7.	Hipótesis.....	23
8.	Diseño de investigación.....	24

8.1	Tipo de estudio.....	24
8.2	Tamaño de muestra	24
8.3	Sede y lugar de estudio.....	24
8.4	Periodo de muestreo	24
8.5	Criterios de inclusión	24
8.6	Criterios de exclusión	24
8.7	Análisis estadístico de la información.....	24
8.8	Recursos humanos	25
8.9	Recursos materiales.....	25
8.10	Recursos financieros.....	25
9.	Materiales y métodos	26
9.1	Material biológico	26
9.2	Sitio de muestreo para el aislamiento de bacterias con actividad queratinasa	26
9.3	Fase de muestreo	26
9.4	Diagnóstico microbiológico y aislamiento de otras bacterias.....	27
9.5	Aislamiento de <i>Bacillus</i> sp.....	27
9.6	Caracterización morfológica, actividad catalasa, oxidasa y O/F.....	27
9.7	Degradación de queratina	27
9.7.1	Degradación de queratina en medio de cultivo	27
9.7.2	Índice de degradación y crecimiento en medio de cultivo APA sólido con variaciones de pH	28
9.7.3	Índice de solubilización y actividad queratinolítica de la β -queratina	28
9.8	Caracterización bioquímica de cepas bacterianas con actividad queratinolítica por medio de sistema API 20NE	28

9.9	Aplicación de bacterias degradadoras de queratina como prueba de compostaje de plumas	29
10.	Resultados y discusión	31
10.1	Sitio de muestreo	31
10.2	Diagnóstico microbiológico	31
10.3	Aislamiento y caracterización morfológica, actividad catalasa, oxidasa y O/F	32
10.4	Degradación de queratina	33
10.4.1	Degradación de queratina en medio de cultivo	33
10.4.2	Índice de degradación y crecimiento en medio APA sólido con variaciones de pH	34
10.4.3	Índice de solubilización y actividad queratinolítica de la β -queratina	37
10.5	Caracterización bioquímica de cepas con actividad queratinolítica por medio de sistema API 20NE	39
10.6	Aplicación de bacterias degradadoras de queratina como propuesta de compostaje de plumas	41
11.	Conclusiones	46
12.	Bibliografía	47

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de actividad queratinolítica por enzimas queratinasas.....	16
Figura 2. Tiradero de plumas al aire libre ubicado en el municipio de San José Teacalco.....	26
Figura 3. Muestras recolectadas del tiradero de plumas	31
Figura 4. Placas de dilución de muestras M1 y M2 para el conteo de bacterias mesofílicas.	33
Figura 5. Placas de medio APA inoculadas con un crecimiento de 48 h a temperatura de 32°C	33
Figura 6. Diámetros de crecimiento de colonias bacterianas en función a pH de 6, 7 y 8 respectivamente.	35
Figura 7 Degradación de pluma	37
Figura 8. Actividad queratinolítica de la β -queratina.....	38

Índice de cuadros

Cuadro 1. Análisis microbiológico de suelo con residuos avícolas.....	32
Cuadro 2. Bacterias aisladas de muestras de residuos avícolas	32
Cuadro 3. Halos de crecimiento de diferentes cepas en actividad queratinolítica en medio APA con variaciones de pH	36
Cuadro 4. Actividad queratinolítica de la β -queratina	39
Cuadro 5. Identificación de cepas bacterianas.....	40
Cuadro 6. Aplicación de bacterias productoras de enzimas queratinolíticas para el proceso de compostaje en ensayo de invernadero por tratamiento, clave y contenido.....	41
Cuadro 7. Evaluación de índice de acidez o alcalinidad	43
Cuadro 8. Evaluación de materia orgánica disponible	43

1. Resumen

La avicultura nacional es un campo muy explotado, debido a ello hay un aumento en la cantidad de residuos generados desde la crianza hasta el sacrificio de aves. Las plumas representan del 5% al 10% del peso vivo del ave, por lo que se ha registrado que hay una producción de alrededor de cinco millones de toneladas al año a nivel mundial. Las plumas presentan una estructura compleja, constituida principalmente de queratina, lo cual provoca que su degradación sea lenta. Se han descrito bacterias y hongos que producen enzimas queratinolíticas capaces de degradar la estructura de la queratina por acción sobre los enlaces di-sulfuro y los enlaces peptídicos. El objetivo del trabajo es desarrollar una estrategia biotecnológica para la reducción de residuos avícolas a partir de bacterias aisladas del suelo que presenten actividad queratinolítica. Se realizó el conteo de la población bacteriana asociada a plumas en diferentes estados de descomposición. Se aislaron 47 bacterias de las cuales 16 presentaron actividad queratinolítica. Se evaluó la actividad de las queratinasas en distintos pH y también la degradación de la β -queratina en todas las bacterias prospecto. Tres cepas fueron seleccionadas por su eficiente actividad enzimática para la degradación de plumas *in vitro*. Las cepas fueron identificadas como *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia* y una no identificada. Se evaluó la actividad queratinolítica de las tres bacterias mediante un diseño de bloques al azar donde se aplicaron cuatro tratamientos, un testigo con *Chryseobacterium indologenes* y un tratamiento control. Se mezcló suelo-plumas-bacterias en relación 1:8 y se mantuvo a humedad constante y se evaluó la degradación a través de cinco muestreos mensuales. Se observó en todos los tratamientos una variación en el pH desde el segundo mes de inoculación con un promedio de pH 4.5, posiblemente por el rompimiento de puentes di-sulfuro, la producción de ácidos carbónicos, CO₂, liberación de N₂ y iones amoniacos, además un aumento en el porcentaje de materia orgánica con respecto del control. El tratamiento con *Chryseobacterium indologenes* fue más eficiente en la degradación biotecnológica de plumas en un periodo de 150 días.

2. Introducción

La avicultura nacional es un campo muy importante en la producción agropecuaria, en el 2018 se produjeron 3.470 millones de toneladas de carne de pollo superando a la res y al puerco con una diferencia del 15 y 19.8 por ciento respectivamente (UNA, 2019; Enciso *et al.*, 2017). Debido a ello, hay un aumento de la cantidad de residuos generados desde la crianza hasta el sacrificio de la gallina, los cuales si no se tratan adecuadamente pueden ser vectores de organismos patógenos que afecten la calidad del suelo, agua y aire (FAO, 2019).

Las plumas son uno de los principales desechos generados, que representan entre un cinco y diez por ciento del peso vivo del animal (Williams, 2013; Valls, 2017). En el año de 2009 se reportó a nivel industrial se produjeron alrededor de cinco millones de toneladas de plumas mundialmente (Kalaikumari *et al.*, 2018). Las plumas de pollo al tener una estructura a base de queratina provocan que su degradación natural sea lenta. La queratina es una proteína fibrosa que puede encontrarse en cabello, lana, uñas, plumas, cuero y garras de animales. Conformada por 19 aminoácidos principalmente cisteína, lisina, prolina y serina (Ma *et al.*, 2016). Su descomposición es muy lenta ya que tiene un alto grado de entrecruzamientos debido a que presenta puentes di-sulfuro, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Zhang *et al.*, 2013). Las queratinasas son enzimas proteolíticas capaces de alterar la estructura de la queratina actuando sobre los enlaces di-sulfuro. Se han descrito bacterias y hongos que producen queratinasas, permitiendo así la reducción de estructuras compuestas de queratina.

Algunos microorganismos que se han descrito como productores de queratinasas son *Aspergillus* sp., *Alternaria radicina*, *Tricurus spiralis*, *Stachybotrys atra*, *Onygena* sp., *Penicillium* sp., *Absidia* sp., *Rhizomucor* sp., *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. gallinae*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Streptomyces pactum*, *S. albus*, *S. thermoviolaceus*, *S. fradiae*, *Bacillus* sp., *Fervidobacterium pennovorans*, *Chryseobacterium* y *Kocuria rosea* (Suntornsuk y Suntornsuk, 2003; Coello *et al.*, 2000; Călin *et al.*, 2017).

Por ello, este trabajo propone utilizar microorganismos endémicos del suelo que produzcan queratinasas como una alternativa para transformar los desechos de plumas de pollo que se producen en la industria avícola.

3. Marco teórico

3.1 Residuos agroindustriales

El sector agroindustrial es una parte que implica a productos de la industria agropecuaria, silvicultura y pesca, dividiéndose en dos categorías, alimentaria y no alimentaria (FIRCO, 2017). Los residuos agroindustriales se definen como materiales en estado sólido o líquido generados a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización y que ya no son de utilidad para el proceso que se generó (Saval, 2012). El desarrollo de la agroindustria ha traído ventajas a la sociedad y esto a su vez provoca un incremento de residuos. La falta de conciencia en la protección del medio ambiente ha facilitado que los residuos sean mal manejados y de esta manera sean vectores de contaminación para el suelo, agua y aire (Cury *et al.*, 2017).

3.2 Residuos en la avicultura

Los desechos generados en los mataderos de aves de corral comprenden desde el agua de elaboración y subproductos sólidos orgánicos. Los rendimientos de los canales de las aves representan entre el 70 - 75% aproximadamente del peso vivo. Uno de los residuos sólidos generados son las plumas, las cuales constituyen entre un 5 a 10 % aproximado del peso vivo de las aves (Williams, 2013; Valls, 2017). En el 2009 se reportó que las industrias avícolas presentes en todo el mundo pueden producir alrededor de cinco millones de toneladas de residuos de plumas por año (Kalaikumari *et al.*, 2018). Si no se llega a controlar este tipo de residuos podría convertirse en un vector de organismos patógenos, con afectaciones a la calidad del agua, suelo y aire (FAO, 2019).

3.3 Plumas

Las plumas son estructuras epidérmicas formadas por eje central rígido llamado raquis con paletas más suaves en los lados que a su vez, se compone de numerosas ramas laterales llamadas barbas (Quintero *et al.*, 2017). Algunas de las cualidades que presenta la pluma es su resistencia al agua, una constitución liviana que a la vez facilita el aislamiento térmico, son rígidas y/o flexibles, lo cual

permite a las aves diversas funciones como protección, exhibición, camuflaje, retención de calor y vuelo (Kowata *et al.*, 2014). Se ha reportado que el 90 % de la pluma presenta queratina, tanto la α -queratina y β -queratina están expresadas en distintas partes de las plumas, encontrando una composición de 41-67% de α -queratina y 33-38% de β -queratina (Barone *et al.*, 2005; Tamreihao *et al.*, 2019).

3.3.1 Usos de la pluma de pollo

La disposición final de las plumas de pollo son métodos de desecho como la incineración o descarga en rellenos sanitarios, favoreciendo la producción de partículas como monóxido de carbono, dióxido de carbono, dioxinas, óxido de nitrógeno y azufre, entre otras, que pueden repercutir en la salud del humano (Stingone y Wing, 2011). Otro fin que tienen las plumas, es el uso con fines decorativos en algunos atuendos de distintas culturas o formaban parte de tratamientos médicos tradicionales (Tesfaye *et al.*, 2017). También, se ha aplicado como un suplemento alimenticio en el sector agricultor, debido al alto grado proteico que tiene la harina de plumas; para esto sufre procesos térmicos y de presión alta; sin embargo, contiene un bajo valor nutricional por desbalances de aminoácidos esenciales y la formación de aminoácidos no nutritivos (Coello *et al.*, 2003). Se han aprovechado por parte del sector industrial textil, incorporándolo como parte de fibras o artículos (almohadas, chamarras, plumeros, etc) (Tesfaye *et al.*, 2017).

Gracias a la composición química y la facilidad de disponibilidad se ha visto que presenta un gran potencial en el sector industrial como materia prima, utilizándolas desde la formación de biopelículas para la sustitución de plásticos (Calle y Ruiz, 2017), como para obtención de queratina cosmética, así como aplicaciones en la biomedicina (Florida, 2019), y como fuente de bioenergía (Kwiatkowski *et al.* 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que tiene un gran impacto en la aplicación de fertilizantes ya que estructuralmente contiene niveles altos de nitrógeno por la cantidad de aminoácidos que conforma su estructura (Zhang *et al.*, 2013). Así mismo, algunos aminoácidos son bioestimulantes del crecimiento vegetativo, al

favorecer la absorción de nutrientes a la planta y tolerancia al estrés abiótico y biótico. El compostaje de plumas genera un aumento de materia orgánica en el suelo, lo cual favorece a la fertilidad del suelo (Gurav y Jadhav, 2012).

3.4 Proteína fibrosa

Las proteínas fibrosas son estructuras muy importantes, desempeñan funciones estructurales en células y tejidos animales. Son moléculas alargadas con una estructura secundaria bien definida (Mathews *et al.*, 2002). Su secuencia de aminoácidos repetitivos otorga propiedades tanto mecánicas y arquitectónicas a las proteínas (Costa *et al.*, 2018). Así mismo, la posición de los aminoácidos da lugar a conjuntos de cadenas polipeptídicas dispuestas en una hebra o membrana (Nelson *et al.*, 2005).

3.4.1 Queratina

La queratina es una de las proteínas fibrosas más abundantes que conforman distintas estructuras como plumas, cabello, uñas (Aluigi *et al.*, 2008); está formada por 19 aminoácidos de los cuales, los principales son lisina, cistina, prolina y serina (Gopinath *et al.*, 2015). Estructuralmente, presenta interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas estáticas, fuerzas hidrófobas) e interacciones covalentes (puentes disulfuro) (Zhang *et al.*, 2013). Debido a este tipo de interacciones su estabilidad es muy alta, haciéndola insoluble en agua, ácidos débiles y solventes orgánicos, también es insensible a ataques enzimáticos como la tripsina o la pepsina (Ma *et al.*, 2016; Abdel-Fattah *et al.*, 2018; Tamreihao *et al.*, 2019). Presenta distintas estructuras secundarias en su conformación y con ello se clasifica en α -queratinas y β -queratinas; las α -queratinas se componen de bobinas helicoidales α que se autoensamblan en filamentos intermedios, las β -queratinas son ricas en láminas β plegadas (Lange *et al.*, 2016). La β -queratina es más accesible para la degradación por algunas queratinasas que la α -queratina, debido a que presenta menos enlaces disulfuro y exhibe una mayor porosidad (Lange *et al.*, 2016; Kalaikumari *et al.*, 2018).

3.4.2 Hoja β

La conformación β es una estructura de aminoácidos más extendida y su esqueleto presenta una forma de zigzag. Este tipo de estructuras se pueden unir en forma de pliegues, denominados hojas β (Nelson *et al.*, 2005). La hoja β es la formación de enlaces de hidrógeno entre los segmentos adyacentes de una cadena, la mayoría de los grupos polares amino están unidos por puentes de hidrógeno (Petsko y Ringe, 2004).

3.5 Microorganismos productores de queratinasas

La diversidad de microorganismos que generan queratinasas es extensa, se han reportado bacterias, actinomicetos y hongos. Bacterias como: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Chryseobacterium* son las más estudiadas y con mayor aplicación en el sector industrial (Câlin *et al.*, 2017). Sin embargo, también se tiene de registro de otras bacterias como: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Kocuria rosea*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Lysobacter*, entre otras (Kothari *et al.*, 2017); dentro del grupo de hongos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Alternaria radicina*, *Tricurus spiralis*, *Stachybotrys atra*, *Onygena* sp., *Penicillium* sp., *Absidia* sp., *Rhizomucor* sp., *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. gallinae*, *Microsporium canis*, *M. gypseum* de igual manera presentan actividad queratinolítica (Lange *et al.*, 2016).

Se han encontrado microorganismos que producen enzimas extracelulares o intercelulares, las cuales presentan distintas actividades a nivel industrial, lo que facilita procesos químicos para la obtención de moléculas específicas (Liu y Kokare, 2017). Su alta especificidad para generar transformaciones de moléculas y las condiciones poco agresivas necesarias para operar las enzimas son características que han permitido su interés como biocatalizadores. La biocatálisis es una herramienta estratégica que permite el desarrollo de manera sustentable el procesamiento de la transformación de compuestos químicos, con aplicación en el sector farmacéutico, agricultor y alimenticio (Castillo y Rodríguez, 2014).

3.5.1 Queratinasas

Las queratinasas son serina-proteasas o metaloproteasas con función queratinolítica, estas enzimas son predominantemente extracelulares y son producidas por microorganismos que crecen en medio rico en queratina (Câlin *et al.*, 2017). Presentan un alto grado de interés a nivel industrial por la degradación de proteínas complejas, proporcionando aminoácidos, péptidos y proteínas solubles. (Gupta & Ramnani, 2006; Kothari *et al.*, 2017). Se caracterizan por presentar un amplio rango de temperatura y pH, el cual, le permite completar la degradación de sustratos (Vidmar & Vodovnik, 2018).

3.5.2 Mecanismo de degradación de queratina en las plumas

El mecanismo de degradación de la queratina en las plumas por bacterias queratinolíticas se da por dos procesos; la sulfitolisis y la proteólisis (Koenillowicz-Kowalska y Bohacz, 2011). La sulfitolisis es realizada por la enzima reductasa disulfuro, la cual, provoca la reducción de los enlaces disulfuro cambiando la estructura aminoacídica en la lámina β de la queratina; esto a su vez, da lugar a diferentes sitios hidrolíticos para un ataque proteolítico en la queratina como se muestra en la figura 1. La sulfitolisis da lugar a la presencia de compuestos reductores como sulfuro de sodio, ditioneitol, mercaptoetanol, glucatión, cisteína y ácido tioglicólico (Vidmar y Vodovnik, 2018). Se ha propuesto que la degradación de la queratina por actividad proteolítica da lugar a reacciones de desaminación y liberación de nitrógeno en exceso como iones de amonio, elevando así el pH (Tamreihao *et al.*, 2019).

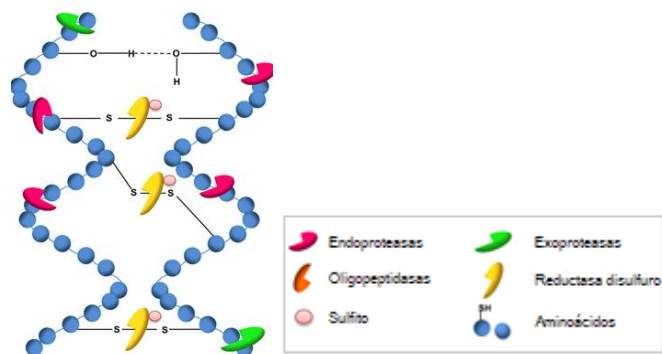


Figura 1. Mecanismo de actividad queratinolítica por enzimas queratinasas. Lange *et al.*, (2016)

3.6 Suelo

El suelo forma parte de una capa de la superficie terrestre y constituye una interfase entre la litosfera, la biosfera y la atmósfera (Porta *et al.*, 2008). El suelo se refiere a la superficie formada a partir de rocas en un proceso que intervienen fuerzas físicas, químicas y biológicas, que son capaces de servir como hábitat para los organismos (Crespo, 2004). El suelo se constituye principalmente por una fase orgánica; formada por un proceso de descomposición de animales, plantas y microorganismos, y una fase inorgánica; formada por minerales debido al desgaste de las piedras y procesos químicos. El suelo es un medio proliferante de microorganismos que regularmente se encuentran concentraciones de 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo (UFC g^{-1}) (Atlas y Bartha, 2002).

3.6.1 Ciclo del carbono

El carbón es uno de los elementos más importantes del planeta, constituye estructuras moleculares como proteínas, forma parte de la fotosíntesis y se combina con distintos elementos para formar numerosos procesos vitales (Grace, 2013). El ciclo del carbono es uno de los ciclos biogeoquímicos por los que muchos organismos reutilizan elementos vitales como el nitrógeno, el azufre y el fósforo (DellaSala, 2018). Organismos fotoautótrofos por medio de la fotosíntesis se incorpora el dióxido de carbono. Después, quimioheterótrofos se alimentan de los fotoautótrofos, permitiendo una resíntesis de los átomos de carbono del dióxido de carbono. La energía que generan los quimioheterótrofos es adquirida por moléculas orgánicas que a través de la respiración se libera y el dióxido de carbono vuelve a estar disponible. Por medio de las excreciones o cadáveres de plantas y animales, sus compuestos orgánicos que los conforman pueden ser degradados por la actividad microbiana de la biota del suelo. Produciendo variedad de productos finales, una oxidación completa a dióxido de carbono y agua para integrarlo nuevamente a la atmósfera (Tortora *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2013).

3.6.2 Materia orgánica

La materia orgánica es la mezcla heterogénea de residuos en descomposición de la vegetación y raíces, restos y secreciones de animales (Sánchez *et al.*, 2005). Esto permite que elementos como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros elementos sean liberados para ser aprovechados por las plantas, ejerciendo un efecto en beneficio no solo como fertilizante, sino también mejorando sus características físicas y químicas del suelo (Atlas y Bartha, 2002). La cantidad de materia orgánica está en función de la cantidad de residuos que entran al suelo y de las tasas de descomposición de éstos. Factores como el clima, tipo y calidad del suelo son importantes para regular el proceso de descomposición (Espinoza, 2004).

La actividad biológica para el proceso de descomposición de residuos se constituye por múltiples organismos vivos como protozoarios, insectos y microorganismos, los cuales son responsables de toda la bioactividad que tiene como resultado disponibilidad de nutrientes y la génesis del suelo (Aguilera, 2000). Se puede clasificar a la materia orgánica en dos variantes con respecto a su complejidad: materia orgánica fresca, se conforma por restos de animales, plantas y organismos en forma incompleta; la materia orgánica estable, constituida por productos resultantes de la descomposición de los residuos orgánicos, síntesis microbiana y compuestos húmicos (Conti, 2000). A medida que la materia orgánica fresca se va consumiendo, las bacterias y hongos transforman elementos contenidos en los compuestos orgánicos en formas inorgánicas (Smith y Smith, 2007). Se denomina mineralización a la degradación completa de un compuesto en sus componentes inorgánicos y puede ser aerobia o anaerobia (Atlas y Bartha, 2002).

En la mineralización aerobia, la materia orgánica sufre un proceso de oxidación, permitiendo una completa degradación en CO_2 y en H_2O y si la molécula original presenta N, S y P en NO_3^- , SO_4^{2-} y PO_4^{3-} . En la mineralización anaerobia, los productos de la degradación de la materia orgánica son CH_4 , y CO_2 , H_2 , NH_3 , H_2S y PO_4^{3-} . Este proceso se desarrolla gracias

a la respiración anaerobia en la que elementos reducibles sirven como aceptores de electrones terminales en lugar de O₂ (Lutz, 2002).

Simultáneamente durante el proceso de descomposición y mineralización ocurre otro proceso, la humificación. La humificación es un proceso complejo que da como resultante moléculas estables a partir de residuos con mayor complejidad en su biodegradación (como ligninas) y por residuos carbonados de bajo peso molecular como azúcares; alcoholes; aminoácidos; ácidos grasos; bases puricas y piridínicas para la formación de precursores de humus y esto a su vez dando como productos sustancias húmicas (Conti, 2000; Porta *et al.*, 2008). El proceso de humificación se caracteriza de manera general por sus reacciones químicas, la formación de moléculas complejas y compuestos orgánicos con mayor estabilidad. Su formación es mediada por factores que van desde la naturaleza de los residuos como condiciones externas (aireación, humedad, temperatura y acidez) (Porta *et al.*, 2003).

3.6.3 Compost

La formación del compost es la mezcla de la materia orgánica en descomposición bajo condiciones aerobias y se emplea para mejorar la estructura del suelo y proporcionar nutrientes (Román *et al.*, 2013). En la producción de compost se aprovechan los residuos orgánicos generados por la ingesta o procesamiento de alimentos para así utilizarlos como un fertilizante orgánico (Reynolds *et al.*, 2015). El tipo de material empleado para la formación del compost dará las características químicas y físicas en él, como condiciones de operación y el grado de descomposición obtenido. Factores como actividad microbiana, oxigenación, humedad y temperatura; son factores que median el compostaje (Vázquez *et al.*, 2015).

4. Planteamiento del problema

El sector avícola nacional es un campo muy explotado debido al alto consumo de sus productos. En el año 2018 se produjeron más de 3 millones de toneladas de carne de pollo, es uno de los cárnicos con mayor producción en México (UNA, 2019). Las plumas contienen un alto grado proteico, son los residuos generados en el sacrificio de gallinas con mayor impacto en el ambiente. Su conformación molecular dificulta la degradación de manera natural por el tipo de enlaces que se forman en la estructura. Este tipo de residuo al ser mal procesado en los rellenos sanitarios, son vectores de organismos patógenos que afecten la calidad del suelo, agua y aire, propiciando enfermedades en comunidades que se encuentren alrededor del relleno sanitario.

Ante esta problemática ambiental, es necesario desarrollar estrategias que mejoren su degradación y permita aprovechar las plumas de pollo y darle un valor agregado a este recurso.

5. Justificación

La pluma de gallina es uno de los residuos generados por la industria avícola con mayor impacto ambiental negativo, ya que por su alto contenido en queratina su descomposición de manera natural es lenta.

La mala disposición de los desechos avícolas puede predisponer a las plumas para incrementar poblaciones de insectos, parásitos o microorganismos que afecten a la población aledaña, al mismo tiempo podrían afectar la calidad del suelo, agua y aire de zonas cercanas a los rellenos sanitarios. Gran parte de los residuos no son tratados de manera apropiada por lo que se tienen que buscar alternativas en las que se aproveche el alto grado proteico que se presenta en las plumas y mejore su descomposición final. La pluma presenta una estructura química con β -queratina y propicia la descomposición de ésta.

En este proyecto se pretende aplicar bacterias que produzcan enzimas queratinasas, las cuales facilitarían la descomposición de la pluma y a su vez aportarían beneficios al suelo ya que aumentaría la materia orgánica.

6. Objetivo

6.1 General

Desarrollar una estrategia biotecnológica a través de bacterias que produzcan enzimas queratinasas que degraden la β -queratina de las plumas de pollo.

6.2 Particulares

- Realizar una evaluación microbiológica del suelo que esté en contacto con las plumas de pollo para detectar posibles bacterias con actividad queratinolítica.
- Aislar bacterias con actividad queratinolítica de suelo-plumas.
- Evaluar la actividad queratinolítica de las bacterias a través de enzimas que degraden la β -queratina.
- Determinar la degradación de las plumas, mediante la presencia de acidez (pH) y materia orgánica en la mezcla de suelo-plumas.

7. Hipótesis

Hipótesis alternativa:

Algunas bacterias aisladas del sistema suelo-plumas, pueden producir enzimas queratinasas, lo que favorece la degradación de las plumas.

Hipótesis nula:

Algunas bacterias aisladas del sistema suelo-plumas no producen enzimas queratinasas, dificultando la degradación de las plumas.

8. Diseño de investigación

8.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal y comparativo de diferentes bacterias con actividad queratinolítica aisladas del sistema suelo-pluma.

8.2 Tamaño de muestra

Corresponde a 5 tratamientos:

1. Evaluación microbiológica del sistema suelo-pluma

8.3 Sede y lugar de estudio

Se realizará en el Laboratorio de Microbiología de Suelos, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ubicado en el edificio IC11 en Ciudad Universitaria, Puebla, Puebla.

8.4 Periodo de muestreo

Octubre 2018 – Junio 2019

8.5 Criterios de inclusión

Para los tratamientos: se incluirán las bacterias que favorezcan la degradación de plumas.

8.6 Criterios de exclusión

Para los tratamientos: se excluirán las bacterias con nula eficiencia de la degradación de las plumas.

8.7 Análisis estadístico de la información

Los datos se analizaron por el método de análisis de varianza (ANOVA) y para diferenciar entre los tratamientos se utilizara la prueba de Fisher a $P=0.1$ de significancia.

8.8 Recursos humanos

Miembros del cuerpo académico de Microbiología del Suelo BUAP CA-99 integrado por:

Director de tesis: M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

Asesora de tesis: Dra. Lucia López Reyes

Personal de Servicios Profesionales

Tesista becario: Luis Enrique Hernández Guzmán

8.9 Recursos materiales

Material de vidrio y plástico, equipos, medios de cultivo y reactivos serán suministrados por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP.

8.10 Recursos financieros

Esta investigación será financiada por el programa de biofertilizantes “BiofertiBUAP y BiofosfoBUAP” y del cuerpo académico de Microbiología del Suelo BUAP CA-99.

9. Materiales y métodos

9.1 Material biológico

Se trabajó con cuatro cepas bacterianas con actividad proteolítica, quitinolítica y peptinolítica, las cuales forma parte del cepario del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del ICUAP registradas con claves TZB31, TZB30, IQ2-2 y PPQ26.

9.2 Sitio de muestreo para el aislamiento de bacterias con actividad queratinasa

Las muestras con desechos avícolas fueron recolectadas de un tiradero al aire libre ubicado en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala. En el sitio se puede notar la cantidad de desechos avícolas que se llegan a almacenar en esa zona (Figura 1).



Figura 2. Tiradero de plumas al aire libre ubicado en el municipio de San José Teacalco

9.3 Fase de muestreo

Se recolectaron un total de tres muestras de suelo con desechos avícolas del lugar, clasificándolas por el grado de descomposición de la pluma de pollo para su posterior análisis microbiológico.

9.4 Diagnóstico microbiológico y aislamiento de otras bacterias

Se determinó la cuenta total de las poblaciones de microorganismos por la técnica de diluciones seriadas. Con posibilidad de encontrar organismos que produzcan enzimas queratinasas y que degraden la queratina como componente de las plumas de pollo. Se pesó 1 g de suelo con residuos avícolas y se realizó la técnica de diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta la 10^{-7} . Se sembraron en medios enriquecidos; agar soya tripticaseina (TSA) para bacterias mesofílicas aerobias y agar dextrosa papa (PDA) para hongos, incubándolas a una temperatura de 32° C y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 24, 48 y 72 horas.

9.5 Aislamiento de *Bacillus* sp.

Se pesaron 10 g de suelo con residuos avícolas y se añadió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual, contenía 90 mL de agua destilada estéril. Después se sometió a calentamiento a una temperatura de 85° C por 15 minutos. Se dejó enfriar y se tomó 1 mL del matraz Erlenmeyer para realizar diluciones seriadas desde la dilución 10^{-1} hasta la 10^{-3} . Se sembraron en medios de cultivo para *Bacillus* en agar pluma de ave (APA). Se incubaron a una temperatura de 32° C y el conteo de UFC se realizó de 24, 48 y 72 horas.

9.6 Caracterización morfológica, actividad catalasa, oxidasa y O/F

De las placas de dilución en sus respectivos medios, se aislaron bacterias con características de actividad queratinasa y distinta morfología, se sembraron por estría cruzada y se incubarán a 32° C por 48 h, hasta obtener colonias puras. Se evaluaron características básicas como tinción de Gram, catalasa, oxidasa y pruebas de oxidación y fermentación (O/F). Lo cual permitió a la identificación de 47 bacterias mesofílicas aerobias.

9.7 Degradación de queratina

9.7.1 Degradación de queratina en medio de cultivo

De las cepas bacterianas aisladas, se seleccionaron aquellas que presentaron capacidad de degradar la queratina.

En placas de agar APA (agar pluma de ave) (Coello *et al.*, 2000) y con ayuda del replicador de Steer, se sembraron las bacterias con una concentración del tubo 4 del nefelómetro Mc Farland (equivalente a 10^8 UFC). Se incubaron a 32°C por 48 h. Se dio como positivo a la prueba en aquellas bacterias que se desarrollaron en el medio.

9.7.2 Índice de degradación y crecimiento en medio de cultivo APA sólido con variaciones de pH

Las cepas que presentaron actividad para degradar la queratina se resembraron en placas de agar APA. Con la finalidad de demostrar que a distintos valores de acidez o alcalinidad se puede generar más enzimas queratinasas. Con ayuda de un replicador de Steer y con bacterias a una escala del tubo 4 de Mc Farland se sembraron por duplicado en el procedimiento siguiente: se inocularon placas de medio APA con variaciones de pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0), se incubó por 48 horas a 30°C .

9.7.3 Índice de solubilización y actividad queratinolítica de la β -queratina

Las bacterias que presentaron actividad para degradar queratina con mayor eficiencia en un pH específico, por triplicado se sembraron en tubos con 10 mL que contenían medio mínimo adicionado con plumas de pollo, se inocularon con un volumen de 0.1 mL a una escala del tubo 4 del nefelómetro de Mc Farland. Se colocaron los tubos en agitación a 200 rpm y en incubación a una temperatura de 32°C , observando los cultivos cada 24 h por 5 días. Para demostrar la degradación de β -queratina, en el quinto día, de cada bacteria se tomaron 2 mL de cada tubo y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 230 nm (Goldstein *et al.*, 2004).

9.8 Caracterización bioquímica de cepas bacterianas con actividad queratinolítica por medio de sistema API 20NE

A partir de una colonia aislada de las placas originales, se realizó una suspensión en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 mL de agua estéril y se llenó con la suspensión de bacterias los tubos de todos los pozos, no la cúpula (cada pozo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia). Después se cubrió con

parafina las cúpulas de los pozos D-glucosa (GLU), L-arginina (ADH), urea (URE), para obtener anaerobiosis. Se colocó la tira en cámara húmeda de incubación. Se incubaron de 30-32°C durante 24 horas y se tomaron las primeras lecturas. Tras la incubación se anotarán los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pozo con los de las tablas de lectura, y se anotó el resultado como positivo o negativo.

Del conjunto de reacciones y resultados se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras. Los pozos están separados en grupos de tres, en total se tienen 7 grupos de 3 tubos o triplete (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa). Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pozo se le dió el valor de 0, 1, 2 y 4 de acuerdo a los siguientes criterios:

1. Si la reacción es negativa se escribe 0.
2. Si la reacción es positiva se escribe: 1 si es el primer pozo de un triplete, 2 si es del segundo triplete o 4 si es del tercer triplete.
3. Se suman los valores de cada triplete, y con las sumas de los 7 tripletes se obtiene un código de 7 cifras; a la reacción de oxidasa se le asignara un valor 4 cuando resulte positiva. El código obtenido corresponde a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante (bioMérieux S.A.).

9.9 Aplicación de bacterias degradadoras de queratina como prueba de compostaje de plumas

En recipientes de plástico se colocó 1 kg de suelo con bajo contenido de materia orgánica, después se agregó 250 g de plumas y se cubrió con 1 kg de suelo del mismo. A cada recipiente se le añadió 100 mL de concentrado bacteriano, desarrollado en medio enriquecido de caldo soya tripticaseina y con una población ajustada mayor a 10^8 UFC mL⁻¹. Se mezcló todos los componentes. El recipiente se mantuvo a un 40% de humedad y se inoculo con concentrado bacteriano dos veces cada mes. El experimento tuvo una duración de 5 meses y que cada tratamiento se realizó por duplicado. Se evaluó el pH y el contenido de

materia orgánica cada mes de cada tratamiento en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Para su análisis, las muestras se secaron y tamizaron en una malla de 0.5 mm. Para la determinación de pH se siguió el siguiente procedimiento; se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado, posteriormente se adicionaron 20 mL de agua destilada y con ayuda de un agitador de vidrio se agito durante un minuto, se dejó reposar por 5 minutos. Previamente se calibro el potenciómetro con una solución buffer de pH 7.00. Se agito nuevamente la suspensión y después se introdujo el electrodo para registrar el resultado. Los resultados obtenidos nos permitieron clasificar el tipo de suelo en el que encuentren las muestras. Para la determinación de materia orgánica en el suelo se describió la siguiente metodología; se pesaron de cada tratamiento 0.75 g y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Posteriormente se añadieron 10 mL de dicromato de potasio al 1 N, agitando lentamente por 1 minuto. Se agregó 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agito lentamente por un minuto. Se dejó reposar durante 30 minutos y después se agregó 200 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico y 0.1g de fluoruro de sodio. A la solución se le añade 2 gotas indicador de difenilamina y se titula con una disolución de sulfato ferroso al 0.5N. Se termina la reacción hasta una coloración verde esmeralda.

10. Resultados y discusión

10.1 Sitio de muestreo

Durante el proceso de aislamiento de las bacterias con actividad queratinolítica, se recolectaron tres muestras de un tiradero al aire libre ubicado en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala. Las muestras presentaron distinto grado de degradación natural y con cambios en la coloración del suelo, probablemente debido a la incorporación de materia orgánica productos de la degradación de la pluma. Se notan algunos fragmentos del estandarte y raquix de la pluma (Figura 2). Para el trabajo, se les asignaron claves para su identificación con la finalidad de dar un manejo adecuado.

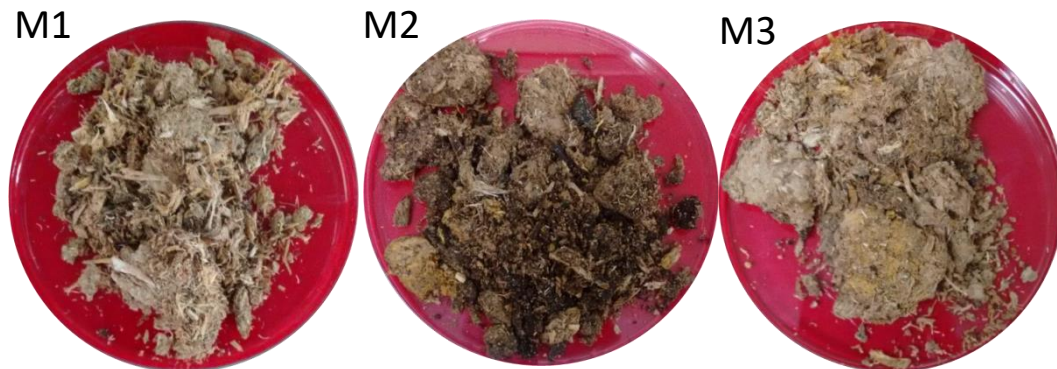


Figura 3. Muestras recolectadas del tiradero de plumas. Abreviatura: Mn: número de muestra

10.2 Diagnóstico microbiológico

El análisis microbiológico del suelo en la muestra M2 presentó una mayor actividad microbiológica por gramo de suelo con valores de bacterias mesófilas aerobias de 1.4×10^8 UFC g^{-1} suelo y 1.8×10^4 UFC g^{-1} suelo de bacterias Gram positivas más elevados en comparación a las muestras M1 y M3 (Cuadro 1). La muestra M2 presentó un mayor grado de descomposición de la pluma en comparación al resto de las muestras, el estado físico de los desechos reflejan la actividad enzimática de las bacterias sobre estos residuos y su digestión para su transformación en materia orgánica, así mismo la diversidad de las comunidades microbianas que presenta son un indicativo sobre la calidad del suelo (Garbisu *et al.* 2007). Tanto la muestra M1 como la M3 presentaron una menor cantidad de

poblaciones bacterianas por gramo de suelo pero con una mayor cantidad de hongos por gramo, las poblaciones de hongos en suelos composteados está relacionada con un contenido de elevado de CaCO₃, lo cual favorece el desarrollo de hongos queratinolíticos (Koenillowicz-Kowalsk & Bohacz, 2011).

Cuadro 1. Análisis microbiológico de suelo con residuos avícolas

Muestra	Bacterias mesófilicas aerobias	Bacterias Gram positivas	Hongos
UFC g ⁻¹ suelo			
M1	2.7x10 ⁷ ± 3x10 ⁶	3x10 ³ ± 4x10 ²	1.06x10 ⁶ ±3.0x10 ⁵
M2	1.4x10 ⁸ ± 1.1x10 ⁷	1.8x10 ⁴ ±3x10 ³	9.5x10 ⁴ ±5.0x10 ³
M3	1.9x10 ⁷ ± 10x10 ⁵	3.5x10 ² ±50	9.4x10 ⁴ ±7.6x10 ³

10.3 Aislamiento y caracterización morfológica, actividad catalasa, oxidasa y O/F

Cuadro 2. Bacterias aisladas de muestras de residuos avícolas

Clave de la muestra	Número de bacterias aisladas	
	Bacterias mesofílicas aerobias	Bacterias Gram positivas
M1	16	8
M2	8	7
M3	5	3

De cada placa de dilución se tomaba una colonia para su aislamiento como se muestra en Figura 4. Para el aislamiento de las bacterias se utilizó el método de diluciones y sembrando las diluciones en medio de cultivo, la purificación se hizo por estría cruzada, se encontró que la muestra M1 presento una mayor diversidad microbiológica con 16 bacterias mesofílicas y 8 bacterias Gram positivas en comparación a las demás (Cuadro 2), las cuales presentaron menor población de bacterias. Se aislaron un total de 47 cepas bacterianas a las que se les caracterizo morfológicamente y por pruebas básicas como: tinción Gram,

catalasa, oxidasa y O/F para asignarles una nomenclatura y así diferenciarlas. Se descartaron las cepas que tuvieron un crecimiento lento.

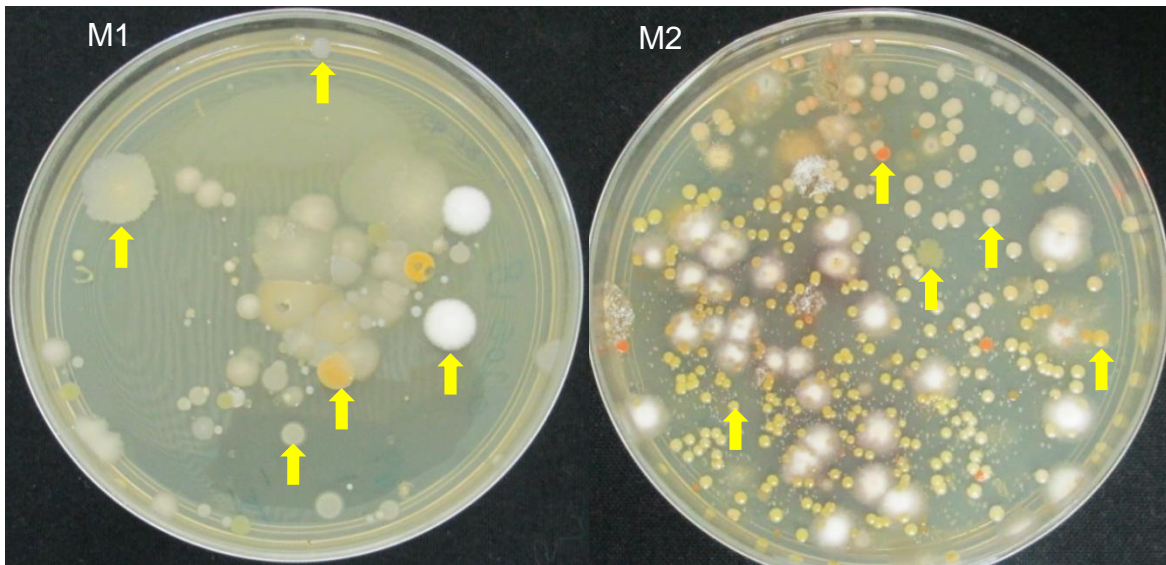


Figura 4. Placas de dilución de muestras M1 y M2 para el conteo de bacterias mesofílicas.

10.4 Degradación de queratina

10.4.1 Degradación de queratina en medio de cultivo

Se detectó mediante una prueba presuntiva la degradación de queratina, aplicando a las 47 cepas aisladas e identificadas en placas de medio APA (Figura 5).

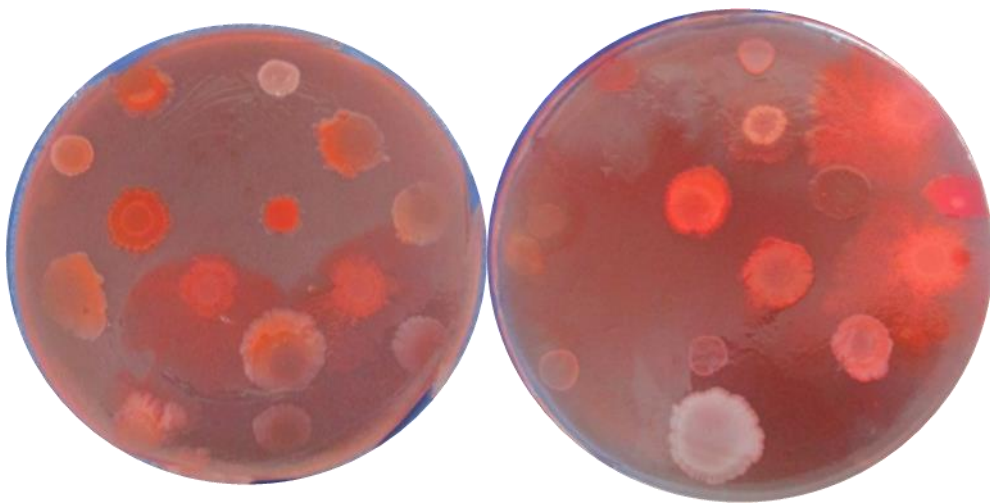


Figura 5. Placas de medio APA inoculadas con un crecimiento de 48 h a 32°C

Solo 16 cepas identificadas fueron capaces de desarrollarse en medio APA como se muestra en la figura 5, en este caso el 34% de las cepas ensayadas mostraron crecimiento en el medio de cultivo. Se ha descrito que las bacterias mesofílicas con un crecimiento a 30°C pueden desempeñar un papel importante en la degradación de la queratina de las plumas (Lucas *et al.*, 2003). Hay que tomar en cuenta que la temperatura del cultivo está sujeta a la naturaleza de la bacteria y sus necesidades nutrimentales, igual que el tiempo de incubación, ya que este dependerá también de la eficiencia de las bacterias para producir las enzimas (Rey, 2018). Otro parámetro importante es el pH, ya que se ha reportado que para un buen proceso queratinolítico, lo deseable es que el medio se encuentre a un pH entre 7 y 11, y una temperatura entre 25-55 °C; debido a que el proceso con pH arriba de 7.0 aumenta la producción de enzimas queratinasas al menos seis veces comparados con cultivos a pH inferiores a 7.0 (Rai *et al.*, 2009).

10.4.2 Índice de degradación y crecimiento en medio APA sólido con variaciones de pH

Se ha descrito que el pH es una variable ambiental que afecta en gran medida la producción enzimática de un microorganismo (López *et al.*, 2016). Dentro del análisis (Cuadro 3), se observan las variaciones de los tamaños de las colonias (halos) de cada cepa, resaltando un mayor diámetro de éstas en el pH entre 7 y 8. Cabe mencionar que la cepa M2ABB4II presentó mayor actividad queratinolítica a valores de pH entre 6,5 y 7,0. Tamreihao *et al.*, en 2019 describió que algunas queratinasas de tipo bacteriano presentan actividad en pH neutro y alcalino. También se observa que a pH 6 hay un tamaño reducido o nulo de la mayoría de las colonias como lo muestra la Figura 6. La actividad queratinolítica de las queratinasas en un pH neutro alcalino presentan un potencial biotecnológico (Riffel *et al.*, 2007).

Diferentes investigaciones relacionadas con la hidrólisis de plumas con microorganismos o enzimas microbianas mencionan que para obtener buenos resultados en la obtención de proteína y producción de enzimas queratinolíticas, los medios más adecuados son ricos en sales con nitrógeno, fósforo, calcio,

magnesio, sodio y con adición de plumas como única fuente de carbono y nitrógeno (Ferrareze *et al.*, 2016). La adición de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , permiten la óptima liberación de enzimas queratinasas por parte de los microorganismos (Riffel *et al.*, 2007). Algunos autores como Rai *et al.*, (2007) y Daroit *et al.*, (2011) mencionan que la adición de carbohidratos como glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa y almidón no tienen efecto en producción de queratinasas en el género *Bacillus* sp. ya que la presencia de carbohidratos disminuyen la actividad enzimática de las bacterias. La adición de compuestos nitrogenados como NH_4Cl , NaNO_3 , extracto de levadura, peptona, extracto de carne y caseína, podrían tener un efecto en la producción de enzimas en el medio mineral de plumas, pero esta reacción se encuentra directamente relacionada con la preferencia de los microorganismos por los sustratos (Rey, 2018).

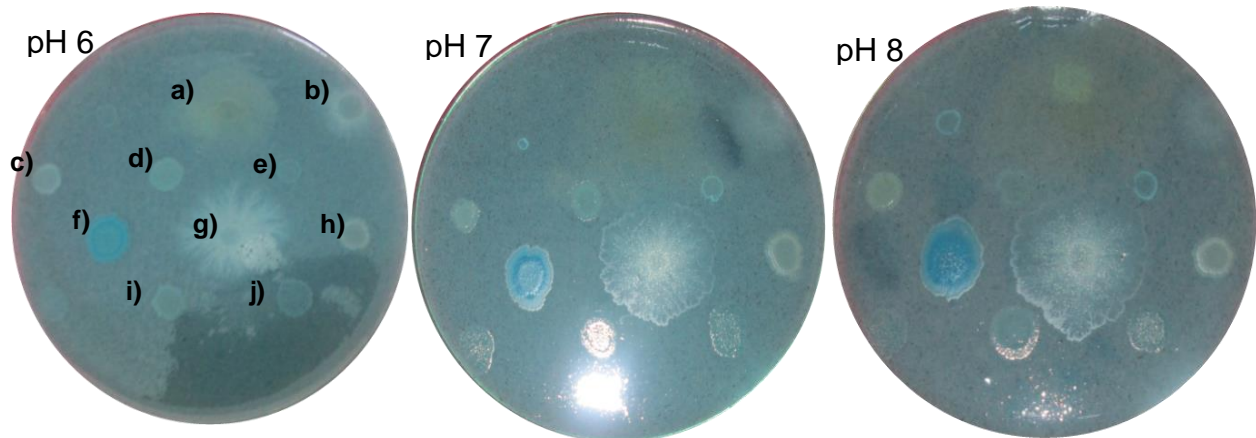


Figura 6. Diámetros de crecimiento de colonias bacterianas en función a pH de 6, 7 y 8, demostrando que el pH es una variable en la formación de queratinasas. Simbología: a): M3AN1III, b): M1ABB3, c): M2ABB1II, d): M1ABB8, e): M1ANB9 f): M2ABB4II, g): M3ANB5, h): M2ANB1II, i): M1ANB16, j): M1ABB6

Cuadro 3. Halos de crecimiento de diferentes cepas en actividad queratinolítica en medio APA con variaciones de pH

Cepa	pH (cm)			
	6	6.5	7	8
M2ABB1	1.95	2.12	2.7	2.8
M2ABB4II	1.1	1.85	1.5	1.9
M3ABB1III	2	1.8	2.15	2.6
M3ANB5	2.2	1.8	3	3.65
M2ANB1II	1	1	1.75	1.85
M1ABB6	0.9	0.85	1.2	1.5
M3ANB2II	1.8	2.1	2.5	2.5
M1ANB9	0.9	0.8	1	1
M2ABB4II	3.5	4.15	4.3	3.3
M1ABB8	1	1.1	1.3	1.3
M1ANB14III	2	2.6	2.9	3.1
M1ABB3	1	1.1	1.8	1.8
M2ABB4	1.85	2.18	2.8	3.5
M2ABB1II	0.8	0.8	1.2	1.4
M1ANB16	1	1	1.3	1.5
M1ABB3I	1	1.85	2.17	2.53

10.4.3 Índice de solubilización y actividad queratinolítica de la β -queratina

El índice (prueba) de solubilización se realizó a las 16 bacterias que presentaron actividad para degradar queratina. Para este ensayo el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del ICUAP proporciono 4 cepas bacterianas con clave TZB31, TZB30, IQ2-2 y PPQ26, las cuales presentan actividad proteolítica, pectinolítica y quitinolítica. Se preparó el medio de cultivo líquido caldo de ave a un pH de 7.5, ya que fue en el intervalo en el que las bacterias presentaron una mayor actividad de las queratinasas.

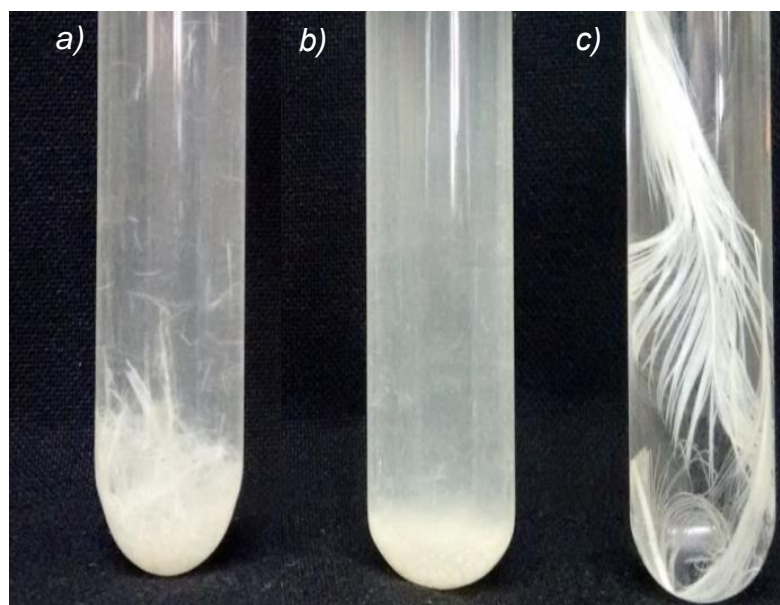


Figura 7 Degradación de pluma Simbología; a): *Burkholderia cepacia* M3ANB2II b): *Chryseobacterium indologenes* TZB31 c): CONTROL

En la figura 7 se observó una mayor solubilización de la pluma en caldo con las cepas *Chryseobacterium indologenes* TZB31 y *Burkholderia cepacia* M3ANB2II, degradando en su totalidad el estandarte de la pluma sin la adición de fuentes de nitrógeno excepto la pluma como fuente de carbono. Se ha descrito que la pluma presenta dos tipos de queratina (α y β), sin embargo, la β -queratina al presentar una mayor porosidad en su estructura y una menor concentración de enlaces di-sulfuro, es más accesible para su digestión por las queratinasas (Lange *et al.*, 2016). Todas las bacterias presentan actividad queratinolítica, pero no todas

degradan la β -queratina con eficiencia, las cuatro cepas presentaron una mayor eficiencia en la degradación de este sustrato reflejando mayor densidad en el medio y medida a través de la absorbancia (Figura 8). Las cepas *Burkholderia cepacia* M3ANB2II (3.5705 ± 0.04596), *Chryseobacterium indologenes* TZB31 (3.54 ± 0.14284), M1ANB9 (3.1415 ± 0.02192) y *Brevundimonas vesicularis* M2ANB1II (2.9465 ± 0.17183) presentaron una mayor presencia de fragmentos de β -queratina en el medio de cultivo (Cuadro 4), reflejando la actividad enzimática de las queratinasas sobre la β -queratina (Goldstein *et al.*, 2004). Se ha descrito una mayor producción de queratinasas bajo condiciones de agitación del medio (Kothari *et al.*, 2017). Además de la temperatura, pH y la presencia de fuentes de nitrógeno y minerales.

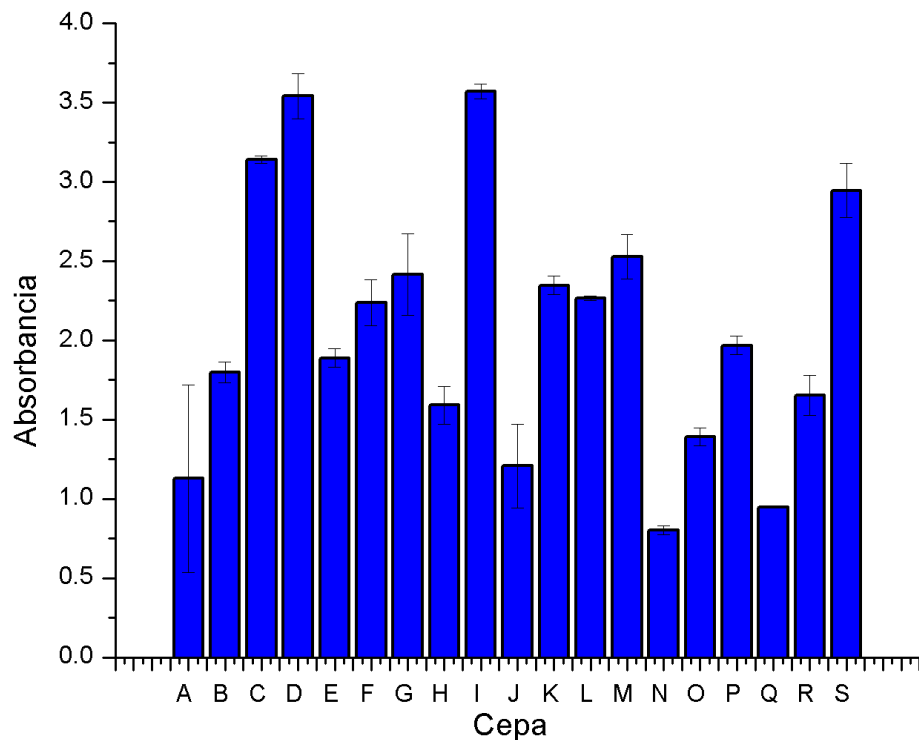


Figura 8. Actividad queratinolítica de la β -queratina

Cuadro 4. Actividad queratinolítica de la β -queratina

Cepa	Simbología de grafica	Densidad óptica
M1ANB14III	A	1.129±0.591
M1ABB3I	B	1.798±0.065
M1ANB9	C	3.141±0.021
TZB31	D	3.540±0.142
TZB30	E	1.889±0.057
M1ABB3	F	2.239±0.144
M3ABB1III	G	2.416±0.258
M2ABB4II	H	1.590±0.120
M3ANB2II	I	3.570±0.045
IQ2-2	J	1.207±0.265
M1ABB8	K	2.346±0.057
M3ANB5	L	2.264±0.014
M2ABB1I	M	2.528±0.140
M1ANB16	N	0.803±0.026
M2ABB4	O	1.392±0.055
M2ABB1II	P	1.968±0.059
M1ABB6	Q	0.948±0.006
PPQ26	R	1.652±0.127
M2ANB1II	S	2.946±0.171

Lectura de absorbancia 230 nm: Valores promedio de 2 repeticiones, seguidas de su desviación estándar.

10.5 Caracterización bioquímica de cepas con actividad queratinolítica por medio de sistema API 20NE

En este trabajo solo se caracterizaron las cepas que presentaron mayor eficiencia para degradar la queratina, la cepa con clave TZB31 fue identificada como *Chryseobacterium indologenes*. Se ha descrito que *C. indologenes* es una bacteria Gram negativa considerada de alta actividad queratinolítica, capaz de

hidrolizar plumas sin ningún pretratamiento las cuales presentan actividad a pH de 8.5 y a temperaturas de 50°C (Riffel *et al.*, 2007). También se ha evidenciado que es productor de pectinasas (Roy *et al.*, 2018). Se ha reportado que cepas de género *Serratia* sp. produce altas concentraciones de proteína soluble en los hidrolizados (Brandelli *et al.*, 2015) Las otras tres cepas se identificaron por el sistema API 20NE como se muestra en el cuadro 5

Cuadro 5. Identificación de cepas bacterianas

Origen	Clave	Especie
Residuos forestales	TZB31	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
Residuos avícolas	M1ANB9	No identificada
Residuos avícolas	M2ANB1	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
Residuos avícolas	M3ANB2II	<i>Burkholderia cepacia</i>

La cepa M1ANB9 no se logró identificar por este sistema.

La bacteria con clave M3ANB2II se identificó como *Burkholderia cepacia*. El género *Burkholderia* se caracteriza por tener una amplia distribución mundial en todos los suelos, algunas bacterias de este género pueden ser patógenos oportunistas como es el caso de *Burkholderia cepacia* (Bolívar *et al.*, 2016), sin embargo, también se ha demostrado que puede desempeñar un papel importante en la degradación de hidrocarburos poliaromáticos y puede desarrollar queratinasas (Revathy *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2003; Gopinath *et al.*, 2015). El género *Brevundimonas* se puede encontrar como parte de la biota de la gallina (Oakley *et al.*, 2014) al igual que en el suelo y en mantos acuíferos. La cepa M2ANB1 fue identificada como *Brevundimonas vesicularis*, al igual que el género *Burkholderia* se ha descrito como un patógeno oportunista. (Ryan & Pembroke. 2018). Esta especie bacteriana también se ha evidenciado que puede desempeñar un papel en la biorremediación de aguas residuales (Singh & Gadi, 2012), sin embargo, no existe registro de que esta bacteria presente actividad queratinolítica.

Entre los géneros de bacterias Gram positivas se encuentran *Atinomyces* sp. y *Bacillus* que son las más comúnmente aisladas de las plumas de aves y con

la capacidad de solubilizar totalmente la queratina de diferentes orígenes como uñas, pelo y plumas (Lange *et al.*, 2016). En la búsqueda de bacterias actividad queratinolítica utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se mostró que *Bacillus* sp. era la responsable de la degradación queratinolítica de la lana (Rey, 2018).

10.6 Aplicación de bacterias degradadoras de queratina como propuesta de compostaje de plumas

Una vez caracterizado las cepas con mayor potencial de degradación de la queratina, se elaboraron diferentes preparaciones biológicas dado distintos tratamientos (Cuadro 6) para su aplicación como propuesta de compostaje de plumas y así acelerar el proceso de degradación de éstas, ya que por la complejidad química de la pluma tiende a degradarse de manera natural lentamente (Ma *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Aplicación de bacterias productoras de enzimas queratinolíticas para el proceso de compostaje a nivel invernadero

Tratamiento	Clave	Contenido
T1	M1ANB9	No identificada
T2	M3ANB2	<i>Burkholderia cepacia</i>
T3	TZB31	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
T4	M2ANB1	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
T5	M1ANB9 + M3ANB2 + TZB31 + M2ANB1	T1 + T2 + T3 + T4
T6	Control

El experimento de aplicación de bacterias sobre la mezcla de suelo y plumas, se mantuvo durante 150 días a una humedad relativa del 40%, ya que se ha descrito que una humedad regulada facilita la actividad de las queratinasas en las especies microbianas (Kothari *et al.*, 2017). Para la preparación del experimento se utilizó un suelo pobre en materia orgánica como sustrato, tanto el suelo como las plumas que se emplearon sin esterilizar. Se observa en el Cuadro 7 un cambio de pH en el sustrato en todos los tratamientos, de 6.5 a 4.5, debido a

una liberación de iones amonio, en el sustrato provocado por el mecanismo propio de la degradación de la queratina (sulfólisis, proteólisis y desaminación)(Koenillowicz-Kowalska & Bohacz, 2009). Se ha descrito que el compostaje de plumas proporciona nutrientes que fácilmente la planta puede aprovechar como N-NH₄, N-NO₃ y S-SO₄. También se ha descrito que la liberación de aminoácidos en el medio aumenta las concentraciones de triptófano, el cual, es un precursor de hormona de crecimiento (Tamreihao *et al.*, 2019).

Cuadro 7. Evaluación de índice de acidez o alcalinidad

Tratamiento	Mes				
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
T1	6.50±0.355 ab	5.78±0.065 ab	4.28±0.040 bc	4.40±0.035 bc	4.62±0.055 ab
T2	7.08±0 a	5.39±0.045 b	4.41±0.250 ab	4.49±0.145 b	4.64±0.045 ab
T3	6.85±0.125 ab	5.42±0.010 b	4.21±0.140 ab	4.14±0.055 c	4.30±0.170 c
T4	6.47±0.110 b	5.38±0.290 b	4.03±0.060 b	4.22±0.050 bc	4.78±0.080 a
T5	6.47±0.310 b	5.49±0.260 ab	4.47±0.525 ab	4.31±0.090 bc	4.59±0.185 ab
T6	6.49±0.165 ab	5.88±0.300 a	4.73±0.025 a	4.81±0.200 a	4.46±0.105 b

Valores promedio de 3 repeticiones, seguidas de su desviación estándar, medias con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey p≤0.05)

Cuadro 8. Evaluación de materia orgánica disponible

Tratamiento	Mes				
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
T1	0.730±0.1460 b	1.940±0.448 a	2.513±0.279 ab	2.709±0.428 a	2.767±0.145 cd
T2	1.314±0.438 ab	1.791±0.299 a	3.053±0.305 a	3.155±0.636 a	3.205±0.152 abc
T3	1.314±0.438 ab	1.492±0 a	2.708±0.142 ab	2.994±0.428 a	3.641±0.145 a
T4	1.752±0 a	2.089±0.299 a	2.285±1.143 ab	2.566±0 a	3.350±0.145 ab
T5	1.168±0.292 ab	1.641±0.149 a	2.233±0 ab	2.423±0.142 a	2.621±0.291 d
T6	0.876±0.584 b	1.373±0.152 a	1.569±0.427 b	2.709±0.428 a	2.913±0.291 bcd

Valores promedio de 3 repeticiones, seguidas de su desviación estándar, medias con distinta letra en el sentido de la columna son diferentes estadísticamente (Tukey p≤0.05)

Se encontró que, en la evaluación de materia orgánica disponible (Cuadro 8) hay un aumento en todos los tratamientos, sin embargo, en los meses de febrero y abril no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos, pero si se observa un incremento de la materia orgánica disponible con el resultado del anterior mes. También solo el mes de mayo presento cambios estadísticamente significativos, demostrando que el tratamiento T3 (3.6411) y T4 (3.35) tuvieron una mayor eficiencia en la degradación de la queratina, denotando que las bacterias *Chryseobacterium indologenes* y *Brevundimonas vesicularis* pueden desempeñar un papel importante para la degradación de la queratina en condiciones de invernadero. También podemos decir que los tratamientos T1 (2.7673) y T2 (3.2056) presentan actividad queratinolítica estadísticamente similar que el tratamiento control (2.9130), por lo que no existen diferencias significativas entre ellos. El tratamiento T5 (2.6217) a pesar de que fue un consorcio constituido por los tratamientos T1, T2, T3 y T4, presento una menor actividad en la degradación de la queratina, esto se debe a que posiblemente exista un antagonismo entre ellas y se vea reflejado en la materia orgánica disponible. La aplicación de microorganismos en residuos orgánicos pueden generar humus, capaz de mejorar las características del suelo y ofrecer nutrientes disponibles para la absorción de las plantas (Koernilowicz-Kowalsk y Bohacz, 2009). Aunque se observa que a través del tiempo el contenido de materia orgánica se incrementa y en algunos meses no hay diferencia. Probablemente se deba a que las enzimas manifiestan su mayor actividad a pH alcalino.

Los resultados obtenidos demuestran que los residuos avícolas se pueden aprovechar para enriquecer los suelos con materia orgánica, y así contribuir en la degradación de residuos a través de bacterias, también se ha encontrado que se pueden obtener hidrolizados derivados de las plumas con actividad antioxidante con cepas bacterianas debidamente seleccionadas, además de diferentes compuestos con acción bioactiva de aplicación en la industria farmacéutica. En este caso puede ser una alternativa amigable con el ambiente, además puede aportar productos de valor agregado a partir de materiales económicos como son

las plumas donde se generan en grandes cantidades por la alta demanda de aves en la industria de alimentos.

11. Conclusiones

- El uso de bacterias productoras de enzimas queratinolíticas puede ser de ayuda para mejorar u optimizar un proceso de degradación de plumas, y como alternativa amigable con el medio ambiente, ya que las enzimas pueden sustituir innumerables aditivos químicos que causan daños irreparables al suelo.
- En la etapa de aislamiento de bacterias con actividad queratinolítica, se evidencio que unas muestras presentaron mayor número de aislamientos sobre todo en aquellas donde la pluma y el suelo ya se había iniciado el proceso de biodegradación natural, aislando un total de 47 bacterias mediante una prueba presuntiva, de las cuales solo 16 presentaron actividad queratinolítica.
- Solo tres bacterias aisladas e identificadas del sistema suelo pluma presentaron una mayor actividad de degradación de la β -queratina *in vitro*, entre ellas están: *Burkholderia cepacia* (M3ANB2), *Brevundimonas vesicularis* M2ANB1, y *Chryseobacterium indologenes* (TZB31) y M1ANB9 sin identificar.
- Los tratamientos con *Chryseobacterium indologenes* y *Brevundimonas vesicularis* presentaron mayor eficiencia de degradación de la queratina como modelo de compostaje en comparación al control en un tiempo de 150 días.

12. Bibliografía

1. Abdel-Fattah, A., El-Gamal, M., Ismail, S., Emran, M. y Hashem, A. (2018). Biodegradation of feather waste by keratinasa produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 311-318.
2. Aguilera, M. (2000). Importancia de la protección de la materia orgánica en suelos. Simposio Proyecto Ley Protección de Suelo, 14: 77-85.
3. Aluigi, A., Vineis, C., Varesano, A., Mazzuchetti, G., Ferrero, F. y Tonin, C. (2008). Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *European Polymer Journal*, 44(8): 2465–2475.
4. Atlas, R. y Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, 259, 360, 361
5. Barone, J., Schmidt, W. y Liebner, C. (2005). Thermally processed keratin films. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(4): 1644–1651.
6. Bolívar, H., Contreras, M. y Teherán, L., (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), 102-108.
7. Brandelli, A., Sala, L. y Kalil, S. J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*, 73: 3-12.
8. Calle, L. y Ruiz, W. (2017). Obtención de termoplásticos a partir de plumas de pollo. *FIGEMPA: Investigación y desarrollo*, 2(7): 69-72
9. Călin, M., Constantinescu, D., Alexandrescu, E., Răut, I. y Badea, M. (2017). Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Bototechnology*, 28: 101-112.
10. Castillo, E. y Rodríguez, M. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria*, 15: 2-10.
11. Coello, N., Bernal, C., Bertsch, A., Estrada, O., Moccó, Y. y Hasegawa, M. (2003). Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial, *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Central de Venezuela*, 18(3): 119-126.

12. Coello, N., Vidal, L. y Bretaña, A. (2000). aislamiento de una cepa de *Koçuria rosea* degradadora de plumas de ave de corral. *Revista científica FCV-LUZ*, 2, 107 – 113
13. Conti, M. (2000). Principios de Edafología... con énfasis en suelos argentinos (2da. Ed.). Argentina: Editorial Facultad de Agronomía, 68 - 70.
14. Costa, F., Silva, R., y Boccaccini, A. R. (2018). Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair. *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, 175–204.
15. Crespo, C. (2004). Mecánica de suelos y cimentaciones (5ta ed.)México: Limusa, 17, 18
16. Cury, K., Aguas, Y., Martinez, A., Olivero, R. y Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9(S1), 122-132.
17. Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F, y Brandelli, A. 2011 Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian Bacterium *Bacillus* sp. P45. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1): 45–51.
18. DellaSala, D. (2018). The Carbon Cycle and Global Change: Too Much of a Good Thing. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 7-10.
19. Enciso, V., Galicia, P., Zavaleta, H., Torres, D. y Quezada, M., (2017). Degradación de plumas de pollo por medio de un co-cultivo de bacterias, XIV encuentro, Participación de la Mujer en la Ciencia, León, Guanajuato.
20. Espinoza, Y. (2004). Calidad de la materia orgánica bajo diferentes prácticas de manejo en un suelo ácido tropical. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(2): 126-141.
21. FAO (2019). *Manejo de los desechos avícolas | Producción y productos avícolas | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado de: <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/management-and-housing/waste-management/es/>

22. Ferrareze, P. A. G., Folmer C. A. P. y Brandelli A. (2016). Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 102–109.
23. FIRCO. (2017). Agroindustria en México. Gob.mx. Recuperado de: <https://www.gob.mx/firco/articulos/agroindustria-en-mexico?idiom=es>
24. Florida, N. (2019) Plumas: implicacia ambiental y uso en la industria agropecuaria. *Revista de investigaciones Altoandinas*, 21 (3): 225 -237.
25. Garbisu, C., Becerril, J., Epelde, L., & Alkorta, I. (2007). Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*, 16(2): 44-49.
26. Goldstein, G., Flory, K., Browne, B., Majid, S., Ichida, J. y Burt, E. (2004). bacterial degradation of black and white feathers. *The Auk*, 121(3): 656-659.
27. Gopinath, S., Anbu, P., Lakshnipriya, T., Tang, T., Chen, Y., Hashim, U. y Arshad, M. (2015). Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed Research International*, 2015: 1-10.
28. Grace, J. (2013). Carbon Cycle. *Encyclopedia of Biodiversity*, 674-684.
29. Gupta, R., y Ramnani, P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 21–33.
30. Gurav, R., y Jadhav, J. (2012). A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation, *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 4532–4539.
31. Kalaikumari, S., Vennila, T., Monika, V., Chandra, K., Gunasekaran, P. y Rajendhran J. (2018). Bioutilization of poultry feather for keratinase production and its application in leather industry. *Journal of Cleaner Production*, 208:44-53.
32. Kim T., Lee E., Kim Y., Cho K. y Ryu H. (2003). Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(4): 411- 417.
33. Koenillowicz-Kowalska, T. y Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: Theory and practil aspects, *Waste Management*, 31(8): 1689 - 1701.

34. Koenillowicz-Kowalska, T. y Bohacz, J. (2009). Changes in enzymatic activity in composts containing chicken feathers. *Bioresource Technology*, 100: 3604 – 3612.
35. Kothari, D., Rani, A. y Goyal, A. (2017). Keratinases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Oxford, UK: ElsevierBV, 447-471.
36. Kowata, K., Nakaoka, M., Nishio, K., Fukao, A., Satoh, A., Ogoshi, M., Takahashi, S., Tsudzuki, M. y Takeuchi, S. (2014). Identification of a feather β -keratin gene exclusively expressed in pennaceous barbule cells of contour feathers in chicken, *Gene*, 542(1): 23-28.
37. Kwiatkowski, K., Krzysztoforski, J., Bajer, K., y Dudyński, M. (2013). Bioenergy from feathers gasification – Efficiency and performance analysis. *Biomass and Bioenergy*, 59: 402–411.
38. Lange L., Huang Y. y Kamp Busk P. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature-a new hypothesis of industrial relevance, *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 2083-2096.
39. Liu, X., y Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 267–298.
40. López, A., Luna, C., Buenrostro, J., Hernández, R., Huerta, S., Escalona, H., Aguilar, C., y Prado, L. (2016). Efecto del pH, temperatura y fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1): 57-67.
41. Lut, H. (2002). Geomicrobiology (4ta ed.)New York: Marcel Dekker, 142-143.
42. Lucas, F., Broennimann, O., Febbraro, I., y Heeb, P. (2003). High Diversity among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil. *Microbial Ecology*, 45(3): 282–290.
43. Ma, B., Quiao, X., Hou, X. y Yang, Y. (2016). Pure keratin membrane and fibers from chicken feather. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89: 614-621.
44. Mathews, C., Van Holde, K. y Aher, K. (2002). Bioquímica (3ra ed.)Madrid: Pearson Educación, 19.

45. Nelson, D., Cuchillo, Foix, C., Lehninger, A., y Cox, M. (2005). Lehninger: Principios de Bioquímica (4a. ed.). Barcelona: Omega, 120 – 124.
46. Oakley, B., Lillehoj, H., Kogut, M., Kim, W., Maurer, J., Pedroso, A., Lee, M., Collett, S., Johnson, T. y Cox, N. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 360(2): 100–112,
47. Petsko, G. y Ringe, D. (2004). Protein Structure and Function. London, UK: New Science Press Ltd, 16.
48. Porta, J., Lopéz-Acevedo, M. y Poch, R. (2008). Introducción a la edafología: Uso y protección del suelo. Madrid: Ediciones MundiPrensa, 20-23.
49. Porta, J., Lopéz-Acevedo, M. y Roquero, C. (2003). Edafología: Para la agricultura y el medio ambiente. Madrid: Ediciones MundiPrensa, 193, 195.
50. Quintero, G., Huertas, W. y Ortega, E. (2017). Procesamiento de plumas de pollo para la obtención de queratina. *UGCiencia*, 23: 81-87.
51. Rai, K., Rocktotpal, K. y Ashis, K. (2009). Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline B-keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate, *Biochemical Engineering Journal*, 45(3): 218-225.
52. Revathy, T., Jayasri, M. A., y Suthindhiran, K. (2015). Biodegradation of PAHs by *Burkholderia* sp. VITRSB1 Isolated from Marine Sediments. *Scientifica*, 2015:1-9.
53. Rey, P. (2018). Evaluación de diferentes cepas queratinolíticas en la hidrolisis de plumas de pollo. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 65.
54. Reynolds, W., Drury, C., Tan C. y Yang X. (2015). Temporal effects of food waste compost on soil physical quality and productivity. *Canadian Journal of Soil Science*, 95: 251-268.
55. Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C., Souza, G., Eberlin, M. y Tavares, F. (2007). Purificación y caracterización de una metaloproteasa queratinolítica de *Chryseobacterium* sp. kr6. *Journal of Biotechnology*, 128 (3): 693–703.

56. Román, P. Martínez, M. y Pantoja, A., (2013). Manual de compostaje del agricultor, Experiencias en América Latina, Santiago de Chile: FAO. 22
Recuperado de : <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>
57. Roy, K., Dey, S., Uddin, M., Barua, R., y Hossain, M. (2018). Extracellular Pectinase from a Novel Bacterium *Chryseobacterium indologenes* Strain SD and Its Application in Fruit Juice Clarification. *Enzyme Research*, 2018: 1–7.
58. Ryan, M. y Pembroke, J. (2018). *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*. 9: 480–493
59. Sánchez, B., Ruiz, M. y Ríos, M. (2005). Materia orgánica y actividad biológica del suelo en la relación con la altitud, en la cuenca del Río Maracay, Estado Aragua. *Agronomía Tropical*, 55: 507- 534.
60. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 16 (2): 14–46.
61. Smith, T. y Smith, R. (2007). *Ecología* (6ta ed.) Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, 480.
62. Solomon, E., Berg, L. y Martin, D. (2013). *Biología* (9na ed.) México, DF: Cengage Learning, 1203 – 1204.
63. Singh, N. y Gadi, R. (2012). Bioremediation of Ni(II) and Cu (II) from wastewater by the nonliving biomass of *Brevundimonas vesicularis*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 4(8): 137-142.
64. Stingone, J. A., y Wing, S. (2011). Poultry Litter Incineration as a Source of Energy: Reviewing the Potential for Impacts on Environmental Health and Justice. *NEW SOLUTIONS: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy*, 21: 27–42.
65. Suntornsuk, W. y Suntornsuk, L. (2003). Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresource Technology*, 86: 239-243
66. Tamreihao, K., Mukherjee, S., Khunjamayum, R., Jaya, L., Singh, R. y Ningthoujam, D. (2019). Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultura production. *Journal of Basic Microbiology*, 59: 4-13.

67. Tesfaye, T., Sithole, B., y Ramjugernath, D. (2017). Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19: 2363–2378.
68. Tortora, G., Funke, B. y Casem C. (2007) Introducción a la microbiología (9a ed.) Buenos Aires: Medica Panamericana, 811,812.
69. UNA (2019). indicadores económicos, Unión nacional de avicultores. Recuperado de: <https://www.una.org.mx/indicadores-economicos/>
70. Valls, J. (2017). El buen rendimiento del canal de pollo. *avicultura.info*. Recuperado de: <https://avicultura.info/el-buen-rendimiento-de-la-canal-de-pollo/>
71. Vázquez P., García M., Navarro M y García D. (2015). Efecto de la composta y té de composta en el crecimiento y producción de tomate (*Lycopersicon esculentum mill.*) en invernadero. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 36: 1351 - 1356.
72. Vidmar, B., y Vodovnik, M. (2018). Microbial keratinases: enzymes with promising biotechnological 4 applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3): 312-328.
73. Williams, C. (2013). Desechos del matadero. *Gestión de residuos de aves de corral en los países en desarrollo*. Roma, Italia; FAO, Revisión del desarrollo avícola, 59 - 60. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/i3531s/i3531s05.pdf>
74. Zhang, J., Li, Y., Li, J., Zhao, Z., Liu, X., Han, Y., Hu, J. y Chen, A. (2013). Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder Technology*, 246: 356-362.